

最 終 報 告 書

2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾール (被験物質番号 K-868) の
コイにおける濃縮度試験

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

信頼性保証書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾール (被験物質
番号 K-868) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50868

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 元年 6月26日	平成 元年 6月26日	平成 元年 6月26日
平成 元年 7月10日	平成 元年 7月11日	平成 元年 7月11日
平成 元年 7月11日	平成 元年 7月11日	平成 元年 7月11日
平成 元年 7月28日	平成 元年 7月28日	平成 元年 7月28日
平成 元年10月26日	平成 元年10月26日	平成 元年10月26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 元年 10月26日
信頼性保証業務担当者

平成 元年 10月26日
信頼性保証部門責任者

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾール (被験物質番号
K-868) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50868

上記試験は、昭和63年11月18日付、環企研第233号、衛生第38号及び63
基局第823号による「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ついて」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」に従って実施したものです。

平成 元 年 10 月 26 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. 試験期間	3
7. 試験関係者	3
8. 最終報告書作成日	3
9. 最終報告書の承認	3
10. 被 験 物 質	4
11. 急性毒性試験	6
12. 濃縮度試験の実施	8
13. 試験結果	25
14. 試資料の保管	28
15. 備 考	28
16. 表 の 内 容	30
17. 図 の 内 容	31
参考データ	
付表及び付図	

要 約

1. 試験の表題

2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾール (被験物質番号K-868) の
コイにおける濃縮度試験

2. 試験の方法

本試験において用いた提供試料には、被験物質である2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾールの他に18.1% (W/W) のビス (2-ベンゾチアゾリルチオ) メタンが不純物として含まれる。濃縮度試験はこれらの分離精製が困難なため、提供試料を用いて実施し、被験物質及びビス (2-ベンゾチアゾリルチオ) メタンの濃縮性を評価した。

3. 試験条件

3.1 急性毒性試験

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

3.2 濃縮度試験

- | | | | | |
|-----------|---------------|-------|--------|------|
| (1) 供試魚 | コイ | | | |
| (2) 試験濃度 | 被験物質 | 第1濃度区 | 2 | 18/l |
| | | 第2濃度区 | 0.2 | 18/l |
| | 不純物 | 第1濃度区 | 0.456 | 18/l |
| | | 第2濃度区 | 0.0456 | 18/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 | | | |

4. 試験結果

- | | | | | |
|---------------|--------------------|-------|---------|-------|
| (1) 48時間LC50値 | 98.9 18/l (提供試料濃度) | | | |
| (2) 濃縮倍率 | 被験物質 | 第1濃度区 | 14倍以下~ | 20倍 |
| | | 第2濃度区 | 153倍以下~ | 268倍 |
| | 不純物 | 第1濃度区 | 1080~ | 2360倍 |
| | | 第2濃度区 | 1410~ | 4240倍 |

5. 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 50868

1. 表 題 2- (チオシアナトメチルチオ) ベンゾチアゾール (被験物質番号 K-868) 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 被験物質K-868及び不純物 [ビス (2-ベンゾチアゾリルチオ) メタン] 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〉による。

6. 試験期間

(1) 試験開始日 平成元年 6月26日

(2) 試験実施期間

供試魚受入日 平成元年 5月 9日

じゅん化終了日 平成元年 6月 2日

ばく露開始日 平成元年 6月26日

ばく露終了日 平成元年 8月21日

(3) 試験終了日 平成元年10月 6日

7. 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

8. 最終報告書作成日

平成元年10月 6日

作成者

9. 最終報告書の承認

平成元年10月6日

試験責任者

氏名

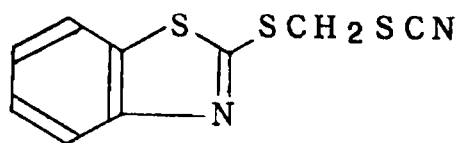
10. 被 験 物 質

本報告書において被験物質K-868は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 2-（チオシアナトメチルチオ）ベンゾチアゾール

10.2 構造式等

構造式



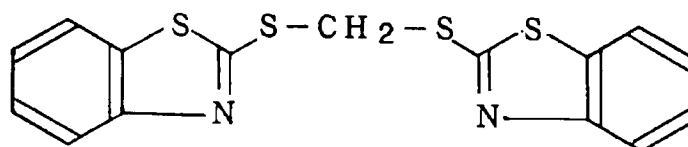
分子式 $C_9H_6N_2S_3$

分子量 238.36

10.3 成分組成^{*1} K-868 [2-（チオシアナトメチルチオ）ベンゾチアゾール]
79.5%
ビス（2-ベンゾチアゾリルチオ）メタン
以下、不純物と称する。 18.1%

ただし、不純物は以下の構造式等を有する。

構造式



分子式 $C_{15}H_{10}N_2S_4$

分子量 346.52

本報告書における被験物質及び不純物濃度は、成分組成で補正を行った数値を表示した。

*1 高速液体クロマトグラフィーによる。

10.4 提供者及び商品名

- (1) 提 供 者 [REDACTED]
(2) 商 品 名 [REDACTED] ([REDACTED])

10.5 同 定

赤外吸収スペクトル（図-24参照）、質量スペクトル（図-25, 26参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図-30参照）により被験物質及び不純物の構造を確認した。

10.6 保管条件及び保管条件下での安定性

- (1) 保 管 条 件 冷暗所
(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（図-24参照）、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。

10.7 試験条件下での安定性

ばく露開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

11. 急性毒性試験

11.1 試験方法

「工場排水試験方法」魚類による急性毒試験 (JIS K 0102-1986 の 71.) の方法に準じて行った。

11.2 供試魚

- | | | |
|---------|---|---|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 中島養魚場
(住所 〒 869-01 熊本県玉名郡長洲町大明神) |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | 期 | 間 |
| | 等 | |
| | 薬 | 浴 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、蓄養槽で薬浴後、流水状態で12日間飼育した。
20 mg/lエルバージュ (上野製薬製) 溶液及び7 g/l塩化ナトリウム溶液を用いて止水状態で24時間薬浴を行った。 |
| (4) じゅん | 化 | 条件 |
| | | じゅん化槽でじゅん化し、その間異状のあるものは除去し、最終的には $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で14日間飼育した。 |
| (5) 体 | | 重 |
| | | 平均 0.17 g |
| (6) 全 | | 長 |
| | | 平均 2.7 cm |
| (7) 検 | | 定 |
| | | 田端健二 ^{*2} の方法に準じ、塩化第二水銀検定合格魚と同一ロット (TFO-890621) のものを試験に供した。 |

