

IX. 動植物及び土壌等における代謝分解

〈代謝分解試験一覧表〉

資料 No.	試験の種類	供試動物等	投与方法 処理法	試験結果概要	実験場所 (報告年)	記載 頁
M1	動物体内 における 代謝 (吸収・排 泄・代謝)	SD系 雄ラッ ト	経口(強制) 25 mg/kg	吸収・排泄試験:ラット体内でDCIPは消化管に比較的速やかに吸収され、同時に速やかに消失した。投与10時間以内に投与量の99%以上が全組織中より消失すると推定され、消化管以外の臓器・組織では腹腔内脂肪で最も多くDCIPが検出された。		195
		酵素		S-9及びS-9Mixとの反応:S-9Mixとの反応において、DCIPの消失に伴い が検出された。		
		酵素		S-9存在下での との反応:DCIPが 及び あるいは として代謝排泄される可能性は低い。		
		SD系 雄ラッ ト	経口(強制) 125 mg/kg	血液、尿及び呼気中の推定代謝物の定量:血液及び尿中に が検出された。 呼気中には更に が わずかながら検出された。		
M2	動物体内 における 運命(臓器 内分布)	SD系 ラット	経口(混餌、 78週間) 0, 80, 400 2000, 1000 ppm	DCIPは脂肪親和性が高いが に比べるとDCIPの蓄積性は極めて小さいものと考えられる。		199
M3	動物体内 における 代謝	SD系 ラット	経口(強制) ・10 mg/kg (単回もし くは15回 投与) ・100 mg/kg (単回)	DCIPは動物体内に速やか、かつほぼ完全に吸収された。その後、尿中(59~65%)及び呼気中(主にCO ₂ 、27~35%)に排泄された。 C _{max} は10 mg/kg投与の雌雄で各々2.04、2.68 µg/mL、100 mg/kg投与の雌雄で各々16.1、15.9 µg/mLであり、T _{max} は10、100 mg/kg、雌雄ともに2時間、T _{1/2} (α相)は10 mg/kg投与の雌雄で各々11.75、10.13時間、100 mg/kg投与の雌雄で各々25.02、32.09時間であった。AUC ₂₊₁₀ は10 mg/kg投与の雌雄で各々60.8、75.2 µg×時間/mL、100 mg/kg投与の雌雄で各々753、904 µg×時間/mLであった。 胆汁中排泄は、投与量の17.2%であった。 DCIPは脂肪親和性が高かった。 尿中の主要代謝物としては、DCIPの になった であった。		200

・網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

資料 No.	試験の種類	供試動物等	投与方法 処理法	試験結果概要	実験場所 (報告年)	記載 頁
M4	植物体内 における 代謝	ハクサイ	ネマモール乳 剤 土壌灌注処理 (1000 ppm)	DCIP は速やかに代謝消失し を生成するが、さらに代謝・分解されてしま うと考えられる。		206
M5	植物体内 における 代謝	ハクサイ	土耕栽培: 2.4 mg/cm ² 水耕栽培: 50 mg/L	ハクサイに吸収された DCIP は比較的速 やかに分解され、その主要代謝物は であり、土耕栽培では処理 96 時間後に植物体放射能の 、 水耕栽培連続暴露では 13 日後に植物体 放射能の であった。		207
M12	植物体内 における 代謝	トマト	¹⁴ C-標識 DCIP に よる 80 %乳剤 土壌灌注 4.79 mL/m ²	トマトに吸収された DCIP は果実及び葉 では植え付け 41 日後に最大となり、82 日後には著しく減少(果実では 1 割強、 葉では約半分)した。82 日後では果実、 葉ともに DCIP は検出委されず、主な代 謝物として が 検出された。 は分子重 で と等しく、 は であり、 は と想定されたがマススペクトル による構造決定は出来なかった。また、 水溶性のポリサッカライド、ヘミセロ ース及びリグニンを含む天然物と結合 していることから、より広範な代謝が 起こっていると考えられた。		209
M13	植物体内 における 代謝	かんきつ	¹⁴ C-標識 DCIP に よる 80 %乳剤 土壌散布 5.21 mL/m ²	DCIP は植物に吸収され、時間の経 過に伴い果実および葉の放射能が 増加した。土壌および大気中の放射 能は処理後速やかに減少した。主な 代謝物は および で、 は は の代謝物と推 定された。		217
M14	植物体内 における 代謝	トマト (葉)	¹⁴ C-標識 DCIP 土壌灌注 4.79 mL/m ²	¹⁴ C-DCIP 処理土壌移植 82 日後のトマト 葉試料に存在する代謝物 及び の同定を試みた。 により変化したことから、と もに であることが示 唆された。また、 の結果から、 は を含む、より複合した と考えられた。		227

・網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

資料No.	試験の種類	供試動植物等	投与方法 処理法	試験結果概要	実験場所 (報告年)	記載 頁
M6	土壌における運命	火山灰土 (壤土) 湖成沖積土 (砂壤土)	消長の調査: 土壌 100~150 g 当り DCIP 10 mg 分解:土壌 10 g 当り DCIP 500 mg	土壌中の DCIP は比較的速やかに、気中に蒸散した。滅菌と非滅菌土壌の間に差はなく、DCIP の減少は砂壤土の方が速かった。		231
M7	土壌における運命	火山灰土 壤 砂壤土	乾燥土壌 1 g 当り DCIP 1 mg (嫌氣的試験のみ 0.5 mg)	土壌からの DCIP 消失の主要ルートは蒸散であり、さらに一部土壌に残留したものはゆっくりと無機物化して CO ₂ になると考えられる。		234
13	加水分解	Clark-Lubs の緩衝液	pH5, 7, 9 DCIP 5 ppm 試験開始直後、 31, 60, 122, 151, 180 日後の 分解度	pH5, 7, 9 のいずれの条件においても安定		237
14	水中光分解	蒸留水 自然水(荒 川水系秋ヶ 瀬取水口)	DCIP 4 ppm 光 25.5 W/m ² 25 °C 滅菌(蒸留水)、 未滅菌(自然 水) 試験直後、1, 2, 3, 4, 7 日後に 試料を採取し、 分解度を検討。	自然水では分解は生じない。 蒸留水の推定半減期は約 38 日と計算されたが、実験誤差による測定値の変動を濃度減少と捉えて計算されたものと考えられ、水中光分解性はないと考えられる。 自然水、蒸留水とも暗条件では分解しなかった。		239
12	土壌吸着	福島県農 試、愛知県 農総試、熊 本試験地、 宮崎試験農 場の 4 土壌	土壌吸着係数 試験濃度: 5.00, 1.00, 0.20, 0.04 ppm 平衡化時間: 3 時間	土壌吸着係数 (K _f ^{ads}) (25 °C) 福島畑土壌 28.58 愛知畑土壌 7.082 熊本畑土壌 35.51 宮崎畑土壌 30.78		242

・網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

<代謝物一覧>

記号	由来	名称 (略号)	化学名	構造式
I	親化合物	DCIP	bis(2-chloro-1-methylethyl) ether	$\text{Cl}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{Cl}$

*記号は、代謝・分解経路図に対応するものとする。

1. 動物代謝

(I) DCIP のラットにおける代謝試験

(資料 M1)

試験機関：

報告書作成年：

供試化合物：DCIP

供試動物：SD系雄ラット（体重200g前後）

試験方法：i) 吸収・排泄試験

DCIPをオリーブ油に溶解して1.25%としラット体重200g当り0.4mL(25mg/kg)を、金属製経口用ゾンデで1回強制経口投与した。

投与直後及び投与後0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48および72時間のラットを開腹し、採血した後各臓器を採取した。

尿・糞を上記とほぼ同時に採取し、定量した。

代謝ケージをトラップ容器に接続し呼気中のDCIPを2時間毎に溶解捕捉回収し定量した。

ii) S-9' および S-9Mix との反応

S-9Mix 0.5 ml, 1000 ppm の DCIP 水溶液 0.5 ml および 250 mM-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3.0 mL の混合液を調製し、この混合液の対照として S-9Mix の代わりに S-9' にしたものを用いた。同様に S-9Mix 4 ml に DCIP 水溶液 0.5 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml の混合液を調製、この S-9Mix の代わりに S-9' のものを用意した。これら 4 種の混合液をそれぞれ共栓付き試験管に入れ 37 °C、20 分間インキュベーションを行ない、反応を止めたのち親化合物および

の代謝物を定量した。

(註) S-9' : 肝ホモゲネートの 9000 g 遠心上清 (S-9) に、0.4M MgCl₂、1.65 M KCl、1 M G-6P、1 M G-6PD、250 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を一定の割合で加えた液。

S-9Mix : S-9' に NADPH を添加した液。

iii) S-9 存在下での 及び との反応

S-9、DCIP、 およびリン酸緩衝液の混合液と S-9、DCIP、

およびリン酸緩衝液の混合液を調製し、37 °C、40 分間インキュベーションしたのち、反応を停止させ親化合物を定量した。

iv) 血液、尿および呼気中の推定代謝物の定量

供試化合物を 125 mg/kg で 1 回経口投与し、投与 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, および 12 時間後に血液を採取する。また尿については投与後 24 時間中の尿および酵素処理した尿について

について定量した。

呼気については、投与後 9 時間までのトラップしたトルエン溶液中の上記 代謝物について定量した。

尿中の および を確認するため塩酸処理して代謝物を定量した。尚、血液中の についても定量した。

試験結果: i) 吸収・排泄試験

DCIP は消化管より投与の 1 時間後迄に投与量の 50 % が、3.5 時間後迄には 90 % 以上が吸収されると推定された。

各臓器組織における最大検出量は投与約 1 時間後にみられ、その数値は以下のごとくであった。

臓器及び組織	最大検出量 (ppm) 【投与約 1 時間後】
腹腔内脂肪	31.40
肝	3.18
腎	2.37
血液	0.90
消化管	102.30
残部体	3.40

また、血液中 DCIP 濃度の経時変化は下表の様であった。

時間 (hr)	0	0.5	1	2	4	8	12	48
DCIP 濃度 (ppm)	<0.05	0.37	0.90	0.52	0.26	0.05	<0.02	検出されず

最大濃度検出時 (投与約 1 時間後) に消化管を除く各臓器、組織の検出量の総和は、投与量の約 10 % であった。

ラットへの投与後 10 時間以内に DCIP は投与量の 99 % 以上が全身組織中から消失すると推定された。

呼気、尿および糞からの未変化 DCIP の排出は極く僅かであり、最大検出量とその時間は次表の様であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

排出経路	最大濃度検出時 【投与後の経過時間】	最大検出量 (ppm)
尿	0 ~ 3	0.06
糞	3 ~ 6	0.01
呼気	0 ~ 2	0.047

ii) S-9* および S-9Mix との反応

S-9 使用による in vitro の試験で、DCIP の消失に伴い

が以下の表の如く

検出された。

推定代謝物 反応条件	DCIP
S-9* 0.5 mL	71 μ g/mL
S-9 Mix 0.5	41
S-9* 4.0	56
S-9 Mix 4.0	13

ND: 検出されなかったことを示す。

以上の代謝物はさらに分解されて水、二酸化炭素などの単純な物質として排出されるものと考えられる。

iii) S-9 存在下での 及び との反応試験の結果は下表に示した。

反 応 条 件			DCIP 検出量 (μ g)	回収率 (%)
S-9 (mL)	DCIP (mL)	(mL)		
1.5	0.5	-	447.4	89.5
-	0.5	0.5	434.2	86.9
1.5	0.5	0.5	432.2	86.4
10.0	0.5	-	395.1	79.0
10.0	0.5	0.5	375.7	75.1
10.0	0.25	0.25	369.9*	73.8

(但し、*は DCIP 0.5 mL 添加としての換算値)

反 応 条 件			DCIP 検出量 (μ g)	回収率 (%)
S-9 (mL)	DCIP (mL)	(mL)		
1.5	0.5	-	440.5	88.1
-	0.5	0.5	429.7	85.9
1.5	0.5	0.5	422.7	84.5
5.0	0.25	-	232.5	93.0
-	0.25	0.25	238.5	95.4
5.0	0.25	0.25	222.2	88.9
5.0	0.15	-	258.2*	86.1
-	0.15	0.15	280.0*	93.6
5.0	0.15	0.15	279.1*	93.1

(但し、* は DCIP 0.25 mL 添加としての換算値)

以上の如く DCIP の あるいは として代謝排出される可能性は少ない。

iv) 血液、尿および呼気中の推定代謝物の測定
血液中での代謝物の定量結果の概要は以下の表に示した。

代 謝 物	投与 1 時間	2 ないし 4 時間	8 時間	12 時間

ND : 検出されなかったことを示す。

投与から 24 時間後までの採尿中には および が検出限界 付近で検出され、また酵素処理尿ではそれぞれ 検出された。一方、 は検出されなかった。

呼気中には上記 代謝物は極く僅かではあるが検出され、微量であるが も検出された。

これらの推定代謝物がさらに二次代謝を受けている可能性があるため 1.5 mg の をオリーブ油に溶解してラットに経口投与した。投与後 24 時間目までの尿、また、その酵素処理尿及び塩酸処理尿について、分析を行ったが、それらは検出されなかった。

また、血液中で投与 4 時間後に最大 の が検出され、12 時間後には対照とほぼ同様なレベル となった。

(2) DCIP のラットにおける臓器内分布

(資料 M2)

試験機関：

報告書作成年：

資料 5-2 のラット慢性毒性試験における 78 週目のラットを用いて臓器内分布を検討した。

供試化合物：DCIP

供試動物：SD 系ラット 雄及び雌

試験方法：慢性毒性試験における 78 週の定期解剖時に 0, 80, 400, 2000, 10000 ppm 濃度群の血液、腹腔内脂肪、肝、腎を雌雄各 5 点採取し、重量を測定した後、-20℃のフリーザーに保存した。還流抽出装置等で DCIP を抽出、定容後、ガスクロマトグラフィーまたはマスフラグメントグラフィーで各臓器への分布を調べた。

