

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

(13) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

細菌を用いた復帰変異性試験 (Ames test)

(資料No. 23)

試験実施機関 : Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年 : 1998年

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmomella typhimurium* (TA1535, A1537, TA98, TA100⁻株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Eschsrichia coli* の WP2urvA⁻株を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) 存在下 (代謝活性化法) 及び非存在下 (直接法) で Ames 等の方法により変異原性を検定した。

検体は純水に溶解し、対照には純水を用いた。陽性対照として直接法の場合は ENNG、4NQO 及び 9AA を、代謝活性化法の場合は 2AA 及び BP を用いた。

1濃度当たり夫々3枚のプレートを使用し、プレート当たりの平均値を算出した。

用量設定根拠; 用量設定試験において最高用量 5000µg/プレートでも生育阻害作用が認められなかったため、本試験においても最高濃度を 5000µg/プレートとし、以下 1500、500、150 及び 50 µg/プレートの用量で実施した。

結果の判定は、復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上に増加し、かつ再現性及び用量相関性がある場合に陽性と判定した。

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキサイド

9AA : 9-アミノアクリジン

2AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンゾ(a)ピレン

試験結果 : 試験結果を次頁の表に示した。

直接法及び代謝活性化法に用いた陽性対照物質は、検定菌株に対して顕著な復帰突然変異を誘発し、S9 Mixの活性及び細菌の菌株の感受性が確認された。

一方検体は代謝活性化系の存在及び非存在に係わらず、どの菌株に対しても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

| 薬物 | 濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート) | S9 Mix | 平均復帰変異コロニー数/プレート | | | | |
|------------------|---------------------------------|-----------|------------------|--------|----------|----------|--------|
| | | | 塩基対型 | | | フレームシフト型 | |
| | | | TA100 | TA1535 | WP2uvrA- | TA98 | TA1537 |
| 溶媒対照(水) | 0 | - | 137 | 31 | 22 | 31 | 10 |
| 検体 | 50 | - | 133 | 30 | 22 | 28 | 11 |
| | 150 | - | 143 | 29 | 23 | 27 | 11 |
| | 500 | - | 140 | 31 | 23 | 28 | 13 |
| | 1500 | - | 140 | 32 | 23 | 30 | 6 |
| | 5000 | - | 154 | 33 | 30 | 27 | 8 |
| 溶媒対照(水) | 0 | + | 152 | 20 | 25 | 37 | 10 |
| 検体 | 50 | + | 132 | 22 | 25 | 38 | 11 |
| | 150 | + | 136 | 22 | 27 | 30 | 11 |
| | 500 | + | 143 | 20 | 24 | 38 | 10 |
| | 1500 | + | 144 | 29 | 26 | 33 | 9 |
| | 5000 | + | 157 | 20 | 36 | 30 | 11 |
| 陽 性 対 照 | ENNG | 3 | - | 531 | | | |
| | | 5 | - | | 429 | | |
| | | 2 | - | | | 729 | |
| | 4NQO | 0.2 | - | | | | 110 |
| | 9AA | 80 | - | | | | 1003 |
| | 2AA | 1 | + | 1379 | | | |
| | | 2 | + | | 248 | | 343 |
| | | 10 | + | | | 528 | |
| | BP | 5 | + | | | | 398 |

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

2) 染色体異常誘発性

チャイニーズハムスターの肺細胞を用いたin vitro染色体異常試験

(資料No. 24)

試験実施機関：Safepharm Laboratories(英国) (GLP対応)

報告書作成年：1998年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した肺細胞(CHL)を用い、薬物代謝酵素系(S9mix)の存在下(代謝活性化法)及び非存在下(直接法)において染色体異常誘発性を検定した。

検体は純水に溶解して用いた。

陰性対照として検体無添加のものを、陽性対照としては代謝活性化法にはマイトマイシンCを、直接法にはシクロホスファミドを用いた。

用量設定根拠：用量設定試験のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、最高推薦用量である10mMに相当する1830 μ g/mlでも沈殿が認められなかったため、本試験でも最高濃度を1830 μ g/mlとし、以下公比1/2で5用量を設定した。

6時間及び24時間暴露の場合は 0.3×10^6 、48時間暴露の場合は 0.1×10^6 細胞を25cm²のフラスコに播種した。6時間検体に暴露培養後、検体を除去し更に18時間培養する試験は、代謝活性化法及び直接法の両方で実施した。

24及び48時間連続暴露培養試験は直接法のみとした。

各用量1プレート当たり100個の分裂中期像を2プレート合計200個観察した。数的異常については倍数性細胞(polyploid cell)、構造的異常についてはギャップ(gap)、染色分体切断(chromatid break : ctb)、染色分体交換(chromatid exchange : cte)、染色体切断(chromosome break : ctb)、染色体交換(chromosome exchange : cte)及びその他に分類し、これらの異常を持った細胞は夫々別に数えたが、異常細胞数の合計では、1個の細胞が2つ以上の異常を持っている場合は1個として計算した。

試験結果：結果を次頁の表に示した。

S9mixの存在、非存在に係わらず検体は最高濃度である1830 μ g/mlでも試験菌株の増殖には影響を与えなかった。

陽性対照に用いたマイトマイシンC及びシクロホスファミドは、期待通りの頻度で異常を伴った細胞を出現させた。

6時間検体に暴露し、その後検体を除去して18時間培養した試験では、S9mixの存在、非存在に係わらずどの用量においても、上記の異常を伴った細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

S9mixの非存在下で、24時間及び48時間連続的に検体に暴露培養した結果では、最高濃度である1830 μ g/mlで統計学的に有意に異常を伴った細胞の出現頻度を増加させた。