*2 用水と廃水, 14, 1297-1303 (1972)

11.3 試験用水

(1) 種類

久留米研究所敷地内で揚水した地下水

(2) 分析及び水質確認

当研究所にて水温、pH及び溶存酸素は連続測定を行った。また、全硬度、蒸発残留物、化学的酸素要求量、遊離塩素及びアンモニア態窒素並びに有機リン、シアニオン、重金属等の有害物質は6ヶ月に1回定期的に分析した。試験用水を試験に供する場合、分析した項目が全硬度、蒸発残留物については「水道法に基づく水質基準」（昭和53年 8月31日 厚生省令第56号）、その他のものについては「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）に記載されている濃度以下であることを確認した（参考資料1参照）。

11.4 試験条件

- | | |
|------------|--------------------------------------|
| (1) 試験水槽 | 円型ガラス製水槽 |
| (2) 試験液量 | 4ℓ / 濃度区 |
| (3) 試験水温 | 25±2℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 8.0mg/ℓ
ばく露終了時 6.4～7.0mg/ℓ |
| (5) pH | ばく露開始時 8.1
ばく露終了時 7.9～8.1 |
| (6) 供試魚数 | 10尾 / 濃度区 |
| (7) ばく露期間 | 48時間 |
| (8) ばく露方法 | 半止水式（8～16時間毎に換水） |

11.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

(2) 調製方法

提供試料及び20倍量のHCO-40をアセトンに溶解させ、アセトンを留去してイオン交換水を加えて提供試料濃度1000mg/ℓ原液を調製した。

11.6 試験の実施

- | | |
|-----------|-------------------------|
| (1) 実施場所 | LC50測定室 |
| (2) 試験実施日 | 平成元年 7月10日 ～ 平成元年 7月12日 |

11.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff 法で行った。

11.8 試験結果

48時間LC50値

提供試料濃度として98.9 μ g/l (図-3参照)

12. 濃縮度試験の実施

12.1 供試魚

- | | |
|-----------------------------------|--|
| (1) 魚 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| (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) |
| (3) 蓄 養 条 件 | |
| 期 間 等 | 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2日間飼育した。 |
| 薬 浴 | 50 μ g/l水産用テラマイシン散(台糖ファイザー製)
溶液及び78 μ g/l塩化ナトリウム溶液を用いて止水状態で
24時間薬浴を行った。 |
| (4) じゅん化条件 | じゅん化槽でじゅん化し、その間異状のあるものは除去
し、最終的には25 \pm 2℃の水温の流水状態で20日間
飼育した。さらに試験水槽へ移し、同温度の流水状態で
23日間飼育した。 |
| (5) ばく露開始時の体重、体長等 ^{*3} | |
| 体 重 | 平均 26.8g |
| 体 長 | 平均 10.1cm |
| 脂質含有率 | 平均 4.6% |
| ^{*3} ロット(TFC-890509)の測定値 | |
| (6) 餌 料 | |
| 種 類 | コイ用ペレット状配合飼料 |
| 製 造 元 | 日本配合飼料株式会社 |
| 給 餌 方 法 | 供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。
ただし、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

12.2 試験用水

11.3に同じ。

12.3 試験及び環境条件

- | | | |
|-------------|---|-----------------------|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。 | |
| (2) 試験水槽 | 100ℓ 容ガラス製水槽 | |
| (3) 試験水量 | 原液2 ml/分及び試験用水800 ml/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1濃度区 | 5.3～7.5 mg/ℓ (図-21参照) |
| | 第2濃度区 | 5.2～7.3 mg/ℓ (図-22参照) |
| | 対照区 | 6.8～7.3 mg/ℓ (図-23参照) |
| (6) 供試魚数 | 第1及び第2濃度区 | 16尾 (ばく露開始時) |
| | 対照区 | 3尾 (ばく露開始時) |
| (7) ばく露期間 | 8週間 | |
| (8) 実施場所 | 第2アクアトロン室 | |

12.4 原液調製法

(1) 分散剤

11.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第1濃度区及び第2濃度区

提供試料0.1258g及び20倍量のHCO-40をアセトンに溶解させ、アセトンを留去してイオン交換水を加え100 mlに定容し、被験物質濃度1000 mg/ℓ、不純物濃度228 mg/ℓの原液を調製した。その原液を第1濃度区20 ml、第2濃度区2 mlホールピペットで分取し、イオン交換水で25ℓに定容して試験水槽に供給した。

・対照区

0.5032gのHCO-40をイオン交換水約50 mlで溶解させ、イオン交換水で25ℓに定容して試験水槽に供給した。

12.5 試験濃度

48時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

被験物質濃度	第1濃度区	2	mg/ℓ
	第2濃度区	0.2	mg/ℓ
不純物濃度	第1濃度区	0.456	mg/ℓ
	第2濃度区	0.0456	mg/ℓ

に設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

12.6 試験水及び供試魚分析

12.6.1 分析回数

試験水分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、毎週2回計16回行い、1回当たりの分析試料は1点とした。また、供試魚分析は第1、第2濃度区ともばく露開始後、2、4、6及び8週の計4回行い、1回当たりの分析試料は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回当たりの分析試料は2尾とした。