試験結果：

臓器	性	DCIP (平均値)				
		対照群	80 ppm 群	400 ppm 群	2000 ppm 群	10000 ppm 群
体脂肪	♂	0.04	0.31	2.44	7.13	12.3
	♀	<0.05*	0.74**	3.53	6.82	39.4
肝	♂	<0.05*	—	0.22	0.50	1.48
	♀	<0.07*	—	0.08	0.17	0.84
腎	♂	<0.1*	—	—	—	1.11
	♀	<0.3*	—	—	—	0.52
血液	♂	<0.06*	—	—	—	0.34
	♀	<0.1*	—	—	—	0.50

「*」は検出限界を示す。

「**」は最高値を示す。

「—」は測定されていないことを示す。

単位は血液が $\mu\text{g/mL}$ 、それ以外は $\mu\text{g/g}$

以上の結果から DCIP は脂肪親和性の高い薬剤といえる。

については によると飼料中に 100 ppm の を混合し、ラットに連日給餌した場合、臓器中への蓄積は 3~5 日以後は平衡レベルに達し、蓄積量は体脂肪で 150 $\mu\text{g/g}$ 、肝で 60 $\mu\text{g/g}$ となっている。これに比較すれば DCIP の蓄積性はきわめて小さいものと考えられる。

(3) ^{14}C -DCIP/ラットにおける代謝試験

(資料 M3)

試験機関：

報告書作成年：

供試標識化合物：bis (2-chloro-1-methylethyl) ether (DCIP)

*標識部位

放射化学的純度；

比活性；

供試動物： Sprague - Dawley 系ラット 雄；7 週齢 雌；10 週齢

方法： 投与検体は、非標識 DCIP で希釈した ^{14}C -DCIP をポリエチレングリコール 400 に溶解して調製した。

排泄及び蓄積性検討の予備試験；

雌雄 2 匹ずつのラットに ^{14}C -DCIP を 100 mg/kg 単回強制経口投与し、尿は 0~6 時間、6~24 時間 さらにそれ以降は 24 時間ごと 5 日間採取し、糞は 24 時間ごと 5 日間採取した。呼気は DCIP および揮発性有機化合物のための $^{14}\text{CO}_2$ の 2 種の溶液で 24 時間ごとに 5 日間トラップした。

また、雌雄 1 匹ずつには 10 mg/kg の ^{14}C -DCIP を単回投与し前述の通り呼気について 5 日間トラップした。

この試験で採取した呼気について、代謝物の検討も行った。

排泄及び蓄積性検討の本試験；

各群雌雄 5 匹ずつのラットより成る 3 群に次のように投与を行った。

(a) ^{14}C -DCIP 10 mg/kg 単回経口投与

(b) ^{14}C -DCIP 100 mg/kg 単回経口投与

(c) 10 mg/kg の非標識 DCIP を 14 日間毎日投与した後、 ^{14}C -DCIP 10 mg/kg を単回経口投与

(a)、(b) 及び (c) 群の尿は 0~6 時間、6~24 時間さらにそれ以降は 24 時間ごとに 5 日間採取し、糞は 24 時間ごとに 5 日間採取した。呼気については $^{14}\text{CO}_2$ の混液でトラップし、24 時間ごとに 5 日間溶液を新しいものと交換しながら採取した。

(c) 群のラットの 10 匹のうち 2 匹の呼気については 5 日間トラップした。

この試験で採取した尿を用いて、TLC 分析、pH4 の逆相 HPLC 分析、質量スペクトルにより代謝物の検討も行った。

胆汁中排泄；各群雌雄 3 匹ずつのラットより成る 2 群に胆管カニューレを挿入後、次のように検体を投与し、尿、糞 (それぞれ 0~24 時間、24~48 時間)、胆汁 (3 時間間隔) で採取、分析した。48 時間後、ラットをと殺して肝臓と胃腸管を採取した。呼気については、採取しなかった。

- (a) ^{14}C -DCIP 10 mg/kg 単回経口投与
- (b) ^{14}C -DCIP 100 mg/kg 単回経口投与

血漿中放射能濃度；各群雌雄 5 匹ずつのラットより成る 2 群に胆汁中排泄試験と同様に検体を投与し、0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240 時間に尾静脈より血液試料を採取した。

- (a) ^{14}C -DCIP 10 mg/kg 単回経口投与
- (b) ^{14}C -DCIP 100 mg/kg 単回経口投与

組織内分布 (単回投与)；各群雌雄 2 匹ずつのラットより成る 2 群に胆汁中排泄試験と同様に検体を投与し、2 時間後及び 24 時間後に 1 匹ずつをと殺し組織内分布を調べた。

- (a) ^{14}C -DCIP 10 mg/kg 単回経口投与
- (b) ^{14}C -DCIP 100 mg/kg 単回経口投与

組織内蓄積；雌雄 5 匹ずつのラットに 10 mg/kg の ^{14}C -DCIP を毎日 1 回 7 日間経口投与し、2, 24, 72, 120, 240 時間後にそれぞれ雌雄 1 匹ずつをと殺し、組織内分布を調べた。

組織内蓄積性についての定性的な検討のため、5 匹の雄ラットに 10 mg/kg の ^{14}C -DCIP を 7 日間投与し、最終投与後 2, 24, 72, 120, 240 時間にと殺した。
また、1 匹の雄ラットに ^{14}C -DCIP を単回経口投与し、24 時間後にと殺した。
各ラットの腎と脊椎の間を通る 6 断位の垂直切片 (20 μm) をオートラジオグラフに作製した。

代謝物の検討用試料のための追加投与試験

胆汁；胆管カニューレ挿入した雌雄各 1 匹、計 4 匹の追加ラットに ^{14}C -DCIP を 10 mg/kg と 100 mg/kg を単回投与し、胆汁を投与後 0~24 時間と 24~48 時間の間採取した。

血漿；雌雄各 2 匹、計 4 匹のラットに ^{14}C -DCIP を 10 mg/kg と 100 mg/kg を単回投与し、投与 2 時間後各動物から血液試料を採取した。

結果：

排泄－蓄積性の検討；

DCIP 投与後の排泄および臓器などへの放射能分布を下表に示す。

排泄－蓄積性検討の本試験より、低用量または高用量の単回投与、連続投与ともに雌雄とも 5 日間で投与量の 59~65 %が尿中に排泄され、しかもほとんどが 24 時間以内に排泄された。糞中排泄率は投与量の 0.9~1.4 %、呼気中排泄は 27~35 %であった。投与 5 日後にラットの体内に残存していた放射能は 4 %であった。

(単位：%)

投与量		10 mg/kg		100 mg/kg		10 mg/kg ^{※1} (pre-treated)	
検査対象	時間 (h)	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	0～6	42.71	43.73	13.90	10.14	36.69	39.41
	6～24	14.57	17.80	41.13	41.46	22.09	22.21
	24～48	0.90	1.15	2.78	10.31	0.71	1.80
	48～120	0.77	0.92	0.96	1.57	0.57	1.14
	合計 ^{※2}	59.00	63.70	58.85	63.57	60.12	64.19
糞	0～24	0.68	0.76	0.27	0.34	0.37	0.47
	24～48	0.26	0.42	0.45	0.37	0.27	0.36
	48～120	0.22	0.26	0.32	0.40	0.24	0.31
	合計	1.16	1.44	1.04	1.11	0.88	1.14
呼気	0～24	30.22	26.18	30.93	24.90	27.32	24.07
	24～48	1.57	1.53	2.91	5.02	1.71	1.65
	48～120	1.17	1.10	1.52	1.71	1.12	1.17
	合計	32.96	28.81	35.36	31.63	30.15	26.89
胃腸管 +内容物	120	0.16	0.19	0.20	0.22	0.16	0.18
肝臓	120	0.30	0.26	0.34	0.31	0.27	0.24
他臓器	120	0.61	0.88	0.75	0.99	0.59	0.69
屍体	120	3.71	2.81	4.09	3.00	3.07	2.90
合計	120	97.9	98.1	100.6	100.8	95.2	96.7

数値は検出された放射エネルギーを放射能の投与量に対する百分率で示したものの(動物5匹の平均値)

※1：非標識化合物を予め14日間投与した後、標識化合物10 mg/kgを単回投与したものの。

※2：ケージ洗浄液中の放射エネルギーを含む。

胆汁中排泄および血漿中放射能濃度；

DCIP 投与後の胆汁中排泄、血漿中放射能濃度および血漿中の薬物動学的パラメータを表に示す。

胆汁中排泄は、低用量、高用量とも投与量の約17%であり、胆汁は比較的重要な放射能排泄経路であることが示された。また、尿中への排泄は、投与後48時間までに低用量で44.96%以上、高用量で41.80%以上(いずれもケージ洗浄液を含む)であった。48時間後の屍体には低用量で投与した放射能の6.5および5.5%、高用量で6.2および8.3%が残存していた。合計すると低用量で平均71%、高用量で平均70.6%の放射能が48時間までに回収され、残りの放射能は呼気中に排泄されたものと考えられた。

放射能の血漿中濃度は、低用量、高用量とも投与後2時間に最高値に達し、投与後24もしくは48時間にはその1/2以下に減少した。本検体は速やかに吸収されるが、血漿からの排泄も速やかであることが示された。

表 DCIP 投与後の胆汁、尿、糞中への排泄 (単位：%)

投与量		10 mg/kg		100 mg/kg	
検査対象	時間 (h)	雄	雌	雄	雌
胆汁	0~12	13.62	15.23	6.09	7.93
	12~24	3.44	1.17	8.12	5.59
	24~48	0.26	0.34	3.15	3.92
	合計	17.32	16.74	17.36	17.44
尿+ケージ洗浄液	0~48	44.96	49.74	47.68	41.80
糞	0~48	1.36	0.65	1.11	1.26
胃腸管+内容物	48	0.61	0.54	0.58	0.66
肝臓	48	0.67	0.63	0.75	0.96
屍体	48	5.19	4.36	4.90	6.63
合計	0~48	70.10	72.67	72.37	68.76

(動物 3 匹の平均値)

表 DCIP 投与後の血漿中放射能濃度 (単位：μg/mL)

投与量		10 mg/kg		100 mg/kg	
検査対象	時間 (h)	雄	雌	雄	雌
血漿	0.5	1.86	2.06	10.0	7.6
	1	1.95	2.50	14.2	10.7
	2	2.04	2.68	16.1	15.9
	3	1.99	2.38	15.1	14.3
	7	1.66	1.70	16.0	15.5
	12	1.00	1.14	13.3	13.2
	24	0.57	0.67	8.5	11.6
	48	0.33	0.42	4.4	5.5
	240	0.03	0.05	0.3	0.5

(動物 5 匹の平均値)

表 血漿中の薬物動学的パラメータ

投与量		10 mg/kg		100 mg/kg	
パラメータ/性別		雄	雌	雄	雌
T _{max} (時間)		2	2	2	2
C _{max} (μg/mL)		2.04	2.68	16.1	15.9
T _{1/2} (時間)	α相 ^{※3}	11.75	10.13	25.02	32.09
	β相 ^{※4}	48.3	57.0	47.4	49.2
AUC ₂₄₀ (μg×時間/mL)		60.8	75.2	753	904

※3 : 2-24 時間 (10 mg/kg)、2-48 時間 (100 mg/kg) ; 申請者計算 ※4 : 24-240 時間

組織内分布、組織内蓄積 ;

DCIP 投与後の経時的な組織内分布を表に示す。

組織内蓄積試験では、組織中放射能濃度は最終投与 2 時間後に最高値に達し、特に、脂肪組織や全血中の濃度が高かった。脂肪組織からの放射能消失は極めて遅かったが、他の組織や臓器からの消失は比較的速やかであった。低用量及び高用量ともほぼ同様の組織内分布であった。

(単位: $\mu\text{g DCIP/g tissue (wet weight)}$)

投 与 量		10 mg/kg		100 mg/kg		10 mg/kg ^{※5} (pre-treated)	
検査組織	時間 (h)	雄	雌	雄	雌	雄	雌
脂 肪	2	13.5	19.7	83.1	75.3	20.1	21.7
	24	1.58	2.82	38.2	18.8	9.90	4.41
	120	0.92	0.62	13.5	7.00	9.66	4.84
	240	—	—	—	—	6.02	7.08
胃腸管 + 内容物	2	27.0	29.0	619	716	31.1	35.3
	24	1.31	1.61	51.2	34.3	2.71	3.32
	120	0.16	0.23	2.19	2.71	0.76	1.19
	240	—	—	—	—	0.41	1.01
腎 臓	2	13.3	7.34	40.4	28.0	16.8	13.7
	24	1.49	1.87	20.1	25.7	5.45	6.20
	120	0.53	0.68	6.42	7.38	2.66	3.00
	240	—	—	—	—	1.41	1.58
肝 臓	2	7.97	5.78	38.9	30.3	11.9	11.3
	24	1.90	3.35	34.2	41.7	5.38	6.77
	120	0.51	0.63	6.95	7.28	2.31	2.39
	240	—	—	—	—	0.89	1.34
脾 臓	2	8.50	14.3	45.7	68.9	10.2	11.9
	24	2.03	2.81	19.4	25.8	4.59	6.05
	120	0.64	0.79	6.07	6.95	3.22	2.86
	240	—	—	—	—	1.79	1.95

表中の数値: 10 及び 100 mg/kg 単回投与群の 120 時間後のみ 5 匹の平均値、他は全て 1 匹の値。

— : 測定せず

※5 : 非標識化合物を予め 14 日間投与した後、標識化合物 10 mg/kg を単回投与したもの。

代謝物の検討 ; TLC 分析及び HPLC 分析の結果、認められた尿中主要代謝物は DCIP の

である

と同定され、24 時間以内に排泄された量は雄で投与量の 37.6%、雌が投与量の 29.2% であった。

胆汁中にも尿中に認められた

が認められたが、わずか投与量の 0.1~0.4% であった。酵素処理によりグルクロン酸または硫酸抱合体の存在を検討したが、存在の証拠は得られなかった。

血漿中にも

が認めら

れたが、検出された放射能が低かったことから、定量までには至らなかった。

また、呼気中に排泄された放射能はほとんどすべて $^{14}\text{CO}_2$ (予備試験 10 mg/kg 投与では雄で投与量の 33.49%、雌では 28.62%) に由来したもので、未変化の DCIP あるいは他の中性有機化合物として呼気中に排泄された放射能は最大でも投与量の 1~2% に過ぎなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 呼気 (0~120 h) 中の代謝物の検討 (単位：%)

