

最 終 報 告 書

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) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 51231IV)

化学物質評価研究機構
残留米事業所

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 経済産業省

試験の表題 *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）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51231IV

上記試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設に関する基準」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）に従って実施したものです。

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2001 年 2 月 22 日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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 経済産業省

試験の表題 *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）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51231IV

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2000年11月24日	2000年11月28日	2000年11月28日
	2000年12月21日	2000年12月22日	2000年12月22日
	2001年1月31日	2001年1月31日	2001年1月31日
試験実施状況	2000年11月28日	2000年12月11日	2000年12月12日
	2000年12月6日	2000年12月11日	2000年12月12日
	2000年12月7日	2000年12月11日	2000年12月12日
	2000年12月8日	2000年12月22日	2000年12月26日
	2000年12月13日	2000年12月22日	2000年12月26日
	2000年12月21日	2000年12月22日	2000年12月26日
	2001年1月22日	2001年1月23日	2001年1月25日
生データ及び最終報告書	2001年2月20日	2001年2月20日	2001年2月20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。

2001年2月20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 G L P	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. 急性毒性試験	6
3. 濃縮度試験の実施	8
4. 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	22
5. 試験結果	22
6. 参考試験	25
7. 考 察	26
8. 備 考	27

表 題	<i>N,N</i> -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）のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	経済産業省 （〒100-8901）東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
試験施設	財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所 （〒830-0023）福岡県久留米市中央町 19-14
試験目的	K-1231のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
試験法	「新規化学物質等に係る試験の方法について」（環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号、昭和49年7月13日、平成10年10月8日改正）に規定する〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)”に準拠した。
適用GLP	(1) 化学物質GLP 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設に関する基準」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正）を適用した。 (2) OECD-GLP 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）を適用した。

試験日程

試験開始日	2000年11月24日
実験開始日	2000年12月 7日
実験終了日	2001年 2月 1日
試験終了日	2001年 2月16日

試験資料の保管

(1) 被験物質

同一ロットの被験物質が分解度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。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、指示書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、久留米事業所資料保管室に保管する。

試験関係者

試験責任者

所属 試験第一課

試験担当者
(濃縮度試験の実施)

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

最終報告書の承認

2001年2月16日

試験責任者

要 約

試験の表題

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）のコイにおける濃縮度試験

試験条件

急性毒性試験

- | | |
|-----------|------------------|
| (1) 供 試 魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 96時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式（8～16時間毎に換水） |

濃縮度試験

- | | |
|-----------|----------------------|
| (1) 供 試 魚 | コイ |
| (2) 試験濃度 | 第6濃度区 0.01μg/l. |
| (3) ばく露期間 | 42日間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分析方法 | 高速液体クロマトグラフィー—質量分析法 |

試験結果

- | | |
|------------------|------------------|
| (1) 96時間LC50値 | > 250mg/L |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第6濃度区 6000倍 |
| (3) 排泄半減期 | 第6濃度区 6.1日 |

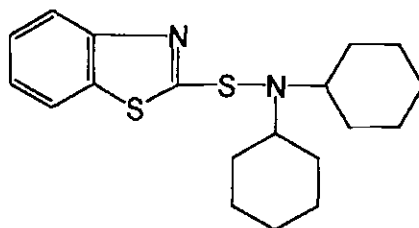
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1231は、次の名称等を有するものとする。

1.1 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

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{19}H_{26}N_2S_2$

分子量 346.55

1.3 提供者、商品名及びロット番号*1

(1) 提 供 者

(2) 商 品 名

(3) ロット番号 407012

*1 提供者添付資料による。

1.4 純 度*1

(1) 被 験 物 質 99%以上 (HPLC法)

(2) 不 純 物 2, 2'-ジベンゾチアゾリルジスルフィド

被験物質は純度100%として取り扱った。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 14参照)、質量スペクトル (Fig. 15参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 16参照) 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

(1) 保管条件 冷蔵保存

(2) 安定性確認 実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 14参照)。

1.7 試験条件下での安定性

実験開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

2. 急性毒性試験

2.1 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。

2.2 供試魚

- | | | |
|---------|---|---|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| | | 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 |
| | | 中島養魚場
(住所 〒 869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029) |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | | 件 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、蓄養槽で薬浴後、流水状態で30日間飼育した。 |
| (4) じゅん | 化 | 条 |
| | | 件 |
| | | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し薬浴した後、じゅん化を行った。その間異常のあるものは除去し、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の水温の流水状態で19日間飼育した。その後、再度選別及び薬浴を実施した後、流水状態で31日間飼育した。 |
| (5) 体 | 重 | 平均 0.19g |
| (6) 全 | 長 | 平均 2.8 cm |
| (7) 感 | 受 | 性 |
| | | 試 |
| | | 験 |
| | | 同一ロット (TF0-001002) 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0.704mg/Lであった。 |