12.6.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

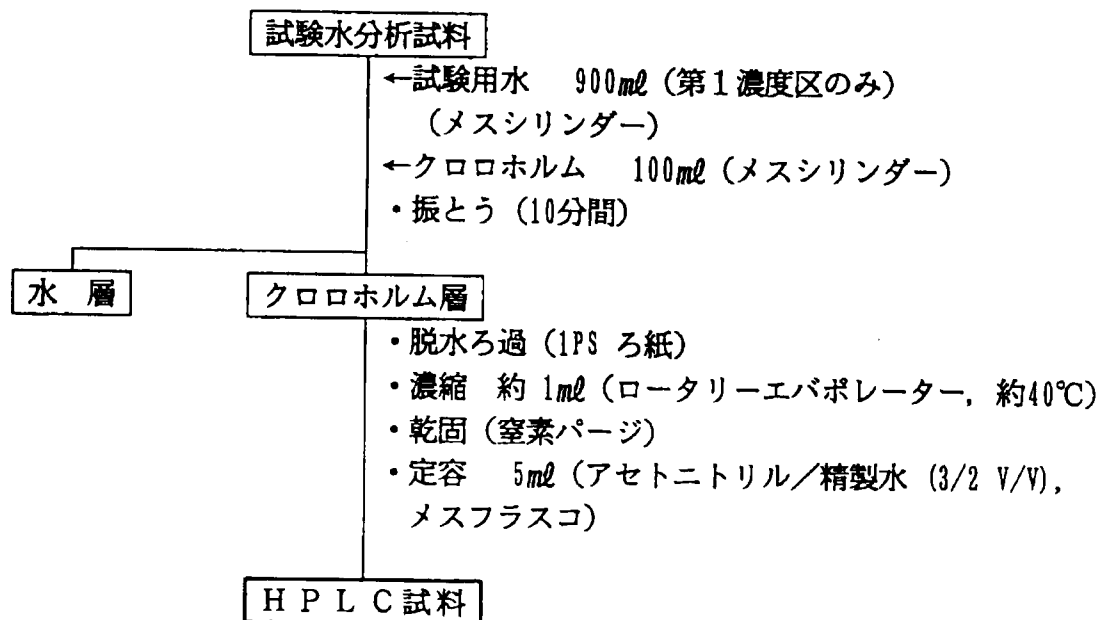
試験水槽から

第1濃度区 100ml

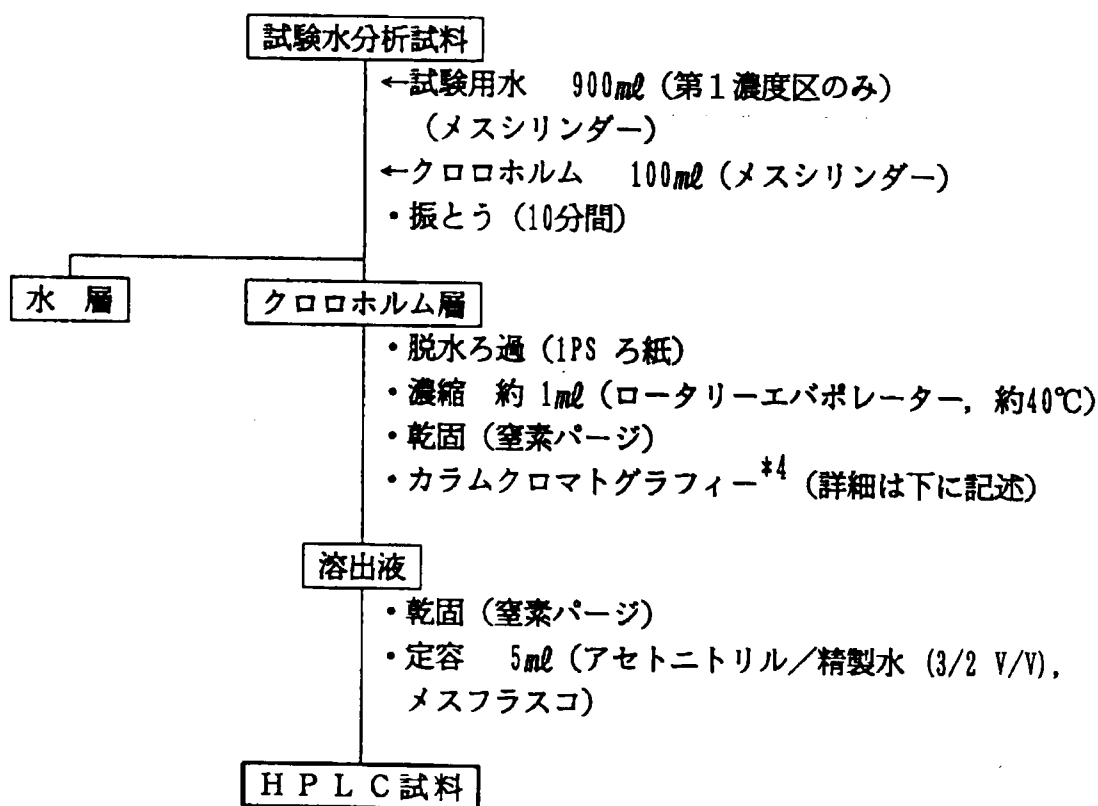
第2濃度区 1000ml

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理し、被験物質及び不純物分析のための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（被験物質）



フロースキーム（不純物）



*4 カラムクロマトグラフの条件
セップパック 中性アルミナ
(ヘキサン 5 ml で洗浄)