また、検体のどの処理にも倍数性細胞の出現率の増加は認められなかった。

以上の結果から検体アセフェートは、チャイニーズハムスターの肺細胞に対して染色体異常誘発性があると考えられた。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

| 薬物 | 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) | 処理 時間 | S9mix の有無 | 観察 細胞 数 | 異常を有する細胞数 | | | | | | gap | 倍数性細胞 | | |
|---------------------|----------------------------|----------------------|--------------|---------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------------------------|-------|-------------|--------|
| | | | | | ctb | cte | csb | cse | その他 | 合計 (%) | | 数 | 合計 (0.0) | |
| 陰性対照 ¹⁾ | 0 | 6 時間 暴露 | — | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 0 | 0 | 0(0.0) |
| 検体 | 0.458 | | — | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 0 | 0 | 0(0.0) |
| | 0.915 | | — | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 1 | 0 | 0(0.0) |
| | 1.830 | | — | 200 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4(2.0) | 1 | 1 | 1(0.5) |
| 陽性対照 (マイトマイシン C) | 0.075 | | — | 200 | 16 | 27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 40 ^{***} (20.0) | 3 | 0 | 0(0.0) |
| 陰性対照 ¹⁾ | 0 | 18 時間 無処 理 | + | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 0 | 0 | 0(0.0) | |
| 検体 | 0.458 | | + | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 0 | 0 | 0(0.0) |
| | 0.915 | | + | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 0 | 1 | 1(0.5) |
| | 1.830 | | + | 200 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2(1.0) | 1 | 0 | 0(0.0) |
| 陽性対照 (シクロホスファミド) | 10 | | + | 100 | 23 | 41 | 1 | 1 | 1 | 0 | 56 ^{***} (28.0) | 6 | 0 | 0(0.0) |
| 陰性対照 ¹⁾ | 0 | 24 時間 連続 暴露 | — | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(0.5) | 2 | 0 | 0(0.0) |
| 検体 | 0.458 | | — | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0(0.0) |
| | 0.915 | | — | 200 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3(1.5) | 1 | 0 | 0(0.0) |
| | 1.830 | | — | 200 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 ^{**} (5.0) | 1 | 0 | 0(0.0) |
| 陽性対照 (マイトマイシン C) | 0.05 | | — | 150 | 18 | 42 | 3 | 1 | 0 | 0 | 56 ^{***} (28.0) | 12 | 0 | 0(0.0) |
| 陰性対照 ¹⁾ | 0 | 48 時間 連続 暴露 | — | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(0.5) | 0 | 0 | 0(0.0) |
| 検体 | 0.458 | | — | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0.0) | 3 | 0 | 0(0.0) |
| | 0.915 | | — | 200 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5(2.5) | 2 | 1 | 1(0.5) |
| | 1.830 | | — | 200 | 7 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 ^{***} (12.5) | 8 | 0 | 0(0.0) |
| 陽性対照 (マイトマイシン C) | 0.025 | | — | 200 | 24 | 44 | 2 | 2 | 0 | 0 | 63 ^{***} (31.5) | 16 | 0 | 0(0.0) |

1) ; 陰性対照は最小基本培地のみを用いた。 *** ; $P \leq 0.001$ 、 ** ; $P \leq 0.01$

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

3) DNA損傷誘発性

ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成(UDS)試験

(資料No. 25)

試験実施機関：Safepfarm Laboratories(英国)(GLP対応)
報告書作成年：1998年

検体純度：

試験動物：CD-1系ラット 1群3～4匹
開始時 6～9週齢 開始時体重 220～266g

暴露期間：2時間及び16時間

投与方法：検体をCMCに溶解し、200mg/kg及び600mg/kgの用量で経口投与した。

陽性対照として投与16時間後に還流した試験には2-アセチルアミノフルオレンを50mg/kgの用量で、2時間後に還流した試験ではN,N'-ジメチルヒドラジンジヒドロクロリドを20mg/kgの用量で投与した。

溶媒対照として2%CMCを用いた。

投与容量は10ml/kgとした。

用量選定根拠：検体の投与用量は、250から2000mg/kgの用量を用いた用量設定試験の結果、1000mg/kg以上投与群では死亡例が観察され、750mg/kg投与群では死亡例は認められなかったが、臨床観察でかなりの重篤な症状が観察されたために、この用量より僅かに低い600mg/kgを最高用量として、低い用量として200mg/kgを設定した。

ラットの肝細胞の調製はWilliamsの方法に従いコラゲナーゼを含有した緩衝液を投与後2時間及び16時間に還流し、細胞濃度は 3×10^5 /mlに調製し37°Cで1時間30分から2時間インキュベートした。細胞の標識にはトリチウムチミジン10 μ l/ml(370kbq/ml)を含有した無血清培地で3時間37°Cでインキュベートした。細胞の計数にはオートラジオグラフ法を用いた。染色にはヘマトキシリン/エオシンを用いた。

1動物当たり3枚のスライドグラス、1スライド当たり50細胞観察し、合計1動物当たり150細胞になるようにした。

観察された核内の銀粒子を核上粒子数(N)とし、細胞質領域3ヶ所(夫々核面積に相当)を計数し、平均細胞質中粒子数を計算した。更にネットの粒子数(N-C)を算出した。(N)、(C)及び(N-C)の平均及び修復細胞率(%R)を算出した。

評価はUKEMSのガイドラインに準じ、全細胞の最低20%が不定期DNA合成をしている場合及び(N-C)の値が+5以上の場合に陽性と判断した。

試験結果：

一般症状：投与1時間後及び還流直前に全動物について一般症状を観察した。

検体の16時間投与群の1匹が還流中に死亡した以外には死亡は認められなかった。

検体投与群に認められた一般症状は、伏臥姿勢、嗜眠、呼吸数の減少、線維束収縮、運動失調、振戦、流涎及び外股歩行であった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