2.3 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

久留米事業所にて2000年8月8日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 1に示す（測定頻度1回/6ヶ月）。各項目の測定又は分析値は「水道法に基づく水質基準」（平成4年12月21日改正 厚生省令第69号），「水産用水基準」（社団法人 日本水産資源保護協会 昭和58年3月），「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)"，「水質汚濁に係る環境基準」（平成11年2月22日改正 環境庁告示第14号）又は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Bioconcentration: Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"に記載されている濃度以下であることを確認した。

2.4 試験条件

- | | | |
|------------|-----------------------|-------------|
| (1) 試験水槽 | 円形ガラス製水槽 | |
| (2) 試験液量 | 4L/濃度区 | |
| (3) 試験温度 | ばく露開始時 | 24.5℃ |
| | 換水前 | 24.3℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 | 7.8～7.9mg/L |
| | 換水前 | 8.0mg/L |
| (5) pH | ばく露開始時 | 7.8 |
| | 換水前 | 8.0 |
| (6) 供試魚数 | 10尾/濃度区 | |
| (7) ばく露期間 | 96時間 | |
| (8) ばく露方法 | 半止水式（8～16時間毎に換水） | |
| (9) ばっ気 | 試験期間中連続してエアレーションを行った。 | |

2.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-20

オリーブ油

(2) 調製方法

被験物質とその20倍量のHCO-20と20倍量のオリーブ油をアセトンに溶解しアセトンを留去した後、イオン交換水に溶解して被験物質濃度として500mg/Lの原液を調製した。

2.6 試験の実施

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | 214LC50室 |
| (2) 試験実施日 | 2000年11月27日 ～ 2000年12月 1日 |

2.7 96時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

2.8 試験結果

被験物質の96時間LC50値 >250mg/L*2 (Fig. 2参照)

*2 この際の使用した分散剤（HCO-20及びオリーブ油）の濃度は、5000mg/Lとなり、その分散剤の96時間LC50値が>50000mg/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。

3. 濃縮度試験の実施

3.1 供試魚

- | | | |
|------------|---|--|
| (1) 魚 | 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| | | 選択理由：過去の知見との整合性を考慮するため及び大きさが扱い易いため。 |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 杉島養魚場 |
| | | (住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2) |
| | | 供試魚受入日 2000年 9月20日 |
| (3) 蓄 | 養 | 条 件 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、受入槽で薬浴後、流水状態で19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。その間異常のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で27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27日間飼育した。 |
| (5) 全 | 長 | 7.3~9.1cm |
| (6) ロ | ッ | ト |
| | | TFC-000920 |
| (7) 年 | 齢 | 当才魚 |
| (8) 餌 | 料 | |
| 種 | 類 | コイ稚魚育成用配合飼料 |
| 組 | 成 | たん白質含量 43.0%以上 |
| | | 脂 質 含 量 3.0%以上 |
| 製 | 造 | 元 |
| | | 日本配合飼料株式会社 |
| 給 | 餌 | 方 法 |
| | | 供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。ただし、供試魚の採取前24時間は給餌を止めた。 |

3.2 試験用水

2.3に同じ。

3.3 試験及び環境条件

- | | |
|-------------|--|
| (1) 試験水供給方法 | 久留米事業所組立流水式装置を用いて供給した。 |
| (2) 試験水槽 | 100L容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | 原液2mL/分及び試験用水1600mL/分の割合で2307L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 原液タンク | 25L容ガラス製びん
交換頻度 1～2回程度/週 |
| (5) 試験温度 | 第6濃度区 25.0～25.3℃
対照区 25.0～25.5℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第6濃度区 7.7～8.1mg/L (Fig.12参照)
対照区 8.0～8.2mg/L (Fig.13参照) |
| (7) pH | 第6濃度区 7.7～8.0
対照区 7.7～8.0 |
| (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6濃度区 60尾 (ばく露開始時)
対照区 8尾 (ばく露開始時) |
| (10) ばく露期間 | 42日間
設定理由: 予備試験の結果、28日間では定常状態に達しないと予想されたため。 |
| (11) 排泄期間 | 13日間 |
| (12) 実施場所 | 213アクアトロン室 |