負荷法 ヘキサン 7 ml で負荷した。

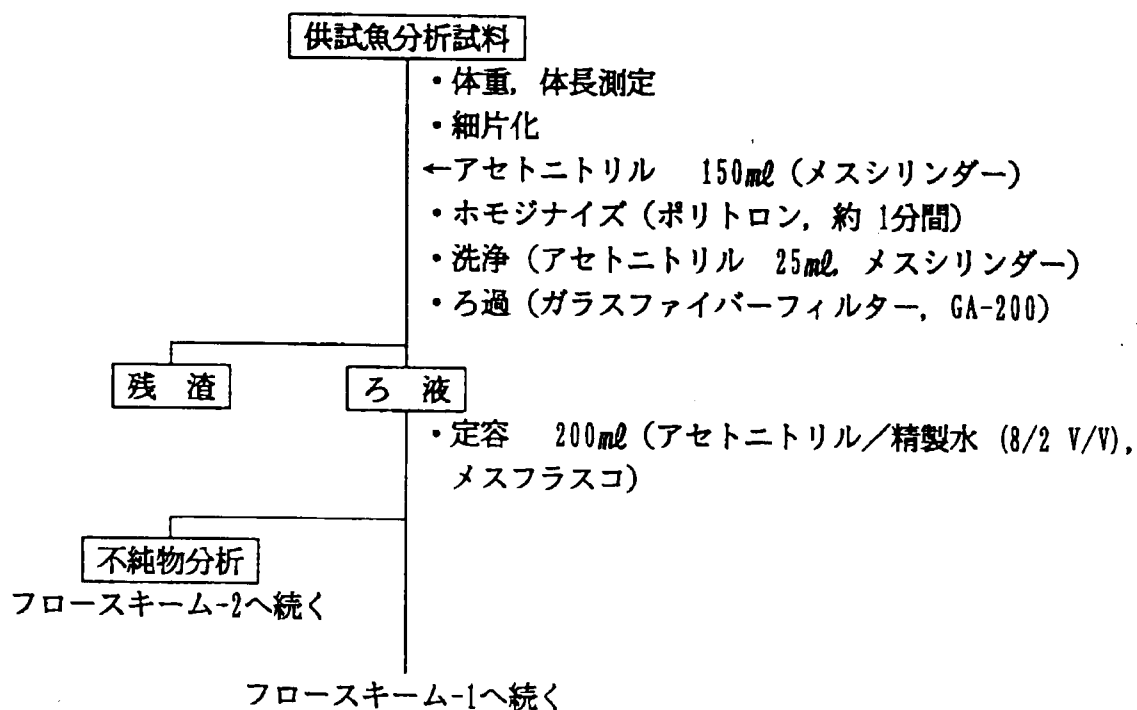
溶出法	第1 溶出液	ヘキサン/クロロホルム (1/1 V/V)	5 ml
	第2 溶出液	クロロホルム	5 ml
	第3 溶出液	クロロホルム	7 ml

不純物は第3 溶出液で溶出した。

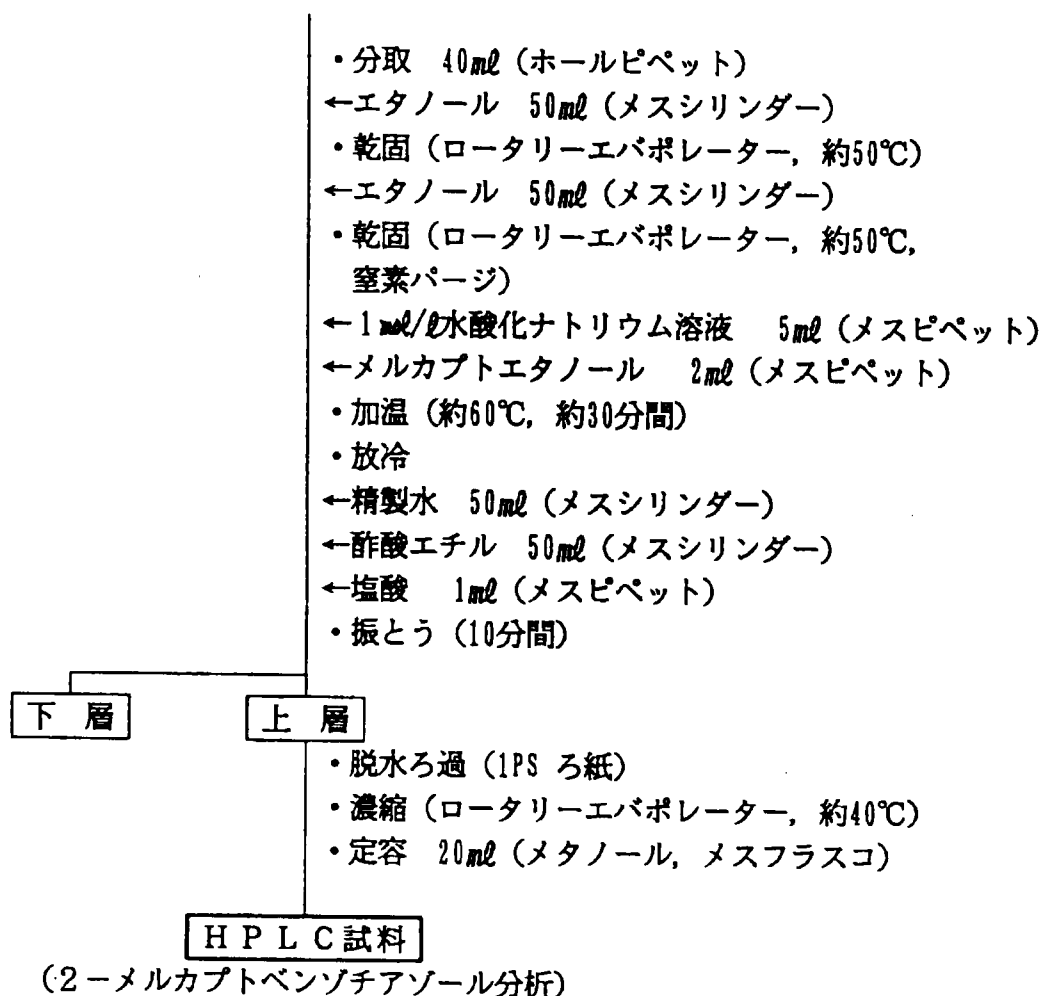
(2) 供試魚

供試魚分析において被験物質での分析が困難なため、以下のフロースキームに従ってアルカリ分解を行い、生成する2-メルカプトベンゾチアゾールで定量を行った。また、不純物についても以下のフロースキームに従い、前処理操作した後、HPLC試料とした。