不定期DNA合成結果を下表に示した。

16時間暴露の場合、陽性対照である2AAFは修復細胞の出現頻度を顕著に増加させたが、検体投与群では溶媒対照区と同様に修復細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

2時間暴露の場合、陽性対照であるNDHCは修復細胞の出現頻度を顕著に増加させたが、検体投与群では溶媒対照区と同様に修復細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

以上の結果から、検体は本試験条件下ではラットの肝細胞の不定期DNA合成をする細胞の出現頻度を増加させず、DNA損傷誘発性はないと判断された。

16時間暴露の場合

| 投与用量 (mg/kg) | ネット粒子数 | | 修復細胞数 | | 修復細胞率 (%) | |
|-----------------|--------|-----|-------|-----|--------------|------|
| | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD |
| CMC 0.2% | -0.1 | 0.6 | 8.5 | 1.9 | 5.2 | 2.6 |
| 検体 200mg/kg | -0.6 | 1.2 | 8.4 | 2.4 | 6.0 | 5.7 |
| 検体 600mg/kg | 0.2 | 0.0 | 7.7 | 0.5 | 9.3 | 0.0 |
| 2AAF 50 | 12.3 | 8.0 | 16.4 | 5.7 | 65.9 | 23.8 |

SD; 標準偏差

2時間暴露の場合

| 投与用量 (mg/kg) | ネット粒子数 | | 修復細胞数 | | 修復細胞率 (%) | |
|-----------------|--------|-----|-------|-----|--------------|------|
| | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD |
| CMC 0.2% | 0.0 | 0.1 | 5.2 | 0.2 | 1.2 | 1.2 |
| 検体 200mg/kg | 0.0 | 0.1 | - | - | - | - |
| 検体 600mg/kg | 0.1 | 0.3 | 6.9 | 2.3 | 1.2 | 1.3 |
| NDHC 50 | 6.2 | 1.7 | 8.9 | 1.1 | 56.4 | 16.7 |

SD; 標準偏差

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

4) 小核試験

マウスを用いた小核試験

(資料 No. 26)

試験実施機関 : Safepharm Laboratories Lim. (英国) (GLP 対応)

報告書作成年 : 2005 年

検体純度 :

試験動物 : CrI:CD-1(ICR)BR 系マウス、 一群雄 7 匹 (陽性対照群は 5 匹)
(5~8 週齢、体重 23~27g)

試験方法 : 蒸留水に溶解した検体の所定量を目盛り付きシリンジを装着した金属製カニューレを用いて、1 回経口投与した。投与容量は 10mL/kg とし、実際の投与容量は最新の体重に基づき計算した。

対照群には蒸留水を 10mL/kg の割合で与え、陽性対照群にはシクロフォスファミドを同容量で投与した。

全群の動物を投与 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺し、各動物の大腿骨を摘出して、ウシ胎児血清で洗い出し、遠心分離及び再懸濁により骨髓を採取し、スライドガラス上に固定してメイグリュンワルド/ギムザ染色して骨髓塗沫標本を作成した。

また、検体の 50mg/kg 投与群及び対照群には 48 時間後屠殺する群も設け、上記と同様に骨髓塗沫標本を作成した。各動物につき多染性赤血球 2000 個当たりの小核を有する細胞の出現数を計数した。更に赤血球 1000 個当りの正染性赤血球(NCE)数も数えた。赤血球 1000 個当たりの多染性赤血球の割合(%PCE)を計算し、群平均値を算出した。

24 あるいは 48 時間後に夫々対応する対照群と比較して、小核を有する多染性赤血球数が統計学的に有意に増加し、かつ用量相関があり、毒性関連症状が多くなった場合に変異原性があると判断した。

用量設定根拠; まず雌雄各 2 匹ずつを用いて 1,000mg/kg の用量で予備試験を実施した。

重篤な毒性症状が認められたため投与日に切迫屠殺した。しかし毒性症状に雌雄で差が認められなかったため、以後の用量設定試験及び本試験は雄のみで実施した。

次に 200、100 及び 50mg/kg の投与用量で各群 2 匹ずつ(100mg/kg 投与群は 1 匹)を用いて用量設定試験を実施した。100 及び 200mg/kg 投与群でも重篤な毒性症状が認められたため切迫屠殺した。

100mg/kg 以上の投与群で認められた症状は、円背位、眼瞼下垂、嗜眠、歩行失調、振戦、流涙の増加、線維束収縮、呼吸数の減少等であった。

50mg/kg 投与群でも毒性症状は見られたが、程度は軽くこの濃度が最大耐量(MTD)であると考えられ、50mg/kg を本試験の最高用量として、以下公比 1/2 で中用量を 25mg/kg、低用量を 12.5mg/kg とした。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

試験結果：骨髓標本の観察結果を次の表に示した。

赤血球 1000 個当りの%PCE が、検体の 50mg/kg 投与群の 48 時間後と 25mg/kg 投与群の 24 時間後に夫々対照群に比較して統計学的に有意に減少した。これらは一般状態の変化を伴っていたことから、全身への検体の吸収があったことを示しており、骨髓への暴露が確認された。