3.4 原液調製法

(1) 分散剤

2.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第6濃度区

2.5の(2)と同様にして調製した被験物質溶液をイオン交換水で希釈し、被験物質濃度として8μg/Lの原液を調製した。

・対照区

HC0-20及びオリーブ油をアセトンに溶解しアセトンを留去した後、イオン交換水に溶解してHC0-20及びオリーブ油の各濃度が160μg/Lの原液を調製した。

3.5 試験濃度

96時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

第6濃度区 0.01 μ g/L

に被験物質濃度を設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

3.6 観察、測定及び清掃

- | | |
|------------|------------------------------------|
| (1) 供試魚の観察 | 供試魚の健康状態等を1日に2回目視観察した。 |
| (2) 試験水量 | メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。 |
| (3) 試験温度 | アルコール温度計を用いて1日に1回測定記録した。 |
| (4) 溶存酸素濃度 | 溶存酸素計を用いて1週間に2回測定記録した。 |
| (5) pH測定 | pH計を用いて1週間に1回以上測定記録した。 |
| (6) 清掃 | 実験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。 |

3.7 試験水及び供試魚の分析

試験水及び供試魚中の被験物質分析は高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) により行った。

3.7.1 分析回数

(1) 試験水

試験水分析は第6濃度区のばく露期間中、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6濃度区のばく露期間中に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。

また、濃縮倍率が1000倍を超えたため、排泄試験を行った。供試魚分析は排泄期間中に4回行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)に分けて行った。6日後については6尾採取し、3群(2尾1群)に分けて行った。