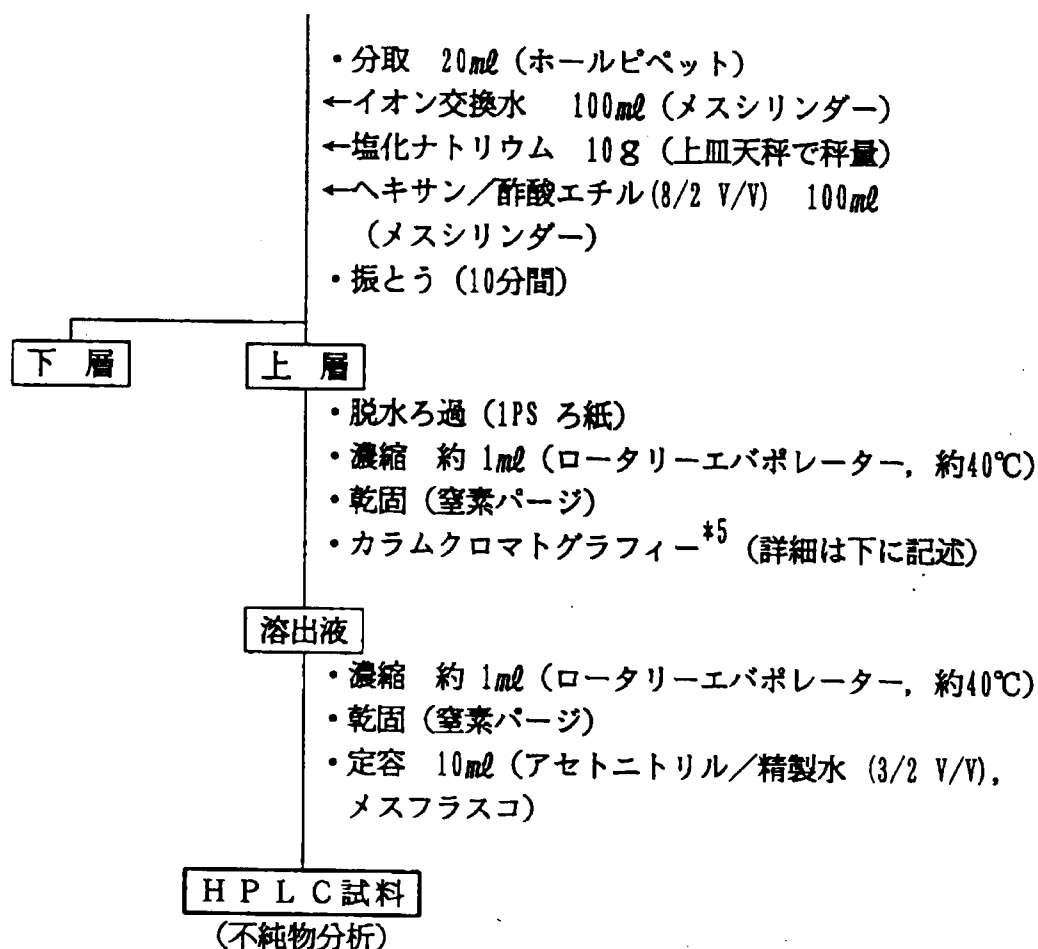
フロースキーム



フロースキーム-1



フロースキーム-2



*5 カラムクロマトグラフの条件

クロマト管 20mmφ ガラス製
充てん剤 10%含水中性アルミナ 10g
(ヘキサンで充てん)

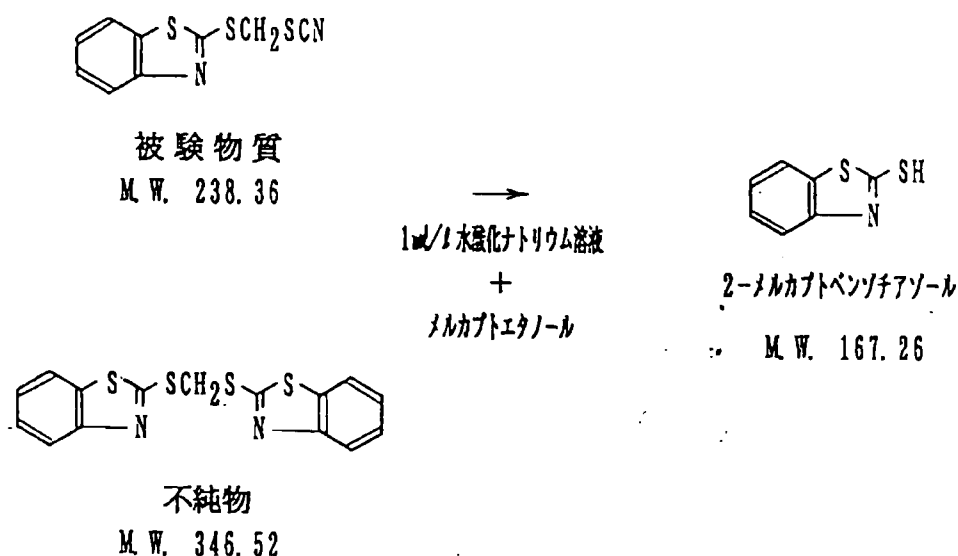
負荷法 ヘキサン10mlで負荷した。

溶出法 第1溶出液 ヘキサン/クロロホルム (9/1 V/V) 40ml
第2溶出液 ヘキサン/クロロホルム (8/2 V/V) 40ml

不純物は第2溶出液で溶出した。

12. 6. 3 定量分析

被験物質分析はアルカリ分解により生成する2-メルカプトベンゾチアゾールで行ったが、不純物も同時にアルカリ分解され、2-メルカプトベンゾチアゾールを生成する。



このため、以下の計算式を用いて供試魚中の被験物質量を算定した。

不純物より生成する2-メルカプトベンゾチアゾール

$$= \text{不純物絶対量} \times \frac{2\text{-メルカプトベンゾチアゾールの分子量} \times 2}{\text{不純物の分子量}} \times \frac{\text{回収率 (38. 6\%)}}{100}$$