投 与 量	10 mg/kg		100 mg/kg		10 mg/kg ^{※5} (pre-treated)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
性 別						

※5 : 非標識化合物を予め 14 日間投与した後、標識化合物 10 mg/kg を単回投与したもの。

表 尿 (0~24 h) 中の代謝物の検討 (単位：%)

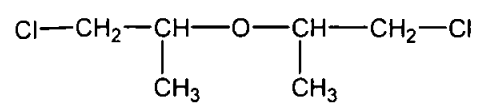
投 与 量	10 mg/kg		100 mg/kg		10 mg/kg ^{※5} (pre-treated)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
性 別						

※5 : 非標識化合物を予め 14 日間投与した後、標識化合物 10 mg/kg を単回投与したもの。

表 胆汁 (0~24 h) 中の代謝物の検討 (単位：%)

投 与 量	10 mg/kg		100 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
性 別				

DCIP のラットにおける代謝・分解



(I) 親化合物

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

2. 植物体内運命に関する試験

(1) DCIP のハクサイにおける代謝試験

(資料 M4)

試験機関：

報告書作成年：

供試化合物：ネマモール乳剤

供試植物：ハクサイ (サカタ 2 号)

試験方法：2月17日に播種し2~3本葉期に6号ポットに1本定植後、4月16日薬液をハクサイに直接かからないよう灌水し強制的に吸収させた。

薬液の濃度はネマモール乳剤の30, 100, 300, 1000, 3000 ppmの濃度による予備試験から1000 ppmを選定した。

4月17日以降、土を除いて水耕栽培とし、1, 2, 3日後にそれぞれ4株(約500 g)を採取し、細断均質化して、ハクサイ中のDCIPの消長を調査する試料とした。

他方、代謝・分解物の同定を目的として、強制的・継続的にDCIPを吸収させる様、1本定植した6号ポットを4月23日にネマモール乳剤の1000 ppm薬液に浸漬処理するとともに、土壤の乾燥に伴い同1000 ppm薬液を灌水処理し、3, 6, 13日後にそれぞれ4株(約500 g)を採取し、細断均質化して、ハクサイ中のDCIP、

およびの検出のための試料とした。

分析はガスクロマトグラフィー (ECD 又は FID) による。

試験結果：前日にネマモール乳剤1,000 ppmを灌水し、翌日に根を洗滌し水耕栽培したハクサイ中の吸収DCIPの消長は下記の表の様に急激に減少した。

時間	DCIP 検出量 (ppm)
試験開始時	107
1日後	14.1
2日後	0.98
3日後	0.02

継続的にDCIPを与えた場合、6及び13日後にそれぞれ及びの
が、また13日後では検出限界程度の
も検出された。

以上の結果から、ハクサイ体内においても、ラットでの吸収、代謝と同様、DCIPは速やかに代謝消
失し、を生成するが、さらに無
害な単純な物質に代謝・分解してしまうと考えられる。

(2) ^{14}C -DCIP / ハクサイにおける代謝試験

(資料 M5)

試験機関：

報告書作成年：

供試標識化合物：bis (2-chloro-1-methylethyl) ether

* 標識部位

放射化学的純度；

比活性；

供試植物： ハクサイ 品種 Autumn Crisphead (F_1 雑種)

方法： それぞれ土耕栽培及び水耕栽培により生育させたハクサイについて試験した。

土耕栽培； 土壌を篩にかけ (4.75 mm)、直径 15 cm のプラスチックポットに充填し、粒状肥料を約 3.3 g/kg 土壌の割合で混和した。種子を深さ 0.5~1 cm に播種し、環境を制御した植物生育室に置いた。発芽後はポット当り 1 本に間引いた。

播種後 47 日の 8 ポットに ^{14}C -DCIP を 2.4 mg/cm² の割合でポットの土壌 5~10 cm 深さに注入した。

各ポットには比活性 _____ の DCIP _____ に相当する _____ が処理された。

検体処理後 24, 48, 72 及び 96 時間後に 2 ポットから土壌の面の所で切り離し、植物体を採取し、秤量後 _____ により抽出して液体シンチレーション (LSC) 法により放射能を測定した。

ポットの内容物 (土壌及び根) についても _____ で抽出し同様に測定した。

水耕栽培； 水耕液は 1/3 の濃度の Hoaglands 溶液* (Hoaglands & Arnon, 1950) を用い、必要な微量要素を加えて調製した。種子は水耕液表面のナイロンの網上で発芽させ、発芽後、1 本 1 本の幼苗は水耕液を満した 125 mL 容のガラス皿にそれぞれ移植し、水耕液の表面上に広げたナイロンの網の上にその根が溶液に浸る様に保持して栽培した。

播種 42 日後に水耕液の入ったより大きい (600 mL) ガラスビーカーに移植した。

* 1/3 の濃度の Hoaglands 溶液は下記のように調製した。

微量要素溶液	1 mL
1M KH_2PO_4 溶液	1 mL
1M KNO_3 溶液	5 mL
1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液	5 mL
1M MgSO_4 溶液	2 mL
蒸留水	3 L

0.5 % (w/w) 硫酸第 1 鉄溶液を用時調製し 1 mL/L の割合で水耕液に添加した。

微量要素溶液は次のように調製した。

H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.08 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.08 g
蒸留水	1 L

- i) 予備暴露; 水耕栽培により栽培したハクサイ 1 個体ずつを濃度 50, 100, 200, 500 及び 1000 mg/L の放射能希釈 ¹⁴C-DCIP を含有する水耕液の入ったビーカーに移植した。この結果、100 mg/L 又はそれ以上の濃度に暴露した場合、植物体は黄化や葉の萎凋、水耕液の取り込み減少の様な薬害症状を呈したので、本試験は 50 mg/L で暴露することにした。
- ii) 24 時間暴露; 播種後 87 日のハクサイを試験に供した。ハクサイ 18 個をそれぞれ ¹⁴C-DCIP で処理した水耕液 (49 mg/L に相当) 移植し、処理溶液に 24 時間暴露させた後、植物体を取り出し根を蒸留水で洗浄した。2 個体について LSC で放射能を測定し、残りの 16 個体を無処理水耕液に移植し、6, 12, 24, 36, 48, 72 及び 96 時間後に 2 個体ずつを分析に供した。試料採取時に水耕液の総容量を記録し、その 1 mL を LSC による分析に用いた。植物体は重量を記録し、
で抽出、放射能を測定した。
無処理水耕液に移植した後、2つの個体は分離風防ガラス容器内に置き、空気を通し、
を含有する 2 つのトラップ、次いで
を含有する 2 つのトラップに通した。内容物の分析のため、6, 12, 24, 36, 48, 72 及び 96 時間後に新たな溶媒と交換しそれぞれの放射能を測定した。
- iii) 連続暴露; 播種後 95 日のハクサイを試験に供した。ハクサイ 6 個をそれぞれ ¹⁴C-DCIP で処理した水耕液 (48.8 mg/L に相当) に移植し、3, 6 及び 13 日後に 2 個の植物体を採取し、
で抽出、放射能を測定した。

結果: 土耕栽培のハクサイでは、処理後 24~96 時間には投与量の 4.1~6.6 % (処理後 96 時間では投与量の 4.12~5.52 %) が含有されていた。試料中の放射能の濃度は 24 時間後に 158 ppm であったが、72~96 時間後には 106~119 ppm に減少した。未変化 DCIP の濃度は 24 時間後には 125 ppm (ハクサイ中全放射能の 79 %) であったが、96 時間後には 57~81 ppm (ハクサイ中全放射能の 53~68 %) に減少した。

表 1 ¹⁴C-DCIP 処理土壌で生育したハクサイにおける放射能

採取時間	植物体中			土壌中	総回収率
	抽出液	抽出残渣	小計		
24 時間	6.34	0.23	6.57	81.36	87.9
28 時間	4.95~5.85	0.34~0.30	5.29~6.15	73.52~69.54	78.8~75.7
72 時間	5.09~3.90	0.28~0.20	5.37~4.10	65.27~69.01	70.6~73.1
96 時間	3.82~5.23	0.30~0.29	4.12~5.52	58.78~52.07	62.9~57.6

数値は施用量に対する割合(%AR)

表 2 ^{14}C -DCIP 処理土壌で生育したハクサイ中の放射エネルギーと濃度

採取時間	総放射能 (mg eq / DCIP)	濃度 (ppm eq / DCIP)
24 時間	27.8	158
28 時間	22.3~26.0	134~126
72 時間	22.7~17.4	110~106
96 時間	17.4~23.3	107~119

表 3 ^{14}C -DCIP 処理土壌で生育したハクサイ中の抽出可能・不可能放射エネルギーの割合

採取時間	抽出液 (%)	抽出残渣 (%)
24 時間	96.5~97.2	3.5~2.8
28 時間	93.6~95.1	6.4~4.9
72 時間	94.9~95.2	5.1~4.8
96 時間	92.8~94.8	7.2~5.2

表 4 ^{14}C -DCIP 処理土壌で生育したハクサイ中の DCIP 濃度と割合

採取時間	植物体中の DCIP	
	放射エネルギー (%)	濃度 (ppm)
24 時間	79	125
28 時間	74~72	99~91
72 時間	74~67	81~71
96 時間	53~68	57~81

ハクサイ中の主要代謝物はただ一つで、

と同定され、96 時間後にはハクサイ中の全放射エネルギーの % であった。その他、未同定の代謝物がハクサイ中全放射エネルギーの % みられた。

表 5 ^{14}C -DCIP 処理土壌で生育したハクサイ中の代謝物

成分	植物体中での放射エネルギー (%)

b : 申請者算出

水耕法 24 時間暴露のハクサイでは、暴露 6 時間後には投与量の 1.94~2.48 % が含有されていたが、96 時間後には投与量の 0.45~1.01 % となった。放射エネルギーは暴露 6 時間後の 7.0 ppm から 96 時間後の 2.7 ppm へ減少した。未変化 DCIP の濃度は同様に 3.6~4.3 ppm (ハクサイ中全放射エネルギーの 53~61 %) から 0.02~0.03 ppm 以下 (ハクサイ中全

放射能の<0.6~<1.1%)に減少した。半減期は10時間であった。

また、新しい水耕液に移植してから96時間後までに合計1.6及び0.4%ARが揮発性放射能のトラップ中に検出された。揮発の割合は12~24時間の間が最大であった。

全ての揮発性放射能は¹⁴C₂よりも¹⁴C-DCIPや他の有機物に関連していた。

表6 ¹⁴C-DCIP 50 mg/L 含有水耕液に24時間暴露したハクサイにおける放射能量

採取時間	植物体中			水耕液中
	抽出液	抽出残渣	小計	
0 時間	1.80~1.26	0.17~0.11	1.97~1.37	-
6 時間	1.68~2.22	0.26	1.94~2.48	0.69~1.06
24 時間	0.84~1.08	0.21~0.33	1.05~1.41	0.48~0.68
48 時間	1.00~0.67	0.30~0.26	1.30~0.93	0.28~0.26
96 時間	0.73~0.31	0.28~0.14	1.01~0.45	0.07~0.11

数値は施用量に対する割合(%AR)

表7 ¹⁴C-DCIP 50 mg/L 含有水耕液に24時間暴露したハクサイ中の放射能量と濃度

採取時間	総放射能(mg eq / DCIP)	濃度(ppm eq / DCIP)
0 時間	0.48~0.34	6.9~5.0
6 時間	0.47~0.61	6.9~7.1
24 時間	0.26~0.35	2.9~4.0
48 時間	0.32~0.23	3.1~2.9
96 時間	0.25~0.11	2.9~2.4

表8 ¹⁴C-DCIP 50 mg/L 含有水耕液に24時間暴露したハクサイ中の抽出可能・不可能放射能量の割合

採取時間	抽出液(%)	抽出残渣(%)
0 時間	91.4~92.3	8.6~7.7
6 時間	86.5~89.5	13.5~10.5
24 時間	79.8~76.6	20.2~23.4
48 時間	77.2~71.9	22.8~28.1
96 時間	72.4~68.2	27.6~31.8

表9 ¹⁴C-DCIP 50 mg/L 含有水耕液に24時間暴露したハクサイ中のDCIP濃度と割合

採取時間	植物体中のDCIP	
	放射能量(%)	濃度(ppm)
0 時間	65	4.5~3.2
6 時間	53~61	3.6~4.3
24 時間	13~14	0.37~0.58
48 時間	7.8~3.4	0.24~0.10
96 時間	<0.6~<1.1	<0.02~<0.03

表 10 ^{14}C -DCIP 50 mg/L 含有水耕液に 24 時間暴露した後のハクサイからの揮発性放射能の生成

時間	放射能量 (% AR)	累積放射能量 (% AR)
0-6 時間	0.02~<0.01	0.02~<0.01
12-24 時間	0.61~0.16	0.85~0.20
36-48 時間	0.20~0.05	1.35~0.31
72-96 時間	0.07~0.03	1.62~0.42

水耕栽培連続暴露では、総放射能濃度は時間とともに増加し、13 日後には 36.8~41.1 ppm となった。一方、未変化 DCIP の濃度は 3 日後 7.9~10.0 ppm (ハクサイ中の全放射能の 59~67%)、13 日後 9.8~10.5% (ハクサイ中全放射能の 25~27%) であり、7.9~10.5 ppm の範囲で定常状態に達した。

植物体中の主要代謝物はただ 1 つで

と同定され、13 日後には植物体放射能の % であった。その他、未同定の代謝物がハクサイ中全放射能の % みられた。

表 10 ^{14}C -DCIP 50 mg/L 含有水耕液に連続暴露したハクサイ中の放射能量と濃度

採取時間	総放射能 (mg eq / DCIP)	濃度 (ppm eq / DCIP)
3 日	0.75~1.05	13.3~14.8
6 日	1.16~1.39	19.7~23.1
13 日	3.16~2.74	41.1~36.8

表 11 ^{14}C -DCIP 50 mg/L 含有水耕液に連続暴露したハクサイ中の抽出可能・不可能放射能量の割合

採取時間	抽出液 (%)	抽出残渣 (%)
3 日	91.5~94.6	8.5~5.4
6 日	82.3~79.3	17.7~20.7
13 日	82.6~83.8	17.4~16.2