対照区は実験開始前及び終了後に行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)に分けて分析した。

*3 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。

3.7.2 分析試料の前処理

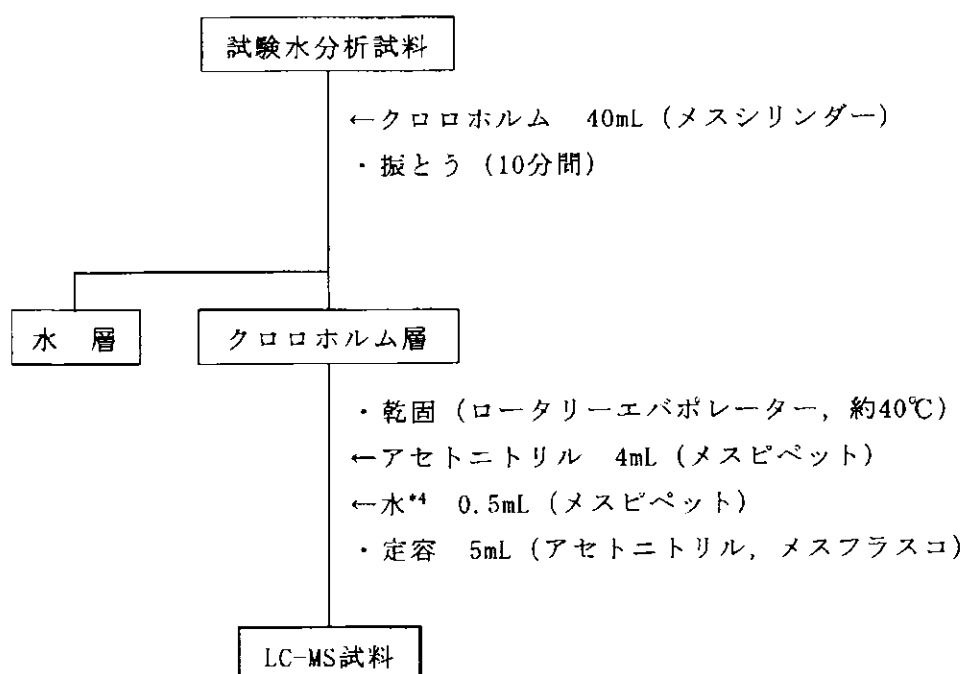
(1) 試験水中の被験物質

試験水槽から

第6濃度区 500mL

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

フロースキーム

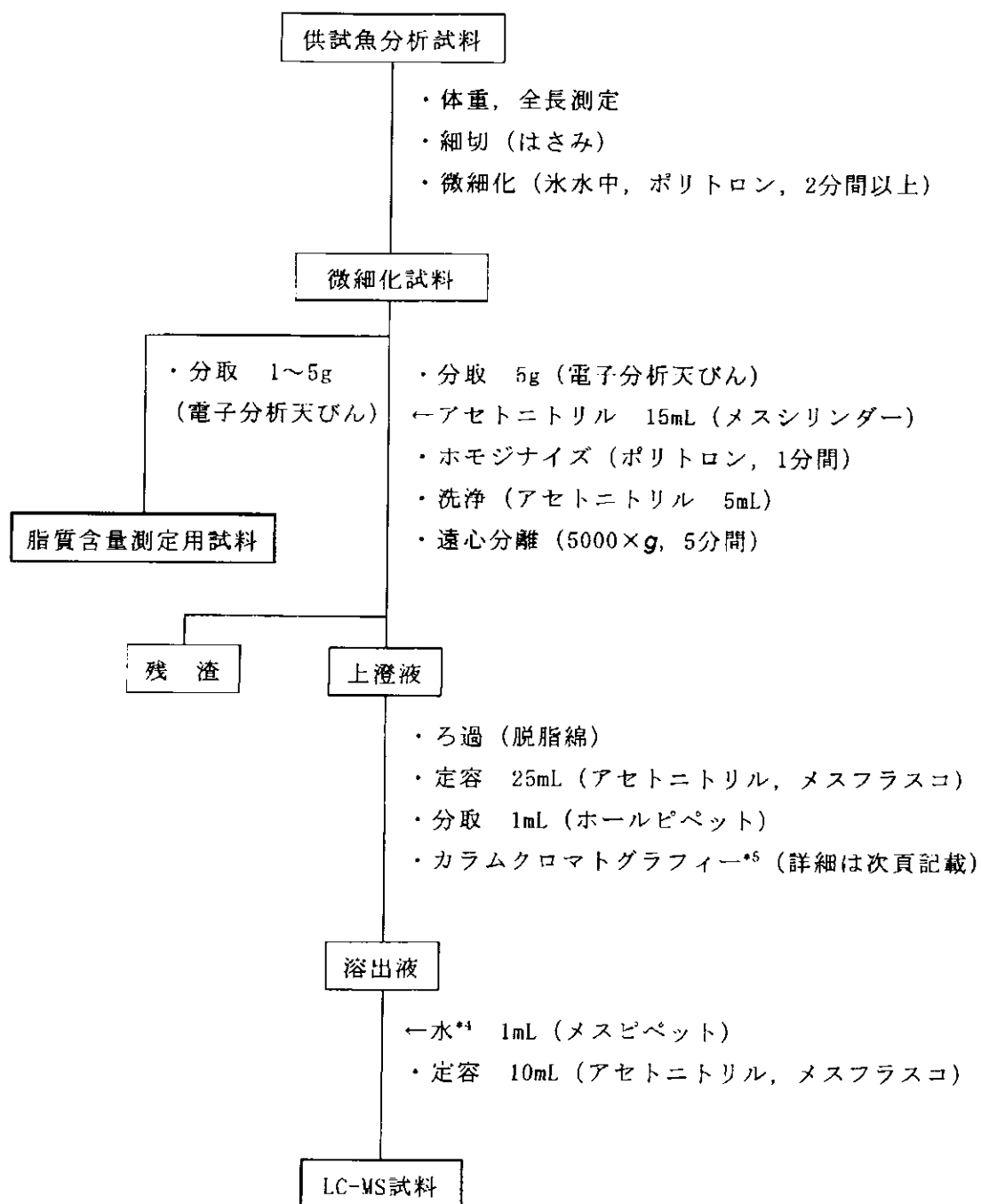


*4 水道水を超純水製造システムを用いて処理した水。

(2) 供試魚中の被験物質

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料とした。

フロースキーム



*5 カラムクロマトグラフの条件

セップパック 塩基性アルミナ

(洗浄法 : アセトニトリル 10mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 溶出液 アセトニトリル 5mL

負荷分及び溶出液を分析に供した。

3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたLC-MS試料について、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー質量分析法により被験物質を分析した。LC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS試料のマスキ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 (Table-7、Fig. 5、Table-9、10、Fig. 7、8、Table-11、Fig. 9参照)。

(1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフー質量分析計
高速液体クロマトグラフ	ウォーターズ社製 2690
質量分析計	ウォーターズ社製 ZMD