被験物質より生成する2-メルカプトベンゾチアゾール

$$= \text{供試魚より生成する2-メルカプトベンゾチアゾール量} - \text{不純物より生成する2-メルカプトベンゾチアゾール量}$$

供試魚中の被験物質量

$$= \text{被験物質より生成する2-メルカプトベンゾチアゾール量} \times \frac{\text{被験物質の分子量}}{2\text{-メルカプトベンゾチアゾールの分子量}} \times \frac{100}{\text{回収率 (65. 4\%)}}$$

12. 6. 2の前処理を行って得られたHPLC試料は、以下の条件に基づき高速液体クロマトグラフィーにより定量を行った。

試験水分析における最終定容液中の被験物質濃度及び不純物濃度は、クロマトグラム上の被験物質及び不純物のピーク高さを濃度既知の標準溶液のピーク高さと比較し、比例計算して求めた（表-4, 5, 8, 9, 図-6, 9参照）。

供試魚分析における最終定容液中の2-メルカプトベンゾチアゾール濃度及び不純物濃度は、クロマトグラム上の2-メルカプトベンゾチアゾール及び不純物のピーク高さを濃度既知の標準溶液のピーク高さと比較し、比例計算して求めた（表-13, 14, 15, 18, 19, 20, 図-13, 14, 15, 18, 19, 20参照）。

また、不純物の第1濃度区の定量については、HPLC試料を適宜希釈し、直線性の確認された濃度範囲になるように不純物濃度を調製した。

(1) 分析機器の定量条件

(a) 試験水分析

①被験物質	機 器	高速液体クロマトグラフ
	カ ラ ム	Inertsil ODS-2
		25cm×4.6mmφ ステンレス製
	溶 離 液	アセトニトリル／精製水 (3/1 V/V)
	流 量	1.0 ml/min
	測 定 波 長	300 nm (図-28参照)
	注 入 量	80 μl
	感 度	
	検 出 器	0.002 ABU/FS
	記 録 計	レンジ 10 mV

②不 純 物	機 器	高速液体クロマトグラフ
	カ ラ ム	Inertsil ODS-2
		15cm×4.6mmφ ステンレス製
	溶 離 液	アセトニトリル／精製水 (95/5 V/V)
	流 量	1.0 ml/min
	測 定 波 長	300 nm (図-28参照)
	注 入 量	100 μl
	感 度	
	検 出 器	0.002 ABU/FS
	記 録 計	レンジ 5 mV

(b) 供試魚分析

① 2-メルカプトベンゾチアゾール

機 器	高速液体クロマトグラフ
カ ラ ム	Inertsil ODS-2 15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	アセトニトリル／りん酸緩衝液 ^{*6} (pH 3.0) (45/55 V/V)
流 量	1.0 ml/min
測 定 波 長	320 nm (図-29参照)
注 入 量	30 μl
感 度	
検 出 器	0.005 ABU/FS
記 録 計	レンジ 1 mV

*6 10 mmol/lりん酸—カリウム溶液をりん酸 (1+10) でpH 3.0に調整した。

② 不 純 物

機 器	高速液体クロマトグラフ
カ ラ ム	Inertsil ODS-2 15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	アセトニトリル／精製水 (9/1 V/V)
流 量	1.0 ml/min
測 定 波 長	280 nm (図-28参照)
注 入 量	80 μl
感 度	
検 出 器	0.002 ABU/FS
記 録 計	レンジ 10 mV

(2) 標準溶液の調製

(a) 試験水分析

①被験物質

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

被験物質 100.0mg (提供試料 125.8mg) を精秤し、テトラヒドロフランに溶解した1000 μ g/mlの標準原液を、さらにアセトニトリル/精製水 (3/2 V/V) で希釈して40 μ g/mlの標準溶液を調製した。

②不純物

分析試料中の不純物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。

不純物22.8mg (提供試料 125.8mg) を精秤し、テトラヒドロフランに溶解した 228 μ g/mlの標準原液を、さらにアセトニトリル/精製水 (3/2 V/V) で希釈して9.12 μ g/mlの標準溶液を調製した。

(b) 供試魚分析

①2-メルカプトベンゾチアゾール

分析試料中の2-メルカプトベンゾチアゾール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。

2-メルカプトベンゾチアゾール 100.0mgを精秤し、メタノールに溶解した1000 μ g/mlの標準原液を、さらにメタノールで希釈して60 μ g/mlの標準溶液を調製した。

②不純物

分析試料中の不純物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。

不純物22.8mg (提供試料 125.8mg) を精秤し、テトラヒドロフランに溶解した 228 μ g/mlの標準原液を、さらにアセトニトリル/精製水 (3/2 V/V) で希釈して27.4 μ g/mlの標準溶液を調製した。

(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

①被験物質

(2) (a) ①の標準溶液調製法と同様にして20、40及び80 ng/ml の標準溶液を調製し、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被験物質ピーク高さと濃度より検量線を作成した。

検量線より被験物質ピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して2 mm (被験物質濃度 1.4 ng/ml) とした(図-4参照)。

②不純物

(2) (a) ②の標準溶液調製法と同様にして4.56、9.12及び18.2 ng/ml の標準溶液を調製し、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不純物ピーク高さと濃度より検量線を作成した。

検量線より不純物ピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して2 mm (不純物濃度 0.34 ng/ml) とした(図-7参照)。

(b) 供試魚分析

①2-メルカプトベンゾチアゾール

(2) (b) ①の標準溶液調製法と同様にして30、60及び120 ng/ml の標準溶液を調製し、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2-メルカプトベンゾチアゾールピーク高さと濃度より検量線を作成した。

検量線より2-メルカプトベンゾチアゾールピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して2 mm (2-メルカプトベンゾチアゾール濃度 2.4 ng/ml) とした(図-10参照)。

②不純物

(2) (b) ②の標準溶液調製法と同様にして13.7、27.4及び54.7 ng/ml の標準溶液を調製し、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不純物ピーク高さと濃度より検量線を作成した。