表 12 ^{14}C -DCIP 50 mg/L 含有水耕液に連続暴露したハクサイ中の DCIP 濃度と割合

採取時間	植物体中の DCIP	
	放射能量 (%)	濃度 (ppm)
3 日	59~67	7.9~10.0
6 日	42~34	8.2~7.9
13 日	25~27	10.5~9.8

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 13 ^{14}C -DCIP 50 mg/L 含有水耕液に連続暴露したハクサイ中の代謝物

成分	植物体中での放射能量 (%)		
	3 日	6 日	13 日

b : 申請者算出

(3) トマトにおける代謝試験

(資料 No. M12)

試験機関：

報告書作成年：2007 年

供試化合物：¹⁴C-標識 DCIP

化学名； ジクロロジイソプロピルエーテル

化学構造；

* 標識位置

比放射能；

放射化学的純度；

非標識化合物の純度；

供試植物：トマト(品種名：Shirley Fl)

栽培条件；英国 Cambridgeshire, Huntingdon の試験施設で、6 個のピートポット(直径約 30 cm)内の土壌に検体を処理した 10 日後、最初の開花がみられた供試植物をポット 1 個に 1 株ずつ植付け、野外で 19 日間生育させた後、温度管理した室内で成熟するまで栽培した。

試験方法：

試験溶液の調製；供試標識化合物に製剤補助成分を加えて 80 %乳剤を調製した。

処理量及び設定根拠；農薬製剤の使用量(80 %乳剤 5 mL/m²)に基づいて、試験溶液を 4.79 mL/m²の薬量で処理した。

処理部位および処理方法；収穫 92 日前に試験溶液を如露で土壌に灌注し、直ちに厚さ 2~3 cm の土壌で覆った。

試料採取時期；処理 1 日後に大気試料、トマト植付け 1 および 7 日後に、葉、土壌および大気試料、植付け 41 および 82 日後に果実、葉、土壌および大気の試料を採取した。土壌試料は直径 2.5 cm の管を土中に深さ 10 cm まで押し込んで採取した。大気はカーボンフィルターに捕集した。

試料の処理；図 1 - 図 3 に、82 日後に採取した果実、葉および土壌について、放射性成分の抽出、分画手順を示す。

果実および葉の試料は秤量後、

で洗浄し、ホモジナイズして

で 2 回、

混合液で 2~3 回、水で 2~3 回抽出し、遠心

分離により抽出液および残渣に分けた。土壌試料および大気中の放射能を捕集したフィルターから

で放射性成分を抽出した。

植付け 7 日および 41 日後の葉試料抽出液を

で有機相と水相に分配し

た。この水相を pH5 に調整し、

を加えて 37 °C で 16 時間処理した。

植付け 82 日後の果実および葉試料抽出液を濃縮して溶媒を除去し、pH5 に調整後、

を加えて 37 °C で 16 時間処理した。また、82 日後の葉試料抽出液

を濃縮して溶媒を除去し、塩酸あるいは水酸化ナトリウムを加えてそれぞれについて 1 M または 6 M の溶液を調製して 37 °C で 16 時間処理した。

植付け 41 日後の葉試料抽出残渣に緩衝液を加えた後、

あるいは を加えて 37 °C で 16 時間処理し、
で抽出した。

植付け 41 日後の葉試料抽出残渣に 1M 塩酸を加えて 37 °C で 16 時間処理し、
で抽出した。

また、植付け 1、7、41 日後の葉試料抽出残渣および 41 日後の果実試料抽出残渣に
を加えて 37 °C で 16 時間処理し、

で抽出した。

植付け 82 日後の果実および葉試料抽出残渣について以下の操作を 2 回ずつ順次実施し、天然成分を取り出し定量した。

天然成分	抽出操作
水溶性の多糖類	: 塩化ナトリウム溶液 (10 g/L) による還流抽出
ペクチン多糖類	: エチレンジアミン四酢酸ナトリウム液 (5g/L) による還流抽出
ヘミセルロース I	: 室温の水酸化ナトリウム (50 g/L) で抽出
リグニン	: 80 °C の亜塩素酸ナトリウム (10 g/L) で抽出
ヘミセルロース II	: 室温の水酸化ナトリウム (240 g/L) で抽出

分析方法; 放射能は自動クエンチング補正付き液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定し、バックグラウンド値の 2 倍を正確な定量限界とした。液体試料はシンチレーターと混合して測定した。果実、葉および土壌の抽出残渣は燃焼効率 95 % 以上のサンプルオキシダイザーで燃焼し、CO₂ 吸着剤に吸着させ、シンチレーターを加えて測定した。放射能検出器および紫外線吸収検出器付きの高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、2 次元薄層クロマトグラフィー (TLC) および質量分析器 (LC-MS) で分析し、標準品とのコクロマトグラフィーおよび質量スペクトルデータで代謝物を同定あるいは化学的に特徴付けた。HPLC 分析でみられた主な極性成分 については TLC で 成分に分離した。

結果:

吸収および移行; 処理後各時点における各部位の放射能濃度の推移を表 1 に示す。土壌処理した供試標識化合物は植物体に吸収され、果実および葉の放射能は植付け 41 日後に最高となり、それぞれ 2.164、10.249 mg (DCIP 当量) /kg (生重量) であったが、82 日後には著しく減少した。土壌中の放射能は植付け 82 日後にも検出されたが、大気中の放射能は 41 日後には検出限界未満 (<0.001 µg/L) となった。

表 1. 試料の放射能濃度の推移 (DCIP 当量)

採取時期 \ 試料	果実 (mg/kg)	葉 (mg/kg)	土壌 (mg/kg)	大気 (µg/L)
処理 1 日後	-	-	-	7.69
植付け 1 日後*	-	0.549	8.526	0.093
植付け 7 日後	-	4.970	6.889	0.273a
植付け 41 日後	2.164	10.249	1.832	<0.001
植付け 82 日後	0.255	5.146	1.211	<0.001

*: 土壌処理 10 日後に植付けた。 -: 試料なし、または分析せず。

a: 植付け 8 日後に試料採取した。

放射性成分の分布および化学的特徴付け； による抽出放射能濃度と割合、抽出残渣を酵素、酸あるいは塩基で抽出して分画した結果および多糖類、セルロース、リグニンの天然成分に分類した結果を表 2-1、表 2-2 および表 2-3 に示す。果実および葉試料中放射能の大部分（果実で試料中総放射能の 84.9～85.8 %、葉では 85.6～90.2 %）が で抽出された。植付け 41 日後の果実試料抽出残渣の放射能は主に塩基処理（水酸化ナトリウムを加えて培養）により抽出されたことから、41 日後の果実試料の抽出残渣についてはそれ以上の分画をしなかった。土壌試料については、時間の経過と共に抽出される放射能の割合が減少し 41 日後には約 19 %となった。表 3-1 および表 3-2 に各時点、各試料の放射性成分の分布を示す。は TLC で、他の成分は HPLC で定量した。果実の DCIP は検出限界未満 (<0.02 mg/kg) で、DCIP より極性が高い 9 成分が認められた。主な代謝物は および で総放射能に対してそれぞれ 9.9 %以上であった。葉の DCIP は植付け直後の 0.172 mg/kg、試料の総放射能に対して 31.3 %から減衰し、82 日後には検出限界未満となった。認められた代謝物はいずれも DCIP より極性が高く、主な代謝物は および で、個別の割合はいずれも 10 %以上であった。には 6 成分が認められ、この内、最大の成分 は分子量 であった。は と抱合する二糖類と推定された。の内、最大の は遊離の代謝物と考えられたがこれ以上の特徴付けはできなかった。果実および葉の残渣の多くは、天然成分の水溶性多糖類、ヘミセルロースおよびリグニンと結合していると考えられた。土壌中の DCIP は植付け直後の 7.02 mg/kg、82.4 %から減少して 41 日後に 0.20 mg/kg、11.1 %、82 日後には検出限界未満となり、80 %以上が非抽出残渣となった。

表 2-1. 抽出液および抽出残渣の試料中放射能に対する割合 (%) および放射能濃度 mg (DCIP 当量) / kg (生重量)

試料	分 画	植付け 1 日後		植付け 7 日後		植付け 41 日後		植付け 82 日後	
		割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
果実	溶媒抽出液	-	-	-	-	84.9	1.84	85.8	0.219
	抽出残渣	-	-	-	-	15.1	0.33	14.2	0.036
	合計	-	-	-	-	100	2.16	100	0.255
葉	溶媒抽出液	86.5	0.475	85.6	4.25	87.1	8.93	90.2	4.64
	抽出残渣	13.5	0.074	14.4	0.72	12.9	1.32	9.8	0.50
	合計	100	0.549	100	4.97	100	10.25	100	5.15
土壌	溶媒抽出液	88.2	7.52	86.0	5.93	18.8	0.34	19.2	0.23
	抽出残渣	11.8	1.01	14.0	0.96	81.2	1.49	80.8	0.98
	合計	100	8.53	100	6.89	100	1.83	100	1.21

- : 試料なし。

表 2-2. 溶媒抽出残渣の酸、塩基あるいは酵素処理後における抽出液および残渣の試料中放射能に対する割合 (%) および放射能濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

試料	試料採取時期	処理	抽出液		抽出残渣	
			割合	濃度	割合	濃度
葉	植付け 1 日後	1M 塩基 (水酸化ナトリウム)	10.1	0.055	3.4	0.019
	植付け 7 日後	1M 塩基 (水酸化ナトリウム)	10.2	0.508	4.2	0.212
	植付け 41 日後	プロテアーゼ	4.3	0.44	8.6	0.88
		β-グルコシダーゼ	3.6	0.37	9.3	0.95
		セルラーゼ / ヘミセルラーゼ	4.2	0.43	8.7	0.89
		1M 酸 (塩酸)	4.0	0.41	8.9	0.91
	1M 塩基 (水酸化ナトリウム)	7.6	0.78	5.2	0.54	
果実	植付け 41 日後	1M 塩基 (水酸化ナトリウム)	9.2	0.20	6.0	0.13

表 2-3. 収穫時 (植付け 82 日後) 試料抽出残渣の分画 試料中放射能に対する割合 (%) および放射能濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

分 画		果 実		葉	
		割合	濃度	割合	濃度
抽出残渣	水溶性多糖類	4.7	0.012	2.3	0.12
	バクチン多糖類	1.3	0.003	0.8	0.04
	ヘミセルロース I	3.3	0.008	1.6	0.08
	リグニン	2.8	0.007	2.1	0.11
	ヘミセルロース II	<0.6	<0.002	0.1	0.01
	未分画残渣	2.2	0.006	2.9	0.15
	合計	14.2	0.036	9.8	0.50
抽出液		85.8	0.219	90.2	4.64
合計		100	0.255	100	5.15

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 3-1. 植付け 1 日後および 7 日後に採取した試料中の放射性成分
試料中放射能の割合 (%) および濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量) [大気は µg/L]

成分	植付け 1 日後						植付け 7 日後					
	葉		土壌		大気*		葉		土壌		大気	
	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	31.3	0.172	82.4	7.02	100	0.093	15.1	0.75	78.8	5.43	99.2	0.271

* : 葉および土壌中の放射能濃度は mg (DCIP 当量) /kg、大気中の濃度は µg (DCIP 当量) /L

- : 分析せず。

a : 植付け 82 日後の葉試料を分析した結果これらの残渣は天然成分の水溶性多糖類、ヘミセルロースあるいはリグニンと結合していると考えられた。

b : および個々にそれ以下の成分で構成される。

および個々にそれ以下の成分で構成される。

c : および個々にそれ以下の成分で構成される。

および個々に以下の成分で構成される。

および個々にそれ以下の成分で構成される。

表 3-2. 植付け 41 日後および 82 日後に採取した試料中の放射性成分
試料中放射能の割合 (%) および濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

成分	植付け 41 日後						植付け 82 日後					
	果実		葉		土壌		果実		葉		土壌	
	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	<0.8	<0.02	3.3	0.34	11.1	0.20	<0.9	<0.003	<0.5	<0.02	<0.2	<0.01

- : 分析せず。

a : 植付け 82 日後の果実および葉試料を分析した結果、これらの残渣は天然成分の水溶性多糖類、ヘミセルロースあるいはリグニンと結合していると考えられた。

b : 果実の
葉の
果実の
果実の
葉の
葉の
葉の
の成分で構成される。

および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々に

c : 果実の
葉の
果実の
果実の
葉の
葉の
葉の
の成分で構成される。

および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。
および個々に

果実の
果実の
葉の
および個々にそれ以下の成分で構成される。
およびそれ以下の成分で構成される。
および個々にそれ以下の成分で構成される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図1. 植付け82日後に採取した果実の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図2. 植付け82日後に採取した葉の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

図3. 植付け82日後に採取した土壌の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

(4) かんきつにおける代謝試験

(資料 No. M13)

試験機関：

報告書作成年：

供試化合物：¹⁴C-標識 DCIP

化学名； ジクロロジイソプロピルエーテル

化学構造；

* 標識位置

比放射能；

放射化学的純度；

非標識化合物の純度；

供試植物； かんきつ成熟果樹 (品種名：Washington Navel)

栽培条件； 米国カリフォルニア州の試験施設で、樹冠を直径約 1.5 m に剪定し、プラスチック製
囲いの中に植えた果樹を慣行の条件で栽培した。

試験方法；

試験溶液の調製； 供試標識化合物に製剤補助成分を加えて 80 % 乳剤を調製した。

処理量及び設定根拠； 農薬製剤の使用量 (80 % 乳剤 5 mL/m²) に基づいて、試験溶液を 5.21 mL/m²
の薬量で処理した。

処理部位および処理方法； 収穫 147 日前に、加圧式の散布器で、試験溶液を果樹が植えてある囲
い内の土壤に散布し、直ちに層の厚さ 2~3 cm の土壤で覆った。

試料採取時期； 処理 1、14、85 および 147 日後に、果実、葉、土壤および大気の試料を採取した。

試料の処理； 放射性成分について、処理 147 日後に採取した果皮、果肉、葉および土壤の抽出お
よび分画手順を図 1~4 に示す。

葉の試料については秤量後、輸送に使用した袋および葉を洗浄した
とともにホモジナイズし、遠心分離して抽出液および残渣に分けた。

果実試料は秤量後、洗浄して果皮と果肉に分け、果皮については葉と同様輸送に使用
した袋および果実を洗浄した
とともにホモジナイズした。果肉につい
ては、ハサミで細切した後
を加えてホモジナイズした。この後、果皮、
果肉とともに遠心分離して抽出液および残渣に分けた。