小核を有した多染性赤血球(PCE)の出現頻度には検体のどの用量群においても夫々の対照群と比較した場合統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照に用いたシクロフォスファミドはマウスの骨髓において多染性赤血球の出現頻度を増加させ、供試動物が感受的であることが示された。

| 処 理 群 | | 屠殺 時期 | 2000PCE 当り の小核を有す る PCE 数 | 小核を有する PCE の割合 (%) | 赤血球 1000 個当りの%PCE |
|-----------------------------|-----------|----------|---------------------------------|--------------------------|----------------------|
| 溶媒(蒸留水)対照群 | | 48h | 1.3 | 0.06 | 54.8 |
| | | 24h | 1.0 | 0.05 | 53.5 |
| 陽性対照(シクロフォスファミド) 50mg/kg | | 24h | 42.8*** | 2.14*** | 53.6 |
| 検 体 | 50mg/kg | 48h | 0.7 | 0.04 | 44.9** |
| | | 24h | 1.0 | 0.05 | 47.5 |
| | 25mg/kg | 24h | 0.7 | 0.04 | 40.8** |
| | 12.5mg/kg | 24h | 1.6 | 0.08 | 47.3 |

PCE; 多染性赤血球、** ;p<0.01、 ***; p<0.001

以上のように検体は、多染性赤血球内に小核を出現させる頻度に有意な増加を示さなかったことから、本試験条件下では、検体は変異原性を有しないと判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(14) 生体機能への影響に関する試験

アセフェートにおける薬理試験

(資料No. 27)

試験実施機関 : (財)食品農医薬品安全性評価センター(GLP対応)

報告書作成年 : 1997年

検体純度 :

1) マウスの中樞神経系に対する作用

① マウスの一般症状

試験動物 : Slc: ICR系マウス (SPF) 1群 雄5匹 開始時 6週齢 開始時体重25.1 - 33.3g

投与方法 : 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、15mg/kg、50mg/kg及び150mg/kgを経口投与した。投与前、投与後15、30、60、120及び180分までIrwinの多次元観察法を参考に観察した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に与えた。

結果 : 15及び50mg/kg投与群では変化は見られず、検体の影響は認められなかった。

150mg/kg投与群では投与後60分から自発運動の低下(抑制)、受動性の低下、立毛、振戦、流涙及び排尿が観察され180分後でも継続して認められる例も観察された。

② マウスの自発運動量の測定

試験動物 : Slc: ICR系マウス (SPF) 1群 雄8匹 開始時 7週齢 開始時体重33.6 - 43.1g

投与方法 : 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、15mg/kg、50mg/kg及び150mg/kgを経口投与した。投与前、投与後15、30、60、120及び180分に各3分間の自発運動をスーパーカーメックス(室町機械)で測定した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に与えた。

試験結果 : 50及び150mg/kg投与群で、投与後30分から低値(抑制)傾向が認められたが、統計学的に有意な変化ではなかった。

③ 痙攣誘発作用(電撃痙攣)

試験動物 : Slc: ICR系マウス (SPF) 1群 雄10匹 開始時 7週齢 開始時体重32.3 - 38.9g

投与方法 : 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、15mg/kg、50mg/kg及び150mg/kgを経口投与した。投与後60分に両耳介より小型動物用電撃刺激装置(Ugo-Basile、7801)を用いて10mA、0.8秒間通電した。その後に発現する後肢の強直性伸展痙攣及び死亡の有無を観察した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に与えた。

陽性対照群としてカフェインを150mg/kg投与した群を設けた。

試験結果 : 対照群では全例に間代性痙攣、1例に強直性屈曲痙攣が認められた。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

検体の15mg/kg投与群では9例に間代性痙攣、2例に強直性屈曲痙攣、1例に強直性伸展痙攣及び死亡が認められた。

50mg/kg投与群では全例に間代性痙攣、1例に強直性屈曲痙攣が認められた。

150mg/kg投与群では全例に間代性痙攣、5例に強直性屈曲痙攣が認められた。

一方陽性対照のカフェインを150mg/kg投与した群では全例に間代性痙攣、3例に強直性屈曲痙攣、7例に強直性伸展痙攣、8例に死亡が認められ、対照群に比較して強直性伸展痙攣及び死亡の発現率が統計学的に有意な高い値を示した。

④体温の測定

試験動物：Slc: SD系ラット (SPF) 1群 雄6匹 開始時 7週齢 開始時体重280 - 325g

投与方法：検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、50mg/kg、150mg/kg及び500mg/kgを経口投与した。予め直腸温をデジタル温度計(芝浦電子、TD-320)を用いて一定正常体温であることを確認した。投与前、投与後30、60、120及び180分に直腸温を測定した。対照群には注射用蒸留水のみを与え、同様に測定した。

試験結果：50mg/kg投与群では投与120分以降、150及び500mg/kg投与群では投与30分以降の測定値が対照群に比較して統計学的に有意な低値を示し、投与後180分でも回復は認められなかった。

2) ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

麻酔ウサギの呼吸運動、血圧及び心電図に対する作用

試験動物：Kbl: NZWウサギ (SPF) 1群 雄4匹 開始時 11週齢 開始時体重2.7kg - 3.2kg

投与方法：検体を生理食塩水に溶解し、15、50及び150mg/kgの用量で左大腿静脈にカニューレを介して投与した。ウサギにペントバルビタール30mg/kgを投与して麻酔し、角膜反射を確認しながら必要に応じてペントバルビタール3mg/kgを追加麻酔した。気管切開をしてカニューレを挿入し、呼吸を確保した。気管カニューレの先にサーミスター呼吸ピックアップ(NEC三栄、45257)を取り付け呼吸運動を測定した。