高速液体クロマトグラフ条件

カラム	Eclipse XDB-C18
	15cm×3.0mm I. D. ステンレス製
カラム温度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル
流 量	0.5mL/min
注 入 量	100μL

質量分析計条件

イオン化法	APCI
検出イオン	正イオン
コーン電圧	35V
イオン源温度	150℃
プローブ温度	500℃
測定イオン	m/z 347

(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/水⁴ (9/1 V/V) で希釈して1.00 μ g/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0.500、1.00及び2.00 μ g/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスキ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300 (被験物質濃度0.045 μ g/L) とした (Fig. 3参照)。

3.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

3.7.2の試験水及び供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、回収試験用試験水及び細切した魚（10g）に被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない回収試験用試験水及び細切した魚について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について測定した。

(2) 結 果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてマスキロマトグラム上、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-6, 8、Fig. 4, 6参照）。

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質5ng添加）

95.7%, 94.8% 平均 95.3%

供試魚分析（被験物質500ng添加）

92.8%, 87.3% 平均 90.1%

3.7.5 供試魚中の脂質含量

第6濃度区及び対照区の供試魚微細化試料の脂質含量測定用試料（3.7.2(2)参照）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。

3.7.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-7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

3.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の定量下限濃度*6は、

第6濃度区 0.00047μg/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-9, 10及び11の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

3.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の定量下限濃度*6は供試魚微細化試料を5gとしたとき2.5ng/gと算出される。

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

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。

3.7.7 ばく露期間における試験水の全平均被験物質濃度の算出法

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

$\overline{C_{wt}}$: 試験水の全平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

n : 試験水分析の数 (測定回数)

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

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

3.7.8 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 ($\mu\text{g/L}$)

$C_w(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析 n 回目の被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

(2) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

BCF : 濃縮倍率

C_f : 供試魚中被験物質濃度 (ng/g)

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

(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 (個体数又は群数2(a, b))

$BCF_{a, b}$: m 回目におけるそれぞれの濃縮倍率

n : m 回目に分析した個体数又は群数

3.7.9 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。（濃縮倍率が100倍未満の場合、濃縮倍率の変動が20%を超えても28日後には定常状態に達しているとみなす。）

定常状態に達したことの判定基準： $V(m-2)$, $V(m-1)$, $V(m) \leq 20$ (%)

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

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

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

$V(m-2)$, $V(m-1)$, $V(m)$: 濃縮倍率の変動(%)

$BCF(m-2)$, $BCF(m-1)$, $BCF(m)$: $m-2$, $m-1$, m 回目における個体数又は群数 n の濃縮倍率の平均値

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

3.7.10 定常状態における濃縮倍率 (BCF_{ss}) の算出法

定常状態における濃縮倍率 (BCF_{ss}) は、次の式により算出した。

(1) 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

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

\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) (μg/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 (μg/L)

(2) 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度の算出

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

\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け (ブランク) 濃度の平均値 (ng/g)

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

\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平均被験物質濃度 (μg/L)

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

3.7.11 算出可能な濃縮倍率

3.7.6(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を越えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。ただし、試験水中の被験物質濃度はすべての試験水分析における平均被験物質濃度を用いた。

第6濃度区 270倍

3.7.12 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)

3.8 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。

4. 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。

5. 試験結果

5.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度はTable-1に示されるように、設定値の90%以上が保持された。また、被験物質濃度の変動は測定値の平均に対して±20%以内に保たれた。

Table-1 試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	1日後	14日後	21日後	29日後	35日後	42日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
6	0.00910	0.00981	0.00912	0.00902	0.00928	0.00914	0.00925 (0.000291)	7	5

5.2 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に示した。ばく露期間中の濃縮倍率は第6濃度区において2800倍～7700倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	14日後	21日後	29日後	35日後	42日後	Table	Fig.
6	3800 5400 (4600)	3000 2800 (2900)	6800 5100 (6000)	4600 6800 (5700)	4900 7700 (6300)	9	7

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、29、35及び42日後における濃縮倍率（平均）はその3回の分析における濃縮倍率の平均値に対して変動が20%以内であったため、定常状態に達していると判断した。それらの結果を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

(1) 定常状態における試験水中の被験物質濃度

定常状態における試験水中の平均被験物質濃度はTable-3に示されるように、第6濃度区において設定値の92%であった。

Table-3 定常状態における試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	29日後	35日後	42日後	平均	Table	Fig.
6	0.00902	0.00928	0.00914	0.00915	7, 9	5