葉、果皮、果肉の残渣については
で 3~4 回、
で 2~4 回、さらに、水で 1~2 回抽出し、遠心分離により抽出液および残渣に
分けた。

土壤試料は秤量後、果実と同様に抽出し、残渣の一部を分取して燃焼した。

大気はカーボンフィルターに捕集し、
により放射能を抽出した。

各試料抽出液の一部を
で分配し、水相に塩酸を加えて pH2 に調整後、再
び
で分配して放射能測定に供した。

果皮および葉の抽出残渣に
を加えて 37℃ で、16 時間培養し
た後、
で抽出し、遠心分離して上澄を分析に供し

た。処理 85 日および 147 日後に採取した果肉の抽出液を分配した試料に濃塩酸を加えて 37 °C で、16 時間処理した後、中和して で分配後、塩酸で pH2 に調整し、再び で分配して有機相および水相に分離した。

分析方法；放射能は自動クエンチング補正付き液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定し、バックグラウンド値の 2 倍を正確な定量限界とした。液体試料にはシンチレーターを加えて測定した。果皮、果肉、葉および土壌の抽出残渣は燃焼効率 95 %以上のサンプルオキシダイザーで燃焼し、CO₂ 吸着剤に吸着させ、シンチレーターを加えて測定した。

代謝物の化学的特徴付けは、放射能検出器および紫外線吸収検出器付きの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および 2 次元薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析し、DCIP は標準品とのコクロマトグラフィーにより同定した。

結 果：

吸収および移行；処理後各時点における各部位の放射能濃度の推移を表 1 に示す。土壌に処理した標識化合物は植物に吸収され、時間の経過に伴い果実および葉の放射能が増加した。土壌および大気中の放射能は処理後速やかに減少した。処理 1 日後の果皮および果肉中の放射能はそれぞれ 0.072 mg (DCIP 当量) /kg および検出限界以下であったが、147 日後には 0.343 mg (DCIP 当量) /kg および 0.063 mg (DCIP 当量) /kg となった。

表 1. 試料の放射能濃度の推移 (DCIP 当量)

採取時期 \ 試料	果皮 (mg/kg)	果肉 (mg/kg)	葉 (mg/kg)	土壌 (mg/kg)	大気 (µg/L)
処理 1 日後	0.072	<0.022	0.697	8.12	0.028
処理 14 日後	0.253	0.014	3.51	1.49	0.001
処理 85 日後	0.290	0.049	4.23	0.570	<0.001
処理 147 日後	0.343	0.063	6.37	0.388*	<0.001*

*：処理 149 日後に試料採取

放射性成分の分布および化学的特徴付け；

による抽出、による分配および抽出残渣を で抽出して分画した各試料の放射能分布を表 2 に示す。植物試料中の放射能の大部分は溶媒で抽出され、それらの多くは水溶性であったことから、主な代謝物は であることが示唆された。有機溶媒に可溶性放射性成分も極性があったが、それらの割合は比較的lowかった。葉における塩基抽出物および最終的な抽出残渣の割合が高かったことは、放射性成分が葉に存在する天然の成分と結合したと考えられた。各時点で採取した果皮、葉および土壌試料の HPLC および TLC での分析結果を表 3、表 4 および表 5 に、果肉中の放射性成分の分布を表 6 に示す。成分 および

は TLC で定量し、他の成分は HPLC で定量した。

本試験において、土壌処理した検体は果樹に吸収および代謝されて多数の極性代謝物および抱合体が形成された。収穫時 (処理 147 日後) の果皮および果肉試料に DCIP は検出されなかった。

主な代謝物は で、これらの成分については、トマトの代謝試験において検討された。 の分子量は で と同じであった。 は抱合体の代謝物で、 は遊離の代謝物である。 は二糖類のような抱

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

合体と推定された。 についてはマスペクトルデータを取得したが、構造は決定できなかった。

表 2. 試料中各分画の放射能の割合 (%) および放射能濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

試料	分画		処理 1 日後		処理 14 日後		処理 85 日後		処理 147 日後	
			割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
果皮	溶媒抽出	有機相	54.0	0.039	30.3	0.077	23.2	0.067	29.9	0.103
		水相	29.8	0.021	56.5	0.143	59.7	0.173	50.4	0.173
		合計	83.8	0.059	86.8	0.220	82.9	0.240	80.3	0.275
	塩基抽出		16.2	0.012	5.7	0.014	11.9	0.035	15.5	0.053
	残渣		<0.1	<0.001	7.5	0.019	5.2	0.015	4.2	0.014
	合計		100	0.072	100	0.253	100	0.290	100	0.343
果肉	溶媒抽出	有機相	-	-	-	-	10.0	0.005	9.7	0.006
		水相	-	-	-	-	76.2	0.037	85.0	0.054
		合計	-	-	54.8	0.008	86.2	0.042	94.7	0.060
	残渣		-	-	45.2	0.006	13.8	0.007	5.3	0.003
	合計		-	-	100	0.014	100	0.049	100	0.063
葉	溶媒抽出	有機相	-	-	-	-	5.4	0.23	4.7	0.30
		水相	-	-	-	-	92.0	3.89	90.7	5.78
		合計	90.8	0.633	96.1	3.38	97.4	4.12	95.4	6.08
	塩基抽出		8.3	0.058	3.4	0.12	2.6	0.11	1.5	0.10
	残渣		1.0	0.007	0.5	0.02	<0.1	<0.01	3.1	0.20
	合計		100	0.697	100	3.51	100	4.23	100	6.37
土壌	溶媒抽出	有機相	-	-	-	-	38.5	0.219	45.2	0.175
		水相	-	-	-	-	15.9	0.091	6.6	0.026
		合計	98.2	7.97	86.9	1.29	54.4	0.310	51.8	0.201
	残渣		1.8	0.15	13.1	0.20	45.6	0.260	48.2	0.187
	合計		100	8.12	100	1.49	100	0.570	100	0.388

- : 該当なし。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 3. 検体処理 1 日後および 14 日後に採取した試料中の放射性成分試料中放射能の割合 (%) および濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

成分	処理 1 日後						処理 14 日後					
	果皮		葉		土壌		果皮		葉		土壌	
	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	12.7	0.009	5.5	0.039	95.9	7.79	19.4	0.049	<1.9	<0.068	62.8	0.93

- : 分析せず。 a : 水溶性の多糖類

b : および個々に の成分で構成される。

c : あるいは成分で構成される。 を含む。

【申請者注】 *1, *2 : 報告書の記載ミスと思われる。申請者の計算では、 (生重量)となる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 4. 試料中放射能の割合 (%) および放射性成分の濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

成分	処理 85 日後					
	果皮		葉		土壌	
	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	<0.7	<0.003	<0.2	<0.02	<0.4	<0.003

- : 分析せず。

a : 果皮の
葉の

を含む 成分で構成される。
を含む 成分で構成される。
を含む 成分で構成される。

b : 遊離の代謝物あるいは低分子量の抱合体

表 5. 試料中放射能の割合 (%) および放射性成分の濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量)

成 分	処理 147 日後					
	果皮		葉		土壌	
	割合	濃度	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	<0.1	<0.001	<0.1	<0.01	<0.5	<0.002

- : 分析せず。

a :

を含む 成分で構成される。

を含む 成分で構成される。

を含む 成分で構成される。

b : 遊離の代謝物あるいは低分子量の抱合体で、水溶性の多糖類と特徴付けられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 6. 果肉中の成分の放射能の割合 (%) および放射能の濃度 mg (DCIP 当量) /kg (生重量) 試料中

成 分	処理 85 日後		処理 147 日後	
	割合	濃度	割合	濃度
DCIP	<0.1	<0.001	<0.1	<0.001

a : は、成分が認められた と同一であることが判明した。
b : はグルコースと結合し、グルカゾンとして沈殿。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図1. 処理147日後に採取した果皮の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図2. 処理147日後に採取した果肉の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図 3. 処理147日後に採取した葉の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

図 4. 処理147日後に採取した土壌の放射性成分抽出、分画手順、放射能の割合および濃度

(5) 植物代謝物

の検討

(資料 M14)

試験機関：

報告書作成年：

本試験では DCIP 処理土壌で生育させたトマト葉試料に存在する代謝物 の同定を試みた。これまでの研究から、いずれの代謝物も抱合体であると考えられており、代謝物は分子量が であることが分かっている。

供試化合物：¹⁴C-標識 DCIP

構造式；

* = ¹⁴C 標識位置

化学名； ジクロロジイソプロピルエーテル

放射化学的純度；

比放射能

供試植物： トマト

方法：

試料； ¹⁴C-DCIP を処理した土壌に苗を移植し、82 日後に採取したトマトの葉

抽出； 以下の手順により試料中の代謝物を抽出した。

試料をホモジナイズ

→ で 3 回抽出、次に で 2 回抽出

→ 各段階の抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去して乾固

→ で乾固物を溶解、遠心分離し、残渣を除去

→ 溶液を濃縮、乾固

→ 乾固物に再度、 を加えて遠心分離

→ 溶液に同量の水を加えて希釈し、薄層クロマトグラフィー (TLC) に適用

単離； 層厚 1 mm のシリカゲル TLC プレートの基線に沿って試料液を適用して溶媒系 D (

) で展開した。風乾後、オートラジオグラフ

イー画像により、薄層板上の代謝物 をマークし、それぞれを

掻き取って遠心管に入れ、 を加えて 10 分間の超音波処理後遠心分離した。

上澄液を分離後、沈渣を で抽出し、さらに水で抽出した。

これらの抽出液を合わせてロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒系 D を用いた TLC ラジオクロマトグラフィーに適用して それぞれの存在を確認

した。同様の手順で試料抽出液を薄層板 18 枚に適用した。

- 酵素処理；単離した それぞれの抽出液を濃縮、乾固後、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5) 中に溶解し、少量の酵素 (β -グルコシダーゼ) を加えて 37 °C で約 16 時間インキュベーションした後、高速液体クロマトグフィー (HPLC) 及び TLC で分析した。 を含有する試料は で分配し、有機画分を濃縮して質量分析器 (MS) で分析した。
- 酸処理；単離した それぞれの抽出液に塩酸を加えて 37 °C で約 16 時間インキュベーションし、HPLC で分析した。 を含有する酸処理液を中性にした後、C-18 固相抽出カートリッジに通して 及び で順次溶出し、 を濃縮して MS で分析した。
- 誘導体化； を含有する酸処理水溶液について、アルコール基を誘導体化する MTBSTFA 試薬 (N-*t*-ブチルジメチルシリル-N-メチルトリフルオロアセトアミド) を加え 50 °C で 3 時間処理した後、HPLC で分析した。さらに、 で分配して有機相の放射能を MS で分析した。また、酵素処理した 抽出液を で分配した液についても MTBSTFA 試薬を加えて誘導体化し、HPLC 及び MS で分析した。
- 放射能測定；各段階で得た試料にシンチレーターを加え、自動クエンチング補正付き液体シンチレーションカウンター (LSC) で放射能を測定した。
- 質量分析； を含有する酸処理液、 を含有する酵素処理液、及びそれらの誘導体化物含有試料について、質量分析器付きガスクロマトグラフィー (GC-MS) により分析した。質量分析器付き液体クロマトグフィー (LC-MS) は、GC-MS と比較すると、適切な手法でないと考えられた。

結 果：

- ； 酵素処理により、主な成分は HPLC 保持時間が約 20 分の極性化合物に変換されたが、保持時間約 15 分の位置にはマイナー成分が認められた (図 1、2)。これにより、は糖 (グルコース) の抱合体と考えられた。
- また、酸処理により保持時間が約 10 分の別の極性化合物に変換され (図 1、2)、酸処理では、より分解された状態であることが示された。
- 酸処理した の MTBSTFA 試薬処理前後の HPLC 分析結果を比較したところ、処理後にピークの保持時間が変化していた (図 3) ことから、酸処理した には の存在が示唆された。
- ； 酵素処理により、ほとんどの成分が HPLC 保持時間約 15 分の極性化合物に変換された (図 4)。
- 酸処理では複数の極性化合物に変換され、それらの内 1 つの化合物はクロマトグラフィーにより と同定された (図 4)。この化合物は酵素処理した の GC-MS による検討でも認められた (図 5、6) が、この成分に ^{14}C が含まれていることの確認は難しく から生じたとの確証は得られなかった。
- 酵素処理した MTBSTFA 試薬で誘導体化すると HPLC のクロマトグラムに変化が見られた (図 7) ことから、化合物に の存在が示唆された。酵素処理後 MTBSTFA による誘導体化した の GC-MS 分析ではその他の成分 (夾雑物) の量が多く、分析対象成分が極めて少量であったことから、化学的特徴付けに有用なデータは得られなかった。
- 酵素処理により から生成した主成分は、互いに異なる化合物であったが、酵素処理した のマイナー成分が酵素処理した の主成分と同じ

であることが判明した(図8)。また、酵素処理した のクロマトグラフィーから上記マイナー成分は無処理の とは異なることが明らかになった(図9)。さらに、無処理の と酸処理した の HPLC ピークは同じ位置にみられる(図10)ことから、無処理の と酸処理した は同じものであることが判明した。

一方で の酸処理では HPLC 保持時間が約 10 分の成分を生成するケースも認められ(図1、2、3)、 の酸処理による HPLC 保持時間約 10 分と約 18 分の 2 つの成分は、酸処理の程度が原因となり異なって生成した別個のものであると推定された。約 10 分の保持時間を有する酸処理後の は、酸とのより広範な反応により生成したものであり に相当すると推定された。

酵素処理および酸処理と各々の成分について下図にまとめた。

図1、酵素処理および酸処理と各々の成分

()内は HPLC におけるおよその保持時間(分)
* ; MTBSTFA を用いた誘導体化により変化したことから
OH 基を持つと考えられた。

以上の結果、 は、 β -グルコシダーゼ処理により変化したことから、いずれも低分子の糖(例えばグルコース)抱合体であることが示唆された。また、酸処理した が無処理の と同じであったことから、 を含むより複合した抱合体と考えられた。 の酵素処理では に一致しない成分が遊離した。 の酸処理により が生成したが、これは酸とのより広範な反応により生成したアーティファクトであると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図2、無処理及び β -グルコシダーゼ酵素処理、酸処理した