心電図は標準四肢第II誘導で観察した。

血圧は右大腿動脈に挿入した圧トランスデューサーを用いて、ひずみ圧力用アンプ(NEC三栄、1257)を介して測定した。

心拍数は、血圧脈液をトリガーとして瞬時心拍数ユニット(NEC三栄、1321)を介して測定した。

観察は投与後120分まで行った。

対照群には生理食塩水のみを与え、同様に測定した。

試験結果：呼吸変化については150mg/kg投与群では投与直後(0分)及び投与後120分に統計学的に有意な呼吸回数の増加が認められた。

血圧変化では、150mg/kg投与群で投与90分から低下傾向、120分で統計学的に有意な低下が認められた。

心拍数及び心電図にはいずれの投与群にも投与前の波形と比較して変化は認められなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

3) モルモットの自律神経系及び摘出平滑筋に対する作用

モルモットの回腸に対する作用 (ACh, His及びBaCl₂収縮に対する作用)

試験動物: Std: Hartley系モルモット 1群 雄5匹 開始時 6週齢 開始時体重417g - 580g

投与方法: モルモットを撲殺後、両頸動脈切断により放血致死させた。直ちに回腸を15-20mmの長さで摘出した。摘出した回腸は95%O₂+5%CO₂ガス混合ガスを通気した30°CのTyrode {組成(mM); NaCl, 158.3; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1.05; NaHCO₃, 10; NaH₂PO₄, 0.42; グルコース, 5.6} 液を満たした10mlのマグナス槽中に0.5gの負荷をかけて懸垂した。

収縮は、等張性トランスデューサー(NEC三栄, 45347)及び変位アンプ(NEC三栄, AS2102)を用いレコーダー(NEC三栄, RECTI-HORIZ 8K23-L)上に記録した。

Ach, His及びBaCl₂は累積的にマグナス槽中に投与した。

検体は生理食塩水に溶解して5×10⁻⁵g/ml, 5×10⁻⁴g/ml, 5×10⁻³g/mlの用量を5分後に投与した。

検体溶液投与前の各薬物による収縮を対照とし、1群 5例を用いた。

試験結果: 摘出回腸に対する直接作用については、5×10⁻³g/ml群で作用直後から一次的に弛緩反応が認められた。その他の用量群では変化は認められなかった。

ACh収縮に対しても5×10⁻³g/ml群で作用後のACh収縮に抑制傾向が認められたが、他の2用量群では変化は認められなかった。AChの1×10⁻⁷、1×10⁻⁶及び1×10⁻⁴Mの濃度で対照群に比較し、統計学的に有意に収縮が抑制された。

His収縮に対しては5×10⁻³g/ml群で作用後のHis収縮に抑制傾向が認められた。5×10⁻⁴g/ml, 5×10⁻⁵g/ml群では影響は認められなかった。

His1×10⁻⁶M, 1×10⁻⁵M及び1×10⁻⁴Mの濃度で対照群に比較して統計学的に有意に収縮が抑制された。

BaCl₂収縮に対してはいずれの検体投与でも作用前後の収縮に影響は認められなかった。

4) マウスの消化器系に及ぼす作用

マウスの小腸輸送能に及ぼす影響

試験動物: Slc: ICR系マウス (SPF) 1群 雄10匹 開始時 6週齢 開始時体重28.1g - 32.6g

投与方法: 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、15mg/kg, 50mg/kg及び150mg/kgを経口投与した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に与え、陽性対照としてアトロピン300mg/kgを経口投与した。

検体投与の60分後に活性炭素末懸濁剤(5%活性炭素末+10%アラビアゴム)0.1ml/bodyを経口投与し、30分後にマウスを頸椎脱臼により屠殺し、速やかに幽門から回腸末端部までを摘出した。その腸管全長に対する活性炭素末の移行率(移動距離/腸管全長×100)を算出した。

試験結果: いずれの検体投与群にも対照群と比較して差は認められなかった。

一方アトロピン投与群では統計学的に有意な抑制を示した。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

5) マウスの骨格筋に対する作用

懸垂動作試験

試験動物: Slc: ICR系マウス (SPF) 1群 雄10匹 開始時 6週齢 開始時体重22.3g - 33.3g

投与方法: 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、15mg/kg、50mg/kg及び150mg/kgを経口投与した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に与えた。

検体投与後30、60、120及び180分に高さ25cmの位置に張った針金(直径2mm)にマウスを両前肢で懸垂させ、10秒以内に後肢を針金にかけられない場合を陽性とした。

試験結果: 対照群、15及び50mg/kg投与群では全例陰性を示し、影響は認められなかった。

150mg/kg投与群では投与後60分に3例、120分に6例、180分に2例が陽性を示し、120分後の陽性は統計学的に有意な抑制であった。

6) ラットの血液に対する作用

血液凝固能検査

試験動物: Slc: SD系ラット (SPF) 1群 雄6匹 開始時 7週齢 開始時体重263g - 288g

投与方法: 検体を注射用蒸留水に溶解し、10ml/kgの容量で、50mg/kg、150mg/kg及び500mg/kgを経口投与した。投与60分後にエーテル麻酔し、腹部大動脈より2%クエン酸ナトリウムを添加した注射筒で採血した。採血後3000r.p.m. で13分間遠心分離して血漿を採取し、プロトロンビン時間(PT)、活性化トロンボプラスチン時間(APTT)及びフィブリノーゲン量を血液凝固測定装置KC-40(アメルング社、独国)を用いて測定した。

対照群には注射用蒸留水のみを与え、同様に測定した。

試験結果: いずれの検体投与群でもPT、APTT及びフィブリノーゲン量に影響は認められなかった。

考察:

150mg/kg投与群の一般症状の観察で自発運動の低下(抑制)、受動性の低下ならびに自発運動量の低下が認められ、更にラットで体温低下が認められることから、検体は中枢神経系に対して抑制的な作用を有すると考えられる。