検量線より不純物ピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して2 mm (不純物濃度 0.90 ng/ml) とした(図-16参照)。

12. 6. 4 回収試験及びブランク試験

(I) 方 法

前述した試験水及び供試魚分析操作における回収率を求めるため、以下の方法で回収試験を行った。

- 試験水中の被験物質及び不純物分析
回収試験用試験水に提供試料分散液を添加した。
- 供試魚中の不純物分析
魚体ホモジネートに提供試料分散液を添加した。
- 供試魚中の被験物質分析（アルカリ分解して生成する2-メルカプトベンゾチアゾールを分析）
提供試料のアセトニトリル溶液をHPLC（ODS）で分析し、被験物質と不純物を分取した。分取した各々のアセトニトリル溶液の濃度を再びHPLCで定量分析した後、このアセトニトリル溶液を回収試験の添加溶液とした。

回収試験は12. 6. 2及び12. 6. 3の操作に準じて行った。また、提供試料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、回収試験の場合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、不純物ピーク位置及び2-メルカプトベンゾチアゾール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及び不純物濃度を求める場合の補正值とした（表- 3, 7, 11, 12, 17, 図- 5, 8, 11, 12, 17参照）。

(2) 結 果

分析操作における回収率

・被験物質

試験水分析（被験物質 200 μ g添加）

89.7% , 91.4% 平均90.6%

供試魚分析（アルカリ分解して生成する2-メルカプトベンゾチア
ゾールを分析）

被験物質 10200 μ g添加 65.8% , 65.0% 平均65.4%

不 純 物 10200 μ g添加^{*7} 41.6% , 35.7% 平均38.6%

*7 不純物より生成する2-メルカプトベンゾチアゾールを求めるための
回収率。

・不 純 物

試験水分析（不純物45.6 μ g添加）

83.5% , 84.5% 平均84.0%

供試魚分析（不純物2740 μ g添加）

91.8% , 88.2% 平均90.0%

12.6.5 分析試料中の被験物質濃度の算出及び検出限界

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

表-6の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質の検出限界濃度

12.6.3 (3)の検量線作成で求めた被験物質の測定限界値より、試験水中の被験物質の検出限界濃度^{*8}はそれぞれ、

第1濃度区 0.076 ng/ml

第2濃度区 0.0076 ng/ml

と算出される。

$$*8 \text{ 被験物質検出限界濃度 (ng/ml)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上測定限界濃度 (ng/ml)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (ml)

D : 最終液量 (ml)

E : 分取比

計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字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

表-16の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の被験物質の検出限界濃度

12.6.3 (3)の検量線作成で求めた2-メルカプトベンゾチアゾールの測定限界値より、供試魚中の被験物質の検出限界濃度^{*9}は供試魚体重を30gとしたとき17ng/gと算出される。

*9 被験物質検出限界濃度 (ng/g)

$$= \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}} \times \frac{\text{被験物質の分子量}}{\text{2-メルカプトベンゾチアゾールの分子量}}$$

A : 検量線上測定限界濃度 (ng/ml)

B : 回収率 (%)

C : 供試魚体重 (g)

D : 最終液量 (ml)

E : 分取比

計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字2ケタに丸めた。

12.6.6 分析試料中の不純物濃度の算出及び検出限界

(1) 試験水分析試料中の不純物濃度の算出

表-10の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の不純物の検出限界濃度

12.6.3 (3)の検量線作成で求めた不純物の測定限界値より、試験水中の不純物の検出限界濃度^{*10}はそれぞれ、

第1濃度区 0.020 ng/ml

第2濃度区 0.0020 ng/ml

と算出される。

(3) 供試魚分析試料中の不純物濃度の算出

表-21の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の不純物の検出限界濃度

12.6.3 (3) の検量線作成で求めた不純物の測定限界値より、供試魚中の不純物の検出限界濃度^{*10} は供試魚体重を30gとしたとき3.3ng/gと算出される。

$$*10 \text{ 不純物検出限界濃度 (ng/ml又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

- A : 検量線上測定限界濃度 (ng/ml)
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 JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字2ケタに丸めた。

12.7 濃縮倍率 (BCF) の算出

表-16, 21の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて1倍以上100倍未満は有効数字2ケタ、100倍以上は有効数字3ケタに丸めて表示した。

なお、12.6.5 (4) で求めた供試魚中の被験物質検出限界濃度及び12.6.6 (4) で求めた供試魚中の不純物検出限界濃度より、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。

①被験物質

第1濃度区	14倍
第2濃度区	153倍

②不純物

第1濃度区	11倍
第2濃度区	120倍

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表-1に示す。

①被験物質

表-1-1 試験水中の被験物質濃度 (ばく露開始時からの測定値の平均値)

(単位 $\mu\text{g}/\ell$)

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第1濃度区	1.04	1.07	1.17	1.22	表-4	図-6
第2濃度区	0.0879	0.0960	0.104	0.111	表-5	

②不純物

表-1-2 試験水中の不純物濃度 (ばく露開始時からの測定値の平均値)

(単位 $\mu\text{g}/\ell$)

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第1濃度区	0.252	0.276	0.288	0.302	表-8	図-9
第2濃度区	0.0217	0.0250	0.0262	0.0276	表-9	

13.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表-2に示す。

①被験物質

表-2-1 濃 縮 倍 率

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第1濃度区	14 以下 20	14 以下 14 以下	14 以下 14 以下	14 以下 14 以下	表-13	図-13
第2濃度区	153 以下 153 以下	153 以下 153 以下	199 268	153 以下 153 以下	表-14	図-14

②不 純 物

表-2-2 濃 縮 倍 率

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第1濃度区	2360 1080	1870 1420	1670 1260	2010 1920	表-18	図-18
第2濃度区	3170 1750	2690 4240	2960 1520	1410 2090	表-19	図-19

表－２の濃縮倍率とばく露期間との相関を図－１及び図－２に示した。図－１より被験物質は、８週後には十分に平衡に達していると考えられる。

被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、濃縮倍率で第１濃度区において１４倍以下～２０倍、第２濃度区において１５３倍以下～２６８倍であった。