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図3、 MTBSTFAによる誘導体化前後の酸処理した
HPLCラジオクロマトグラム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図4、無処理及び β -グルコシダーゼ酵素処理、酸処理後の

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図5、酵素処理 のGC-MSのトータルイオンクロマトグラム、
m/z79のマスキロマトグラム、保持時間4.00分のマススペクトル

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図 6、 のライブラリースペクトラム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図7、MTBSTFAによる誘導体化前後の β -グルコシダーゼ酵素処理した
のHPLCラジオクロマトグラム

図 8、 β -グルコシダーゼ酵素処理後の
HPLCラジオクロマトグラム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

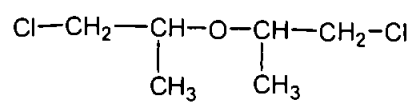
図9、 β -グルコシダーゼ酵素処理後の と無処理の の
HPLCラジオクロマトグラム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図10、 無処理の と酸処理後の のHPLCラジオクロマトグラム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

DCIP の植物体における代謝・分解



(I) 親化合物

3. 土壌代謝

(1) DCIP の土壌における運命および光分解

(資料 M6)

試験機関：

報告書作成年：

供試化合物：DCIP (純度：記載なし)

供試土壌： 東京都農試土壌 (火山灰土／壤土)
広島県農試土壌 (湖成沖積土／砂壤土)
茨城県農試土壌 (火山灰土／壤土)

試験方法： i) DCIP の土壌中への残留量と気中へ蒸散する量を把握するため、密閉できる容器中に 100～150 g の土を入れ、DCIP 10 mg (アセトン溶液として 1 mL) を 1 cm の深さに注入し、窒素ガス 30 mL/分を流してフロリジル 10 g に蒸散してくる DCIP を吸収捕集した。3, 6, 17, 48, 72 および 168 時間経過後、土壌中及びフロリジルに吸収された DCIP をヘキサンで抽出後ガスクロマトグラフィーを用いて定量した。
なお、試験には東京都農試土壌および広島県農試土壌を用いた。

ii) 滅菌土壌と非滅菌土壌における DCIP の消長の差異を把握するために、温度 27 ℃、湿度 92 % に一週間保存した土壌 (100～150 g) に DCIP 10 mg (アセトン溶液として 1 mL) を 1 cm の深さに注入し、穴をあけたアルミホイルでふたをし、前述の条件で再び保存した。3 日および 7 日経過後土壌中の DCIP 量を分析した。
なお、試験には東京都農試土壌および広島県農試土壌を用いた。

iii) DCIP の土壌中での拡散を把握するために、摺合せ円筒管を数個接続して土壌をつめ、その一端に DCIP 原液 0.5 mL を滴下し一定時間経過後各々の円筒管内の土壌中の DCIP 量を分析した。
なお、試験には茨城県農試土壌を用いた。

iv) 土壌微生物による DCIP の分解を把握するため、500 mL 容三角フラスコを用い土壌 10 g と DCIP 500 mg を滅菌水 100 mL 中に懸濁し、綿栓して 30 ℃ で 0, 24, 72, 144 および 168 時間振盪培養後、上澄液をとり を定量した。
なお、試験には東京都農試土壌および茨城県農試土壌を用いた。

v) DCIP の紫外線による分解を把握するために、DCIP 約 500 mL を石英製光化学反応器に入れ、スターラーで攪拌しながら低圧水銀灯による紫外線を照射し、0, 3, 7, 12 および 36 時間経過後 2 mL を抜き取り親化合物、
および をガスクロマトグラフィーにより定量した。

試験結果：

i) DCIP の土壌における消長と気中への蒸散

経過時間 (hr)	DCIP の 量 (mg)					
	東京都農試土壌			広島県農試土壌		
	土壌中	気 中	合 計	土壌中	気 中	合 計
1	—	—	—	9.150	0.150	9.300
3	8.875	0.322	9.197	6.850	1.100	7.950
6	8.475	0.529	9.004	5.000	4.050	9.050
17	5.763	3.005	8.768	1.500	6.750	8.250
48	1.523	7.643	9.166	0.250	9.600	9.850
72	1.220	7.825	9.045	0.100	9.840	9.940
120	—	—	—	0.135	9.980	10.115
168	0.323	8.500	8.823	—	—	—

—：測定なし

土壌中の DCIP が添加量の 50% 及び 10% となったのは、東京都農試土壌では処理後 19 時間及び 72 時間、広島県農試土壌では 6 時間及び 24 時間であった。

合計の回収量はどの分析時でも添加量の約 90% であり気中の DCIP 量は土壌中の DCIP 量の減少と裏腹の関係にあった。

また砂壌土 (広島県農試土壌) の方が壤土 (東京都農試土壌) においてより蒸散が早かった。

ii) 滅菌処理、非滅菌処理土壌における DCIP の消長

経過時間 (日)	DCIP の 量 (mg)			
	東京都農試土壌		広島県農試土壌	
	滅菌処理	非滅菌処理	滅菌処理	非滅菌処理
3	12.63	9.82	3.55	3.41
7	2.59	2.04	0.80	1.02

滅菌土壌及び非滅菌土壌での DCIP の消長には大差はなかった。

砂壌土 (広島県農試土壌) の方が壤土 (東京都農試土壌) よりも DCIP の減少が早かった。

iii) DCIP の土壌中における拡散

経過時間 (hr)	水平距離区分における DCIP の量 (ppm)				
	茨城県農試土壌				
	(cm) 3~6	6~9	9~12	12~15	15~18
24	288.7	116.9	—	—	—
48	496.5	225.2	75.7	—	—
72	1280.0	323.1	151.8	51.2	—
96	1282.0	359.2	215.3	83.0	37.0

—：測定なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

iv) DCIP の土壌微生物による分解物として が次の様に
 に検出された。

経過 時間 (hr)	濃度 (ppm)		
	東京都農試土壌	茨城県農試土壌	
	栄養液無添加	栄養液 無添加	24hr 時 栄養液 400 mL 添加

栄養液 = Nutrient Broth - : 測定なし

の量は初期を除き増大しなかった。

v) DCIP の紫外線による分解物として が同定され、次の様な検出率であった。

経過 時間 (hr)	面積百分率 (%)		
			DCIP
0			99.84
3			99.81
7			99.77
12			99.69
36			99.47

各々の分解物が経時的に増大するのがみられた。

(2) ^{14}C -DCIP/土壤中における代謝試験

(資料 M7)

試験機関：

報告書作成年：

供試標識化合物：bis (2-chloro-1-methylethyl) ether

* 標識部位

放射化学的純度；

比活性；

供試土壌： 火山灰土壌
砂壤土

試験方法：

好氣的土壌試験；

1. オープン試験 (火山灰土壌、砂壤土)

火山灰土壌 41 g (乾燥土壌 30 g 相当) および砂壤土 32.2 g (乾燥土壌 30 g 相当) にそれぞれ非放射性 DCIP および ^{14}C -DCIP のアセトン溶液を土壌表面処理した。施用した放射能量は、火山灰土壌では約 22.7 μCi 、砂壤土では約 25.2 μCi であった。また、施用量は、それぞれ 1.06 mg DCIP/g 土壌、1.07 mg DCIP/g 土壌であった。

DCIP 処理後、土壌の保水力が 60 % になるようにした。各土壌を入れた皿をガラスのカラム (高さ 60 cm \times 内径 10 cm) に入れ、加湿した空気流をゆっくりと (約 20 mL/分) 通し、一連のトラッピング溶液に導いた。DCIP 施用後、0, 1, 3, 7, 14, 28, 56, 84, 112 および 168 日目に各土壌タイプの皿を分析のため採取した。試験は暗室で 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

2. クローズド試験 (火山灰土壌、砂壤土)

火山灰土壌 86.2 g、および砂壤土 65.8 g にそれぞれ非放射性 DCIP および ^{14}C -DCIP を処理し、直ちにフラスコの栓をし恒温室に移し、分析時まで暗室で 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。土壌に施用した放射能量は約 43.0 μCi で、1.06 mg DCIP/g 土壌 (乾燥土壌) 相当であった。土壌の保水力が 60 % になるようにした。サンプル採取は、DCIP 施用直後および 14, 28 日目に行った。

嫌氣的土壌試験；

土壌改良剤として粉末状にしたワラを添加し土壌と混和し、蒸留水で湛水にした後水を抜き、窒素を満たして嫌氣的条件とした。嫌氣的条件に調整した火山灰土壌 (乾土あたり 30 g) および砂壤土 (乾土あたり 30 g) に、非放射性 DCIP および ^{14}C -DCIP を処理した。

各土壌に施用した放射能量は約 12.1 μCi で、0.53 mg DCIP/g 土壌 (乾燥土壌) 相当であった。施用直後、30, 60 日目に分析に供した。試験は暗室で 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

分析方法：

残留放射能の抽出と測定；

1. 好氣的土壤試験

①オープン試験

各皿の内容物全部に 約 100 mL を加えて室温で 30 分間振とう抽出した。抽出物と土壤固体を 15 °C、3000 rpm で 30 分間遠心分離し、上澄抽出液 1 mL を用いて液体シンチレーションカウンター (以下、LSC) で放射能を測定した。放射能の測定は外部標準チャンネル比法でクエンチング補正を行った。

土壤固形物については、1、2 回再抽出した後、不溶性土壤固形物約 0.4 g を用いて燃焼-LSC で放射能を測定した。

また、溶剤トラップ液および保存カラムと最初のトラップを繋いだチューブの洗浄液についても LSC で放射能を測定した。洗浄後のチューブについては燃焼-LSC で放射能を測定した。

②クローズド試験

各フラスコの内容物全部に を 1 回につき約 150 mL 加え、3 回抽出した。抽出液と不溶性土壤固形物について前述と同様に放射能を測定した。

2. 嫌氣的土壤試験

各瓶の内容物全てを 15 °C、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液 1 mL を用いて LSC で放射能を測定した。残留した土壤固形物に を加えて 2 回抽出した後、抽出液と不溶性土壤固形物の放射能量を前述と同様に測定した。

土壤抽出物の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析；

1. 好氣的土壤試験

①オープン試験

¹⁴C-DCIP 施用後、28 日目まで採取した土壤サンプルの最初の を分析した。抽出物は 0.5 μm のフルオロポア・フィルターでろ過し、蒸留水を加えて HPLC 移動相とほぼ同じ組成にした。この液を HPLC に注入し、自動フラクションコレクター全カラム溶出液の 1 分フラクションを採取し LSC で放射能を測定した。

また、土壤サンプルの抽出物を 、流速 2 mL のインクラティックコンディションで HPLC を用いて分析した。最後の方の抽出物については、全放射能が HPLC カラムから溶出していないものがあることから下記の勾配溶離プログラムを使って再分析した。

勾配溶離 0-15 分
15-27 分
27-35 分

流速 2 mL/分、勾配はウォーターモデル 660 溶剤プログラマーで制御

また、溶剤トラップ物質については、¹⁴C-DCIP 施用後 1~14 日目に保存カラムから採集した最初 のトラップ物質の 50 μL をインクラティックコンディションで HPLC/フラクションコレクションにより分析した。

②クローズド試験

土壌サンプルについて、第1および第2 を10 mLずつプールし、前述の様に調整しインクラティックコンディションで HPLC/フラクションコレクションにより分析した。

2. 嫌氣的土壌試験

30 および 60 日目の同じ土壌サンプルの 2 つの上澄液を同量プールし、0.5 μm のセロテートフィルターでろ過した。 を加え、HPLC 移動相と同じ組成にした後、インクラティックコンディションで HPLC/フラクションコレクションにより分析した。

結 果：

好氣的土壌試験；

1. オープン試験

(a) 火山灰土壌

土壌サンプルに残留した全放射能は、1日後約 20 %、3日後 2 %、7日後 0.7 %と急速に減少した。更に、84 日後約 0.4 %、168 日後約 0.3 %であったが、このほとんどは抽出できないものであった。

この急速な減少は、トラッピング溶液から回収された揮発性放射能の量と一致した。この大部分の揮発性物質は未変化の親化合物 DCIP であった。また、CO₂と考えられる揮発性化合物が実験期間中、低いレベルではあるが一定して測定された。

(b) 砂壤土

火山灰土壌の結果と非常に類似していた。

カラムからの揮発性放射能の総累積放散量は、1日後 70.6 %、3日後 91.9 %、7日後 93.1 %と増加した。

揮発性物質の大部分が未変化の親化合物 DCIP であった。

火山灰土壌と同様な割合で、CO₂の放散が行われていることが示された。

表 1. オープン試験における放射能分布の経時変化 (処理量に対する割合 (%))

土 壌	施用後 日 数	揮発性 物 質	土 壌 中 残 留			回 収 率
			抽出物	抽出残渣	合計	
火山灰 土 壌	1	64.5	19.7	0.62	20.3	84.8
	3	85.9	1.83	0.35	2.18	88.1
	7	87.9	0.46	0.23	0.68	88.6
	14	88.3	0.26	0.18	0.43	88.7
	84	91.3	0.06	0.38	0.44	91.7
	168	91.4	0.04	0.26	0.29	91.7
砂 壤 土	1	70.6	16.2	0.42	16.6	87.2
	3	91.9	0.64	0.48	1.12	93.1
	7	93.1	0.37	0.58	0.95	94.1
	14	93.3	0.29	0.43	0.72	94.0
	84	90.0	0.15	0.29	0.44	90.5
	168	90.0	0.11	0.19	0.30	90.4

表中の数値は全て 2 サンプルの平均値 (申請者算出)

2. クローズド試験

両土壌においていずれも容易に抽出され、主要放射能成分は未変化の DCIP であったが、非抽出性放射能は時間の経過と共に増加し、28 日後には約 3 % になった。

本試験のように揮発による消失が起こらない状況において、微生物活性が DCIP 分解に有意な影響を及ぼすとは考えられなかった。

DCIP は本実験条件下において安定と考えられた。

表 2. クローズド試験における放射能分布の経時変化 (処理量に対する割合 (%))