一方、同用量で振戦、流涙及び排尿が認められ、更に電撃誘発痙攣で若干の痙攣増強作用、懸垂動作試験で陽性例が認められた。また、麻酔ウサギの血圧に90分から低値が認められた。

これらの変化は中枢神経系、循環系及び骨格筋に対し、有機リン系の化合物の持つ作用であるアセチルコリンエステラーゼ阻害によるアセチルコリンエステラーゼのムスカリン様作用及びニコチン様作用が本検体でも同様に現れたものと考えられる。

モルモットの摘出回腸に対して 5×10^{-3} g/m群で作用直後から一時的に弛緩反応が認められ、その後のACh及びHisにより惹起された回腸の収縮反応を抑制した。しかしBaCl₂収縮に対しては何ら影響は認められなかった。これらのことから、検体は直接的な平滑筋弛緩作用及びACh及びHisに対する回腸の反応性を阻害する作用を有すると思われる。

検体のマウスへの150mg/kg投与では小腸の輸送能には影響を及ぼさなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

又ラットの血液凝固能にも影響が認められなかった。

以上のことから、検体は中枢神経系に対する抑制作用、摘出回腸に対する直接作用、Ach及びHisによる回腸収縮に対する抑制作用を有し、消化器系及び血液凝固能に対しては影響を及ぼさないことが明らかである。又有機リン系の化合物の持つコリンエステラーゼ阻害作用に基づいた作用として中枢神経系及び循環器系に対するムスカリン様作用、骨格筋に対するニコチン様作用も認められた。

生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

| 試験項目 (試験方法) | 供試動物 | 動物数 /1群 | 投与 経路 | 投与量 (mg/kg) | 無作用量 (mg/kg) | 作用量 (mg/kg) | 結果の概要 | |
|-----------------------|---|------------|----------|---------------------|---|----------------------------|----------------------------|--|
| 中 枢 神 経 系 | 一般症状 Irwin法 | マウス | ♂5 | 経口 (蒸留水) | 0, 15, 50, 150 | 50 | 150 | 150mg/kgで自発運動の低下、 受動性低下、振戦、流涙、排 尿、立毛 |
| | 自発運動量 スーパーメックス | マウス | ♂8 | 経口 (蒸留水) | 0, 15, 50, 150 | 15 | 50 | 50mg/kg, 150mg/kgで 低値傾向 |
| | 痙攣誘発 電撃痙攣 | マウス | ♂10 | 経口 (蒸留水) | 0, 15, 50, 150 | 50 | 150 | 150mg/kgで10匹中5匹に 強直性屈曲痙攣 |
| | 体温 直腸温 | ラット | ♂6 | 経口 (蒸留水) | 0, 50, 150, 500 | — | 50 | 全処理群で有意な低値 |
| 呼 吸 循 環 系 | 呼吸、血圧、 心拍数、心電図 | ウサギ | ♂4 | 静脈注射 (生理 食塩水) | 0, 15, 50, 150 | 50 | 150 | 150mg/kgで有意な呼吸回数の 増加、血圧低下 |
| 自 律 神 経 系 | 摘出回腸 直接作用 ACh, His, BaCl ₂ | モル モット | ♂5 | in vitro | 5×10^{-5} g/ml 5×10^{-4} g/ml 5×10^{-3} g/ml | 5×10^{-5} g/ml | 5×10^{-4} g/ml | 5×10^{-4} g/mlで直接的に一次 的な弛緩、ACh, His収縮の抑 制 |
| 消 化 器 系 | 小腸輸送能 | マウス | ♂10 | 経口 (蒸留水) | 0, 15, 50, 150 | 150 | — | 影響なし |
| 骨 格 筋 | 懸垂運動 | マウス | ♂10 | 経口 (蒸留水) | 0, 15, 50, 150 | 50 | 150 | 有意な陽性例の増加 |
| 血 液 | 血液凝固能 PT, APTT, Fibrinogen | ラット | ♂6 | 経口 (蒸留水) | 0, 50, 150, 500 | 500 | — | 影響なし |

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(15) その他

1) コリンエステラーゼ活性阻害試験

① サルを用いた7日間の回復期間を伴った21日間反復経口投与毒性試験 (資料 No.28)

試験実施機関: Covance Laboratories GmbH(独国)(GLP対応)

報告書作成年: 2001年

検体純度:

試験動物 : カニクイザル 1群雄各 3匹 (2及び4群は各5匹) 雄; 2.5~3.6年齢
開始時体重 雄; 3.6~4.3kg

投与期間 : 21日間 (2001年1月25日~2001年2月14日)

投与方法 : 検体を0、0.3、0.6及び1.2mg/kg/日の用量になるようにカプセルに包み投与器により、1日1回、21日間にわたって強制経口投与した。低用量群及び高用量群には、投与終了後7日間回復を観察するため夫々2匹ずつ追加した。
給餌は毎日2回(午前と午後)、50から70gのペレット飼料を与えた。更に週に2度新鮮な果物と週に1度パンを与えた。
飲料水として自動給水装置から水道水を自由に与えた。

用量設定根拠: 0、0.3、0.6及び1.2mg/kg/日の用量で実施した7日間反復経口投与した用量設定試験で、1.2mg/kg/日に明確な影響が認められなかった結果に基づき、本試験も同一用量とした。また、この用量設定試験において性差が認められなかったため、本試験では雄のみを用いた。

観察・検査項目及び結果:

一般症状及び死亡率; 一般症状を投与前期間中には日に1回、投与期間中には日に2回観察した。死亡の有無は日に2度観察した。
投与に関連した一般症状の変化は認められなかった。
また、試験期間中には死亡は認められなかった。