(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6濃度区 6000倍

5.4 排泄試験

43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の平均被験物質濃度を100として、排泄試験開始3、6、10及び13日後の供試魚中被験物質の残留率(%)を算出し、Table-4に示した（Table-11、Fig. 9参照）。

また、排泄試験における残留率と排泄期間との相関をFig. 10に示した。

これらの結果から、排泄半減期は第6濃度区で6.1日であった。

Table-4 排泄試験における残留率 (単位 %)

濃度区	3日後	6日後	10日後	13日後	Table	Fig.
6	73 87	19 75 40	44 41	19 19	11	9

5.5 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	2.58%
実験終了後	2.10%

5.6 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

6. 参 考 試 験

6.1 試験目的

被験物質の供試魚の各部位への濃縮性の程度の知見を得る。

6.2 部位別試験

6.2.1 試験方法

第6濃度区は、ばく露開始43日後の供試魚を外皮（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）の部位に大別した。各部位別試料を3.7に従って分析し、各部位への濃縮倍率を算出した。

6.2.2 試験結果

Table-12の計算式に従って計算し、計算結果は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。

試験結果をTable-5に示した。

Table-5 部位別試験における濃縮倍率

濃度区	部 位	被験物質濃度 (ng/g)	濃縮倍率	Table	Fig.
6	外 皮	58.3	6400	12	11
		55.6	6100		
	頭 部	106	12000		
		96.9	11000		
	内 臓	160	18000		
		152	17000		
	可食部	52.5	5700		
		48.2	5300		

7. 考 察

(1) 濃縮倍率について

試験番号 51231Ⅲ（第5濃度区：試験設定濃度 $0.1\mu\text{g/L}$ ）の濃縮倍率は、3380倍～7310倍であり、本試験における第6濃度区と比べて濃度依存性は認められなかった（Table-2参照）。従って、本試験設定濃度 $0.01\mu\text{g/L}$ においてほぼ平衡に達したと考えられる。

(2) 排泄試験について

排泄試験における排泄半減期は、5.4に示したように6.1日であり、被験物質の排泄速度についても第5濃度区（排泄半減期9.0日）との違いは見られなかった。

(3) 部位別試験について

本試験において、濃縮倍率が1000倍を越えたため部位別試験を実施した。結果としてTable-5に示したように、被験物質の各部位における濃縮倍率は外皮及び可食部に比べて、頭部及び内臓が高かった。

8. 備 考

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	: 東京理化器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	: 飯島電子工業製	型 F-102
pH計	: 東亜電波工業製	型 HM-14P

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器、特殊器具及び試薬

装置・機器

高速液体クロマトグラフィー質量分析計

: 14頁参照

天びん	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	島津製作所製	型 AEX-200B
	メトラー社製	型 AE163
	ザルトリウス社製	型 1404MP8
	エー・アンド・ディ社製	型 FA-2000

ロータリーエバポレーター	: 東京理化器械製	型 N
	ヤマト科学製	型 RE50
振とう機	: タイテック製	型 SR-2W
ホモジナイザー（ポリトロン）	: キネマチカ社製	型 PT3100
遠心分離機	: 久保田製作所製	型 6900

特殊器具

セップバック 塩基性アルミナ : 日本ウォーターズ製

試薬

アセトニトリル	: 和光純薬工業製	HPLC用
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
HCO-20	: 日光ケミカルズ製	
オリーブ油	: 和光純薬工業製	

(3) 脂質含量測定に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

天びん	: メトラー社製	型 AE163
ロータリーエバポレーター	: 東京理化器械製	型 N-1
	東京理化器械製	型 N
ホモジナイザー (オートセルマスター)		
	: 井内盛栄堂製	型 CM-200
真空ポンプ	: 真空機工製	型 DA-20D
	真空機工製	型 DAH-20C
真空デシケータ	: 井内盛栄堂製	型 VL

試薬

精製水	: 高杉製薬製	日本薬局方
メタノール	: 和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	: キシダ化学製	試薬特級
硫酸ナトリウム (無水)	: 片山化学工業製	試薬一級

(4) 被験物質の構造確認に使用した装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	: 島津製作所製	型 FTIR-8200PC
ガスクロマトグラフィー質量分析計		
	: 日本電子製	型 DX303
超電導フーリエ変換核磁気共鳴装置		
	: 日立製作所製	型 R-3000