土壌	施用後 日 数	抽出物		抽出残渣	回収率
		DCIP	未同定		
火山灰 土壌	0	98.4	2.3	1.7	102.4
	14	101.9	2.2	2.8	107.1
	28	99.0	2.0	3.4	104.5
砂壤土	0	98.5	1.6	0.6	101.5
	14	91.7	1.8	3.2	96.6
	28	93.5	1.5	3.1	98.1

嫌氣的土壌試験；

試験化合物の施用後、放射能のほとんどは(火山灰土壌で 74.5 %、砂壤土で 81.4 %) 上澄液に存在した。残留放射能はアセトニトリル中に容易に抽出されたが、1.5 % (火山灰土壌) および 0.4 % (砂壤土) が抽出されず残った。

この非抽出性放射能は、60 日後には火山灰土壌で 5.1 % および砂壤土では 2.5 % になった。

上澄液および土壌抽出物の大部分が未変化の DCIP であり、分解物はいずれも 1% 以下であった。

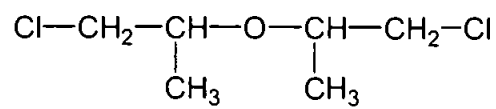
表 3. 嫌氣的土壌試験における放射能分布の経時変化 (処理量に対する割合 (%))

土壌	施用後 日 数	上澄液 + 土壌抽出物		抽出残渣	回収率
		DCIP	未同定		
火山灰 土壌	0	96.0	2.4	1.5	100.0
	30	92.3	1.5	3.3*	97.2*
	60	89.1	1.6	5.1*	95.9*
砂壤土	0	95.3	1.89	0.4	97.7
	30	90.3	1.84	1.5*	93.5*
	60	87.8	2.0	2.5*	92.2*

* 数値は 2 サンプルの平均値 (申請者算出)

以上の試験結果により、土壌からの DCIP 消失の主要ルートは揮発であると考えられ、更に、一部土壌残留放射能はゆっくり無機物化して CO₂ になると考えられる。

DCIP の土壌における代謝・分解



(I) 親化合物

4. 水中運命に関する試験

(1) 加水分解

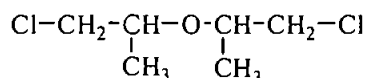
加水分解試験

(資料 13)

試験機関

報告書作成年

供試化合物：DCIP



ビス(2-クロロ-1-メチルエチル)エーテル

供試水溶液：Clark-Lubs の緩衝液を使用した。

pH 5: 0.1M 酢酸水素カリウム 50 mL 及び 0.1N NaOH 23.85 mL を蒸留水で 100 mL とした。

pH 7: 0.1M リン酸一カリウム 50 mL 及び 0.1N NaOH 29.63 mL を蒸留水で 100 mL とした。

pH 9: 0.1M 酢酸/0.1M KCl 50 mL 及び 0.1N NaOH 21.30 mL を蒸留水で 100 mL とした。

試験方法： 1000 ppm の DCIP 標準アセトニトリル溶液 2.5 mL を分取し、あらかじめ滅菌済みの pH 5、pH 7、pH 9 の各緩衝液 500 mL に添加後、軽く攪拌して、5 µg/mL の試験溶液とした。これらの試験溶液を、分注器を用いて 10 mL 容共栓試験管に満水になるまで分取し、試験管を直ちに密栓シールし逆さにして試験管立てに置いた。これを、25 ± 1 °C の低温恒温器内の暗所に保管した。試験溶液は試験開始直後、31 日後、60 日後、122 日後、151 日後および 180 日後の各時期にそれぞれ 2 連ずつサンプリングした。試験溶液より 10 mL を分取し、あらかじめ を正確に 10 mL と 10 mL を入れた 100 mL 容分液ロートに入れた。塩酸 (1 規定) および水酸化ナトリウム溶液 (0.5 規定) を用いて中和 (pH 5 および pH 9 緩衝液試料について) 後、振とうした。静置分離後、 を液相分離ろ紙を通し脱水して測定溶液とした。測定溶液は残留量に応じて で希釈後、その 1 µL をガスクロマトグラフ-質量分析計に注入し、得られたクロマトグラムのピーク高さより DCIP 濃度を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

結果： 試験結果を以下に示す。

経過日数	(μg/mL)		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
直後	4.7	4.8	4.8
31日後	4.5	4.6	4.2
60日後	4.2	4.3	4.2
122日後	3.7	3.9	3.6
151日後	3.8	4.0	3.7
180日後	3.6	3.8	3.6

試験の初期濃度 : 5.0 μg/mL

検出限界 : 0.2 μg/mL

試験温度 : 25±1℃

試験期間 : 1991.6~1992.3

以上の結果から、pH 5、pH 7 および pH 9 のいずれの条件においてもDCIPは水溶液中で加水分解されにくく安定であることが明らかになった。

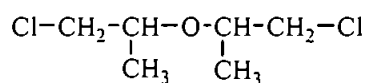
(2) 水中光分解

水中光分解試験

(資料 14)

試験機関
報告書作成年

供試化合物：DCIP



ビス(2-クロロ-1-メチルエチル)エーテル

供試水： 滅菌蒸留水 (オートクレーブ 滅菌)

自然水 (採取場所：荒川水系秋ヶ瀬取水口/採取年月日： 、 pH 7.2、
BOD 1.3 mg/L、無滅菌)

光源： 蛍光ケミカルランプ (東芝 FL-20-BL)、光学フィルタ無使用

光量： 滅菌蒸留水 25.5 W/m² (310-400 nm)

自然水 25.5 W/m² (310-400 nm)

試験方法：

光分解； 1000 mg/L のDCIP標準アセトニトリル溶液 2.0 mL を分取し、自然水および滅菌蒸留水 500 mL に加え、軽く攪拌して設定濃度 4 μg/mL の試験溶液とした。試験溶液を分注器で 10 mL 容共栓付の石英製試験管に満水になるまで分注した。密栓後、光照射板上に逆さの状態に静置し、光を照射した (試験温度 25±2 °C)。対照区試料は同様に試験管に分取後、密栓し逆さに試験管立てに立て、低温恒温器 (25±1 °C、暗室) 内に収納した。光照射期間は滅菌蒸留水、自然水とも 7 日間であった。

分析方法；試験開始直後、1、2、3、4 および 7 日に採取した試験溶液より 10 mL を分取し、あらかじめ を正確に 10 mL と 10 mL を入れた 100 mL 容分液ロートに入れた。これを振とう、静置分離後、 を液相分離ろ紙を通し脱水して測定溶液とした。測定溶液は残留量に応じて で希釈後、その 1 μL をガスクロマトグラフ-質量分析計に注入し、得られたクロマトグラムピーク高さよりDCIP濃度を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

半減期の計算；経過日数を縦軸に、濃度の常用対数を横軸にとり、最小二乗法による直線回帰式を求め、その相関係数が 0.90 以上のものを採用した。回帰式から推定初期濃度を求め、その 2 分の 1 を推定半減濃度として、回帰式から推定半減期を求めた。

結果： 蒸留水と自然水を用いた結果を以下に示す。

表 1. DCIP の濃度変化

供試水	処理後日数	光照射区	暗所対照区
		平均値 (μg/mL)	平均値 (μg/mL)
蒸留水	直後	3.5	3.5
	1日後	3.5	3.4
	2日後	3.4	3.4
	3日後	3.4	3.5
	4日後	3.2	3.5
	7日後	3.2	3.4
自然水	直後	4.1	4.0
	1日後	4.2	4.0
	2日後	4.0	3.9
	3日後	4.0	4.0
	4日後	4.2	3.9
	7日後	4.0	3.7

以上の結果、蒸留水 照射区についてのみ回帰式の相関係数が 0.90 以上であり、推定半減期を算出した。

蒸留水 照射区の推定半減期

$$t_{1/2} = \log(\text{推定半減濃度}) \times (-126.253436) + (69.35614019)$$

$$\text{推定初期濃度} = 3.54275087 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{推定半減濃度} = 1.77137543 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{相関係数} = -0.9030746$$

$$\text{推定半減期} = 38.0060714 \text{ 日}^{\ast}$$

蒸留水の暗所対照区および、自然水の光照射区、暗所対照区では分解が少なく半減期の推定は不能であった。

※ 申請者注：次ページ【申請者注】に記したように蒸留水光照射区における DCIP の光分解性はなく、半減期の推定は不能と考えられた。

【申請者注】

蒸留水 光照射区での半減期について以下のように考察した。

DCIP はその分子構造内に紫外・可視吸光の原因となる共有結合的不飽和基 (C=C、C=O、N=N、N=O など) を持たず、280nm 以上の波長領域ではまったく吸光性を示さない。一般に蒸留水中での農薬の光分解は分子が吸収した光エネルギーにより起こる直接光分解によるものであるが、蒸留水中において 280nm 以上の光を吸収しないので光分解性はないと考えられる。さらに自然水を用いた試験では、光照射区、暗所対照区共に光分解性はないとの結論に至っており、直接光分解はないものと推測される。

蒸留水 光照射区の測定結果について統計的な解析を行い、光照射区の蒸留水中の DCIP 濃度と照射時間 (日数) についての回帰分析の結果、照射時間のちがいによる DCIP 濃度の分布には差があるとは言えなかった。また、DCIP の濃度が光照射の有無、照射時間の長さによって変化したかどうかを二元配置分散分析法により検定した結果、光照射の有無や照射時間の長さの違いにより DCIP 濃度に有意な差があるとは言えなかった。

以上のことから、DCIP の蒸留水を用いた光照射区で算出された半減期は光分解性を示したのではなく、実験誤差による測定値の変動を濃度減少と捉えて計算されたものと考えられ、本質的には水中光分解性はないと判断する。

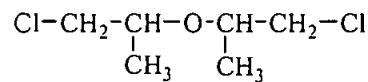
5. 土壌吸着試験

(資料 12)

試験機関

報告書作成年

供試化合物：DCIP



ビス(2-クロロ-1-メチルエチル)エーテル

供試土壌：

土壌 No.	I	II	III	IV
土壌群名	細粒黄色土	灰色台地土		
分類	畑土壌	畑土壌	畑土壌	畑土壌
採取場所	福島農試内	愛知農総試内	熊本試験地内	宮崎試験農場内
土性	CL	SCL	SiCL	S
砂 %	53.4	68.0	30.6	87.1
シルト %	22.8	14.5	49.7	5.7
粘土 %	23.8	17.5	19.7	7.2
有機炭素含有率 %	1.08	0.76	12.91	1.50
pH H ₂ O	7.6	7.1	7.4	7.2
KCl	6.7	6.0	6.7	6.4
陽イオン交換容量	13.5	7.9	49.9	7.0
りん酸吸収係数	540	290	1850	660
粘土鉱物の種類	カオリン鉱物 ハ ⁺ -ミキュライト	カオリン鉱物 イライト	アロフェン ハ ⁺ -ミキュライト	ハロサイト
土壌水分含量 %	2.36	1.48	20.34	1.75

陽イオン交換容量の単位：me/100g

試験方法：

吸着平衡化時間の測定；各土壌 5 g を 50 ml 容共栓付遠沈管に秤り取り、これに蒸留水 5 mL を加え室温で 24 時間ゆっくり振とうする。これに、DCIP 1.00 ppm の 0.01 M CaCl₂ 標準溶液 20 mL を加えて密栓し、25±1℃で振とうする。3、8、16 時間後にそれぞれサンプリングし、遠心分離した後、上澄み液の 20 mL を分取して水相の分析と同様に操作し、各時間における水相中の DCIP の濃度を求める。DCIP の水相濃度の変化率は次式により求める。

$$\text{濃度変化率 (\%)} = \{[(n \text{ 回時の濃度}) - (n-1 \text{ 回時の濃度})] / (n-1 \text{ 回時の濃度})\} \times 100$$

この濃度変化率が 10 % 以内になった経過時間を平衡化時間とする。

物質収支；物質収支は、吸着平衡化後の水相及び土壌中の DCIP 量を測定して両者を加え、添加した DCIP 量で割って求める。各土壌とも、1.00 ppm の 0.01 M CaCl₂ 標準溶液を添加したサンプルについて測定した。その結果を表に示す。

土壌 No.	初期添加量 (ug) a	水相中物質質量 (ug) b	残留物中物質質量 ^{a)}			物質収支 (b+c)/a × 100 (%)	物質収支平均 (%)
			土壌中 (ug) c	水分中 (ug)	合計 (ug)		
I	19.93	19.17	0.018	3.749	3.767	96.28	96.16
	19.91	19.10	0.022	3.789	3.811	96.04	
II	19.75	19.69	0.033	3.565	3.598	99.86	101.7
	19.93	20.65	0.002	3.852	3.854	103.6	
III	20.65	12.84	7.180	3.130	10.31	96.95	94.74
	20.37	12.17	6.681	3.099	9.780	92.54	
IV	20.02	17.81	0.122	3.440	3.562	89.57	90.80
	19.75	18.01	0.166	3.462	3.628	92.03	

a)：残留物(土壌相試料)は水分を含んだ土壌。残留物の分析結果(土壌相回収率で補正)を合計値とし、合計値から水分中物質質量を引いて土壌中物質質量を求める。

$$\text{水分中物質質量} = \text{平衡濃度} \times (\text{全水分量} - \text{水相試料採取量}) / \text{回収率}$$

$$\text{土壌中物質質量} = \text{残留物中物質質量合計値} - \text{水分中物質質量}$$

吸着操作；各土壌 5 g を 50 ml 容共栓付遠沈管に秤り取り、これに蒸留水 5 mL を加え室温で 24 時間ゆっくり振とうする。これに、所定濃度の DCIP 1.00 ppm の 0.01 M CaCl₂ 標準溶液 20 mL を加えて密栓し、25±1℃で 3 時間振とうする。振とう後、遠心分離(25±1℃、3000 rpm、20 分)を行い、上澄み液より 20 mL を分取し、水相の分析に供して水相濃度を求める。水相濃度と水分量より、水相に存在する DCIP 量を求め、添加量からこれを減じて土壌吸着量を算出する。なお、添加 DCIP 標準溶液は、5.00、1.00、0.20 及び 0.04 ppm の 4 濃度を用い、それぞれ 2 連で試験を行った。