体重変化 ; 投与前に1回、投与期間中は週に1回と剖検前に体重を測定した。

投与に関連した体重変化の異常は認められなかった。

血液生化学検査; 投与開始前、投与7、14及び21日後の全動物及び28日目の回復期間終了時の全生存動物から血液試料(2ml)を大腿/上腕静脈から採取し、血漿コリンエステラーゼ活性及び血球コリンエステラーゼ活性を測定した。また、剖検時に全動物から脳を摘出し、小脳を中央線に沿って2分し、左半分の重量を測定した後氷冷生理食塩水中に保存しコリンエステラーゼ活性を測定した。結果を以下の表に示した。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

1 血漿コリンエステラーゼ (μL)

| 検査時期 (日) | 投与量 (mg/kg/日) | | | |
|-------------|---------------|----------|----------|----------|
| | 0 | 0.3 | 0.6 | 1.2 |
| 投与前 | 30062.49 | 28530.05 | 29843.30 | 28789.05 |
| 7 | 30637.03 | 24986.88 | 25360.24 | 22851.26 |
| 14 | 29874.54 | 24733.72 | 24325.28 | 23509.07 |
| 21 | 28765.57 | 24573.01 | 23690.46 | 21990.72 |
| 28 | — | 28839.37 | — | 30097.21 |

SAS検定 ↓ : $P < 0.05$

2 血球コリンエステラーゼ (μL)

| 検査時期 (日) | 投与量 (mg/kg/日) | | | |
|-------------|---------------|---------|---------|---------|
| | 0 | 0.3 | 0.6 | 1.2 |
| 投与前 | 2273.33 | 2528.45 | 2672.17 | 2571.55 |
| 7 | 2766.08 | 2820.50 | 2340.00 | 2771.80 |
| 14 | 3618.08 | 2256.20 | 2482.25 | 2483.30 |
| 21 | 3340.92 | 2108.85 | 2356.58 | 2249.80 |
| 28 | — | 2671.25 | — | 3420.38 |

SAS検定 ↓ : $P < 0.05$

3 脳コリンエステラーゼ (μg)

| 検査時期 (日) | 投与量 (mg/kg/日) | | | |
|-------------|---------------|---------------|---------------|------|
| | 0 | 0.3 | 0.6 | 1.2 |
| 21 | 0.85 | 0.59 ↓69.4 | 0.58 ↓68.2 | 0.66 |
| 28 | | 0.82 | | 0.77 |

SAS検定 ↓ : $P < 0.05$

矢印横の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

血漿コリンエステラーゼ活性;

全処理群で僅かではあるが低下した。しかし、これらの変化は対照群との間で有意な差はなく、また全て背景データ内であり、検体による薬理学的な変化であると思われた。この変化は、一般症状、体重及び臓器重量に影響は認められなかったことから、毒性学的に意義があるとは考えられなかった。

血球コリンエステラーゼ活性;

対照群の7、14及び21日後の値が増加したため投与群との間で差が認められたが、統計学的に有意な差ではなく、投与群の値は全群とも投与期間を通じて同レベルに留まり、対照群の投与前時期の値と同等であった。群間及び群内で認められた差は明確な用量相関を示すものではなく、投与に関連した変化とは考えられなかった。

脳コリンエステラーゼ活性;

全投与群で活性が低下する傾向が認められた。低及び中用量群では統計学的に有意な差が認められたが、高用量群では影響は小さく対照群との間で有意な差は認められず、個別及び平均値においても用量相関を示すものではなかった。

また、投与処理群の値は、本試験に先立ち実施した用量設定試験における対照群で認められた値とほぼ同等(0.66~0.73 μ L)であり、明確に投与の影響を示唆するものではなかった。一般症状、体重変化及び臓器重量に毒性的な影響がないことから、脳コリンエステラーゼ活性に認められた変化は、生物学的に意義のある変化とは考えられなかった。

臓器重量; 一晚絶食させた後、投与22日後に1群と3群の全動物及び2群と4群の各3匹、投与29日後に2群及び4群の残りの各2匹に過剰のベントパルピタルナトリウムを静脈注射し、瀉血させて屠殺した後、体重を測定し、その後剖検に供した。剖検後下記の臓器の重量を測定した。

副腎、脳(大脳皮質、視床、中脳、延髄、小脳)、精巣上部、心、腎、肝、下垂体、脾、精巣、甲状腺及び上皮小体

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

| 検査項目 | | 投与量(mg/kg/日) | | |
|------|------|--------------|-------|-------|
| | | 雄 | | |
| | | 0.3 | 0.6 | 1.2 |
| 副 腎 | 実重量 | ↓65.0 | ↓55.3 | ↓71.8 |
| | 対体重比 | ↓66.7 | ↓33.3 | |

SAS検定 ↓ : P<0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

統計学的に有意な差が散見されたが、これらは用量相関性を示すものではなく、その値は正常範囲内であった。

剖 検; 剖検時に認められた所見は、カニクイザルに通常認められる所見で、標的臓器への毒性を示唆するような異常な肉眼的病変は認められなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

組織の保存; 下記の組織を保存したが、組織学的検査は実施しなかった。

副腎、大動脈(大動脈弓及び腹大動脈)、脳(大脳皮質、視床、中脳、髄、小脳)、骨髄塗抹標本(胸骨)、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上部、食道、眼及び視神経、大腿骨(骨髄、関節を含む)、胆嚢、心、回腸、空腸、腎、涙腺、肝、肺(気管支共)、乳腺、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、脾、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺・下顎、座骨神経、精嚢腺、骨格筋、皮膚/動物識別、脊髓中枢、脾、胸骨(骨髄共)、胃、精巣、胸腺、甲状腺及び上皮小体、舌、気管、膀胱、病変。