また、図－２より不純物は４週までの濃縮倍率で、第１濃度区において１０８０倍～２３６０倍、第２濃度区において１７５０倍～４２４０倍でわずかな差が認められる。しかし、６週以降は第１濃度区において１２６０倍～２０１０倍、第２濃度区において１４１０倍～２９６０倍と濃縮倍率はほぼ等しく、第１濃度区及び第２濃度区共に十分に平衡に達していると考えられる。

供試魚は外観観察等の結果、異常は認められなかった。

また、試験水中の平均被験物質及び不純物濃度は表－１に示されるように、被験物質で４０～６０％、不純物で５０～６５％が保持された。

13.3 考 察

試験水中の被験物質及び不純物濃度の低下について

試験期間中、試験水中の被験物質及び不純物濃度は被験物質及び不純物共に設定値の５０～６０％程度であった。空水槽（魚なし）のランニング試験を行ったところ、被験物質及び不純物は試験設定濃度の約９０％が保持された。

また、試験進行にともない、水槽中の供試魚の減少につれ、試験水中の被験物質及び不純物濃度は徐々に上昇していることから、試験水中の被験物質及び不純物濃度の低下は魚の共存による影響（魚体内への取り込み、魚体による代謝等）と考えられる。

14. 試資料の保管

14.1 被験物質

保管用被験物質約208を保管用容器に入れ密栓後、「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」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。）第32条に定める期間、当研究所試料保管室に保管する。

14.2 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、調査表、資料等は最終報告書と共に、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所資料保管室に保管する。

15. 備 考

15.1 試験に使用した機器、装置、特殊器具、試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

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

(2) 分析及び原液調製に使用した機器、装置、特殊器具、試薬

機器

・被験物質及び不純物

高速液体クロマトグラフ

ポンプ	:	日立製作所製	型	L-6000
検出器	:	日立製作所製	型	L-4000UV

・2-メルカプトベンゾチアゾール

高速液体クロマトグラフ

ポンプ	:	島津製作所製	型	LC-5A
検出器	:	島津製作所製	型	SPD-2A

装置

ロータリーエバポレーター	:	東京理化工機製 型 N-1
振とう機	:	入江商会製 TS式 大洋科学工業製 型 SR-IIW
ホモジナイザー	:	キネマチカ社製
ウォーターバス	:	東京理化工機製 型 SB-35

特殊器具

セップパック 中性アルミナ	:	日本ミリポア・リミテッド製
---------------	---	---------------

試薬

アセトン	:	和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	:	キシダ化学製	試薬特級
アセトニトリル	:	和光純薬工業製	試薬一級
アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
ヘキサン	:	和光純薬工業製	試薬一級
エタノール	:	和光純薬工業製	試薬一級
メタノール	:	和光純薬工業製	HPLC用
テトラヒドロフラン	:	和光純薬工業製	HPLC用
メルカプトエタノール	:	ナカライテスク製	
水酸化ナトリウム	:	関東化学製	試薬特級
酢酸エチル	:	関東化学製	試薬一級
塩酸	:	関東化学製	試薬一級
塩化ナトリウム	:	マナック製	試薬一級
りん酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
りん酸一カリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
HCO-40	:	日光ケミカルズ製	
中性アルミナ	:	ウェルム社製	
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
2-メルカプトベンゾチアゾール	:	東京化成工業製	

参考データ

部位別試験

不純物の供試魚への濃縮性が認められたために、魚体のいずれの部位に濃縮されているかの知見を得ることを目的とし、部位別試験を行った。

8週目の供試魚を2尾ずつ、可食部（下記の部分を除いた残部）、頭部、外皮（頭部を除く皮、うろこ、ひれ、消化管、えら）、内臓（消化管以外の臓器）に大別し各重量を測った後、分析を行った。分析法は本試験の分析法に準ずる。

部位別試験結果

		供試魚中の不純物濃度 (ng/g)		濃縮倍率	付 表	付 図
第1濃度区	可食部	215 306	(260)	713 1010	表-22	図-31
	頭 部	789 1160	(974)	2610 3840		
	外 皮	384 687	(536)	1270 2280		
	内 臓	695 1210	(952)	2300 4010		
第2濃度区	可食部	39.8 40.9	(40.4)	1440 1480	表-23	図-32
	頭 部	158 160	(159)	5740 5810		
	外 皮	44.6 83.8	(64.2)	1620 3040		
	内 臓	154 78.0	(116)	5560 2830		

() 内の数値は平均値を示す。

排泄試験

濃縮度試験において、不純物の濃縮性が認められたために、濃縮された不純物が排泄、あるいは代謝により減少する過程を調べることを目的とし、排泄試験を実施した。排泄試験は、8週間ばく露した供試魚を試験用水（不純物及び分散剤を含まない水）に移して実施した。

〈試験及び環境条件〉

試験水槽 100ℓ 容ガラス製水槽

試験水量 試験用水800ml／分の割合で1152ℓ／日を試験水槽に供した。

試験温度 25±2℃

供試魚の不純物の残留率は、次の式により算出した。

$$J \text{ (残留率) } (\%) = \frac{F_n}{C F_n} \times 100$$

F_n : 排泄開始後n日の供試魚中の不純物濃度

$C F_n$: ばく露終了後（8週）の供試魚中の不純物濃度の平均値

供試魚中の不純物の残留率は、有効数字3ケタに丸めて表示した。なお、数値の丸め方は JIS Z 8401-1961の方法に従った。

残 留 率

(単位 %)

	1日後	3日後	7日後	付 表	付 図
第1濃度区	104 45.6 (74.8)	61.4 25.3 (43.4)	10.4 4.07 (7.24)	表-24	図-33
第2濃度区	65.1 55.0 (60.0)	33.1 39.5 (36.3)	32.5 19.2 (25.8)	表-25	図-34

() 内の数値は平均値を示す。

この結果、供試魚中の半減期は、第1濃度区において2.2日後、第2濃度区において4日後であった（図-35参照）。