分析方法；水相試料は で抽出し、フロリジルカートリッジカラムで精製した。これを ECD-ガスクロマトグラフで分析した。土壌試料は Dean & Stark 型抽出装置に入れ、加熱蒸留して で抽出した。これをフロリジルカラムで精製し、ECD-ガスクロマトグラフで分析した。

結果： 試験結果は以下の通りである。

(1) K_F^{ads} 及び K_F^{adsOC}

土壌	1/n ¹⁾	$K_F^{ads1)$	r ¹⁾	OC % ²⁾	$K_F^{adsOC3)$
I	1.909	0.3087	0.9971	1.08	28.58
II	3.547	0.05383	0.9882	0.76	7.082
III	1.073	4.584	0.9980	12.91	35.51
IV	1.978	0.4617	0.9767	1.50	30.78

1) Freundlich の吸着等温式による定数項と相関係数

2) 土壌中の有機炭素含有率

3) K_F^{ads} を各土壌の OC % で割り求めた有機炭素吸着係数

(2) 吸着平衡化時間

土壌 No.	振とう時間 (時間)	水相中の DCIP 濃度 (ug/g)		※変化率 (%)
		実測値	平均	
I	3	0.5996 , 0.5980	0.5988	-
	8	0.6134 , 0.6009	0.6072	1.40
	16	0.6046 , 0.5996	0.6021	-0.84
II	3	0.6416 , 0.6394	0.6405	-
	8	0.6378 , 0.6336	0.6357	-0.75
	16	0.6301 , 0.6277	0.6289	-1.07
III	3	0.4221 , 0.4171	0.4196	-
	8	0.4071 , 0.4055	0.4063	-3.17
	16	0.3909 , 0.3885	0.3897	-4.09
IV	3	0.6426 , 0.6390	0.6408	-
	8	0.6500 , 0.6461	0.6480	1.12
	16	0.6445 , 0.6437	0.6441	-0.60

※変化率 = [(n 回時の濃度) - (n-1 回時の濃度)] / (n-1 回時の濃度) × 100

各土壌とも、3、8、16 時間後の水相中の DCIP 濃度がほとんど変わらなかったため、3 時間を平衡化時間とした。

4. まとめ

DCIP の哺乳動物、植物、土壌における代謝の要約は下記のとおりであり、代謝の経路及び結果の概要を図及び表に要約した。

動物代謝 (資料 M1, M2, M3) :

雄ラットを用いた代謝試験 (資料 M1) では、25 mg/kg の経口単回投与で投与 1 時間後に最高血中濃度 0.90 ppm に達した。雌雄ラットを用いた代謝試験 (資料 M3) では、C_{max} は 10 mg/kg 投与の雌雄で各々 2.04、2.68 μg/mL、100 mg/kg 投与の雌雄で各々 16.1、15.9 μg/mL であり、T_{max} は 10、100 mg/kg、雌雄ともに 2 時間、T_{1/2} (α相) は 10 mg/kg 投与の雌雄で各々 11.75、10.13 時間、100 mg/kg 投与の雌雄で各々 25.02、32.09 時間であった。AUC₀₋₂₄ は 10 mg/kg 投与の雌雄で各々 60.8、75.2 μg×時間/mL、100 mg/kg 投与の雌雄で各々 753、904 μg×時間/mL であった。10 または 100 mg/kg の単回投与、連続投与ともに雌雄とも 5 日間投与量の 59~65 % が尿中に排泄され、しかもほとんどが 24 時間以内に排泄された。糞中排泄率は投与量の 0.9~1.4 %、呼気中排泄は 27~35 % であった。投与 5 日後にラットの体内に残存していた放射能は 4 % であった。

臓器・組織中で DCIP は脂肪、消化管および腎臓に多く検出されたが、時間の経過とともに減少していった。組織への蓄積量及び減少速度からみて、DCIP は脂肪親和性が高いものと考えられる。

主要代謝経路として、(1) 尿中に排泄される代謝経路、(2) 呼気中に二酸化炭素まで代謝される 2 つが確認された。

二酸化炭素への経路は、親化合物の

が生成され、また

が生成される。更に

は

となり、これら中間代謝物がさらに分解されて

になると推定された。

植物代謝 (資料 M4, M5, M12, M13, M14) :

ハクサイの代謝試験 (資料 M4) では、ハクサイ体内に吸収された DCIP は、動物代謝と同様に及び

を生成し、さらにこれら中間代謝物も比較的速かに分解されると推定された。また

は

していくことが確認

(資料 M5) され、これがハクサイの主要代謝経路であった。

トマトの代謝試験 (資料 M12) では、4.79 mL/m² の薬量で土壌処理した供試標識化合物は植物体に吸収され、果実および葉の放射能は植付け 41 日後に最高となり、それぞれ 2.164、10.249 mg (DCIP 当量) /kg (生重量) であったが、82 日後には著しく減少した。果実および葉の代謝物の多くは、天然成分の および と結合していると考えられた。

DCIP 処理土壌で生育させたトマト葉試料に存在する代謝物の 同定を試みた (資料 M14)。

は、β-グルコシダーゼ処理により変化したことから、いずれも低分子の糖 (例えばグルコース) 抱合体であることが示唆された。また、酸処理した が無処理のと同じであったことから、 を含む、 と考えられた。

かんきつの代謝試験 (資料 M13) では、5.21 mL/m² の薬量で土壌処理した供試標識化合物は植物体に吸収され、処理 1 日後の果皮および果肉中の放射能はそれぞれ 0.072 mg (DCIP 当量) /kg および検出限界以下であったが、147 日後には 0.343 および 0.063 mg (DCIP 当量) /kg となった。土壌処理した検体は果樹に吸収および代謝されて多数の極性代謝物および抱合体が形成された。収穫時 (処理 147

日後)の果皮および果肉試料に DCIP は検出されなかった。代謝物
は
に相当した。

土壌代謝 (資料 M6, M7) :

好気的条件下の土壌代謝試験 (資料 M7) では、2種類の土壌に約 1 mg DCIP/g 土壌表面処理し、好気的条件下で 168 日間、暗黒下 27 ± 2 °C で保持した。火山灰土壌では土壌サンプルに残留した全放射能は、1 日後約 20 %、3 日後 2 %、7 日後 0.7 % と急速に減少した。砂壌土では揮発性放射能の総累積放散量は、1 日後 70.6 %、3 日後 91.9 %、7 日後 93.1 % と増加した。いずれの土壌でも、DCIP の消失は気中への蒸散が大部分であった。また DCIP の一部は、動物及び植物代謝と同様に
及び
を生成し、さらに二酸化炭素へと分解すると推定された。

嫌気的条件下の土壌代謝試験 (資料 M7) では、火山灰土壌および砂壌土に 0.53 mg DCIP/g 土壌 (乾燥土壌) 処理し、嫌気的条件下で 60 日間、暗黒下 27 ± 2 °C で保持した。DCIP 施用後、放射能のほとんどは (火山灰土壌で 74.5 %、砂壌土で 81.4 %) 上澄液に存在した。残留放射能は中に容易に抽出されたが、1.5 % (火山灰土壌) および 0.4 % (砂壌土) が抽出されずに残った。上澄液および土壌抽出物の大部分が未変化の DCIP であり、分解物はいずれも 1 % 以下であった。

紫外線による DCIP の分解試験 (資料 M6) では、分解物として
及び
が検出された。

加水分解試験 (資料 13) :

pH 5.0、7.0 および 9.0 の緩衝溶液中で 6 ヶ月経過してもほとんど分解は認められず、いずれの条件においても DCIP は水溶液中で加水分解されにくく安定であった。

水中光分解試験 (資料 14) :

4 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で自然水あるいは蒸留水に添加し、 25.5 W/m^2 (310-400 nm) の強度で 7 日間光照射 (光源: 蛍光ケミカルランプ) した場合、自然水中での分解は認められなかった。蒸留水中での推定半減期は約 38 日と計算されたが、これは光分解性を示したのではなく、実験誤差による測定値の変動を濃度減少と捉えて計算されたものと考えられた。DCIP はその分子構造内に紫外・可視吸光の原因となる共有結合的不飽和基を持たない。また、蒸留水中での農薬の光分解は一般的に分子が吸収した光エネルギーにより起こる直接光分解によるものであるが、DCIP は蒸留水中において 280nm 以上の光を吸収しない。以上のことおよび自然水中での光分解性がないことから、DCIP は蒸留水も含め水中光分解性はないと考えられた。

土壌吸着試験 (資料 12) :

細粒黄色土、灰色台地土での吸着係数 ($K_{\text{Fads oc}}$) はそれぞれ 28.58、7.082、35.51、30.78 であり、またそれぞれの土壌中の有機炭素含有率 (oc %) は、1.08、0.76、12.91、1.50 であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

DCIP の動植物体および土壌における代謝・分解

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

代謝分解の概要

代謝・分解物		1 親化合物	投与量に対する 回収率 (%)	
動物体内ラット	125 µg/kg 経口 投与	尿中 0~24 h		
		血液中 0~12 h		
		呼気中 0~9 h		
	10 µg/kg 経口 投与	尿中	0~24 h ♂	
			0~120 h ♀	
		糞中	0~120 h ♂	
			0~120 h ♀	
		呼気中	0~120 h ♂	
			0~120 h ♀	
		胃腸管・ 内容物	120 h後 ♂	
			120 h後 ♀	
		肝臓	120 h後 ♂	
			120 h後 ♀	
		屍体	120 h後 ♂	
			120 h後 ♀	
合計	120 h後 ♂			
	120 h後 ♀			
血漿中	2 h後 ♂			
	2 h後 ♀			
胆汁中	0~24 h ♂			
	0~24 h ♀			
植物体内 (ハクサイ)	土耕法(連続暴露) 莖葉 13日後	○		
	土耕法 莖葉 96 h後	2.18~3.75		
	水耕法(24時間暴露) 莖葉 6 h後	1.03~1.51		
	水耕法(24時間暴露) 莖葉 96h後	<0.006~<0.005		
	水耕法(連続暴露) 莖葉 13日後	25~27 (10.5~9.8)		

[注]：数値は投与量に対する%、または試料中総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%) を示している。ただし、() の数値は濃度 ppm を示す。

○は非放射性 DCIP を用いた代謝試験において確認されたことを示す。

#: 数値は予備試験における「代謝物IV (CO₂) / 呼気中の放射能」を投与量に対する%で示したもの

空欄は「測定せず」を表す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

代謝・分解物		1 親化合物	投与量に対する 回収率 (%)	
植物体内 (トマト)	果実	植付け 41 日後	<0.8 (<0.02)	
		82 日後	<0.9 (<0.003)	
	葉	植付け 1 日後	31.3 (0.172)	
		7 日後	15.1 (0.75)	
		41 日後	3.3 (0.34)	
		82 日後	<0.5 (<0.02)	
	土壌	植付け 1 日後	82.4 (7.02)	
		7 日後	78.8 (5.43)	
		41 日後	11.1 (0.20)	
		82 日後	<0.2 (<0.01)	
	大気	植付け 1 日後	100 (0.093)	
		7 日後	99.2 (0.271)	
植物体内 (かんきつ)	果皮	処理 1 日後	12.7 (0.009)	
		14 日後	19.4 (0.049)	
		85 日後	<0.7 (<0.003)	
		147 日後	<0.1 (<0.001)	
	果肉	処理 85 日後	<0.1 (<0.001)	
		147 日後	<0.1 (<0.001)	
	葉	処理 1 日後	5.5 (0.039)	
		14 日後	<1.9 (<0.068)	
		85 日後	<0.2 (<0.02)	
		147 日後	<0.1 (<0.01)	
	土壌	処理 1 日後	95.9 (7.79)	
		14 日後	62.8 (0.93)	
		85 日後	<0.4 (<0.003)	
		147 日後	<0.5 (<0.002)	

[注] : 数値は試料中総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%) : () の数値は濃度 ppm を示す。 : 空欄は「測定せず」を表す。

: その他には水溶性多糖類、遊離の代謝物、低分子の抱合体、塩基抽出物、分析代謝物以外の溶媒抽出物が含まれる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

代謝・分解物				1		投与量に対する 回収率(%)
				視化合物		
土 中	土壌に おける 消長と 気中へ の蒸散	壤土	処理後 48 時間	土壌中	15.23	
			気中	76.43		
		砂壤土	処理後 48 時間	土壌中	2.50	
			気中	96.00		
	滅菌土 壌での 消長	壤土	処理後 3 日	滅菌処理	126.3	
				非滅菌処理	98.2	
		砂壤土	処理後 3 日	滅菌処理	35.5	
				非滅菌処理	34.1	
	土壌微 生物に よる 分解	壤土 (東京)	処理後 24 時間			
			処理後 168 時間			
		壤土 (茨城)	処理後 24 時間			
			処理後 168 時間			
	好氣的 土壌 条件	開放 状態	火山灰土壌 14 日後		86~89	
			砂壤土 14 日後		87.8~91.1	
閉鎖 状態		火山灰土壌 14 日後		101.9		
		砂壤土 14 日後		91.7		
嫌氣的 土壌 条件	火山灰土壌 60 日後		89.1			
	砂壤土 60 日後		87.8			
加 水 分 解	緩衝液 pH 5.7.9 (25±1℃)		0 日後	94~96		
			180 日後	72~76		
水 中 光 分 解	蒸留水 (滅菌)		1 日後	88		
			3 日後	85		
			7 日後	80		
	自然水		1 日後	105		
			3 日後	100		
			7 日後	100		

[注]: 数値は投与量に対する%

: () の数値は濃度 ppm を示す。

: ○は非放射性 DCIP を用いた代謝試験において確認されたことを示す。

: 空欄は「測定せず」を表す。

: * の数値は検出された代謝物 V を視化合物換算し、視化合物処理量に対する%で示したものの。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

[附] DCIPの開発年表

年(1962～)	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98	00	02	04	06	08	10	
化合物の選抜																										
特許																										
魚介類に及ぼす影響																										
魚介類以外の有用生物に対する影響																										
農薬残留量																										
適用農作物及び適用病害虫																										
毒性 急性																										
亜急性																										
慢性																										
次世代																										
その他																										
代謝																										