以上の結果から、本剤のカニクイザルに対するカプセル投与による21日間反復経口投与毒性試験における血球コリンエステラーゼ、血漿コリンエステラーゼ及び脳コリンエステラーゼ活性に明確な投与の影響は認められず、また一般症状、体重変化及び臓器重量にも影響が認められなかったことから、高用量群である1.2mg/kg/日が無毒性量(NOEL)であると判断される。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② 中枢神経系への影響に関する動物種差

ラット、サル及びヒト血漿・血球を用いた *in vitro* コリンエステラーゼ測定試験 (資料No.29)

試験実施機関：(財) 残留農薬研究所

HAB協議会附属霊長類機能研究所

報告書作成年：2001年

検体純度：

試験動物：SD系ラット(雄5匹)、カニクイザル(成獣雄6匹)、ヒト(成人男性5人)

投与期間：10分間(アセチルコリンエステラーゼ活性のための反応時間)

試験方法：採血後 4℃で 1000×g、15分間遠心分離し、血漿成分を分離した。

沈殿のbuffy layerを除去後等量の生理食塩水を加えて攪拌し、4℃で 1000×g、15分間遠心分離し、その上清を除去し、等量の生理食塩水を加えて攪拌し、4℃で 1000×g、15分間遠心分離し、その上清を除去して再度等量の生理食塩水を加え、ヘマトクリット値を求め血球成分とした。

検体を 100mM リン酸緩衝液(pH 8.0)に溶解して10濃度(0.1、0.2、0.6、1.0、6.0、10、20、60 及び100mM)の溶液を調製した。これらの溶液を血漿或いは血球成分と共に10分間インキュベイトした後、基質であるアセチルコリン(シグマ社)を加えてEllman法により測定し 50%阻害濃度を算出した。

試験結果：平均50%阻害濃度を下記の表に示した。

| 供試動物 | アセチルコリンエステラーゼ活性 50% 阻害濃度 (mM) | |
|--------|-------------------------------|------------|
| | 血球 | 血漿 |
| ラット(5) | 24.47±5.20 | 28.70±4.87 |
| サル(6) | 18.61±5.66 | 38.16±5.81 |
| ヒト(5) | 22.74±6.32 | 42.49±7.12 |

供試動物の項の()内数字は供試匹数を示す。

表からも明らかなように、統計学的に有意な差は認められなかったが、血球アセチルコリンエステラーゼ活性%阻害の程度はサルが最も大きく、ヒトとラットはほぼ同程度であった。一方、血漿アセチルコリンエステラーゼ活性はヒトでの阻害が最も小さく、ラットの阻害が最も大きかった。検体に関しヒトとサルを比較した場合、ヒトよりサルの方がむしろアセチルコリンエステラーゼ活性阻害の程度が大きく、感受性が高いとことが示唆された。

以上の結果から、本剤のラット、カニクイザル及びヒトの血球及び血漿を用いたアセチルコリンエステラーゼ活性阻害試験では、血球及び血漿の何れの場合もサルの方がヒトより阻害程度が大きく、検体に対してサルの方がヒトより感受性が高いと考えられた。ヒトにおける検体の中枢神経毒性を評価する際に、サルの試験結果をヒトに外挿しても問題ないと考えられた。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

2 原体混在物及び代謝物

。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び **Sinon Corporation** にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

3. 製剤を用いた毒性試験

(1) アセフェート水溶剤の急性毒性

1) 急性経口毒性

① ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 31)

試験実施機関: Safepharm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名: MBI-951 SP)

試験動物 : Sprague-Dawley系ラット 1群雌雄各 5匹 8~12週齢
開始時体重 雄; 207~247g 雌; 200~232g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を各用量になるように蒸留水に溶解し、一晚絶食させたラットに707、1000、1414、2000及び2828 mg/kgの用量で1回強制経口投与した。707、1000、1414mg/kg投与群には10ml/kg、2000及び2828mg/kg投与群には20ml/kgの容量で投与した。
給餌は投与後3時間から行った。

観察・検査項目 : 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は毎日1度14日間観察した。体重は投与日の投与前、投与後7及び14日目に測定した。途中死亡動物、切迫屠殺についてはその都度、生存動物については試験終了時に屠殺・剖検した。

結果:

| 投与方法 | 経口 |
|--|---|
| 投与量 (mg / kg) | 707、1000、1414、2000、2828 |
| LD ₅₀ (mg / kg) (95% 信頼限界) | 雄 : 3150 (1154 - 8593) 雌 : 3150 (1154 - 8593) 両性 : 3150 (1549 - 6405) |
| 死亡開始時間及び終了時間 | 投与後1時間から開始、投与後1日に終了 |
| 症状発現及び消失時間 | 投与後30分から発現、投与後12日消失 |
| 毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg / kg) | 全投与群で観察された |
| 死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg / kg) | 1414 |

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

2000mg/kg投与群の雌雄2匹ずつが投与当日に、2828mg/kg投与群雄では投与当日に2匹が、雌では投与当日及び1日後の夫々1匹ずつが死亡した。

第1週に体重減少を示し、第2週には体重増加が認められた2828mg/kg投与群の2動物を除いて、生存動物は期待通りの体重増加を示した。

全投与群で認められた症状は、運動失調、円背位、嗜眠、起毛、呼吸数の低下、呼吸促迫、喘呼吸及び爪先歩行であった。

血涙、振戦が707、1414及び2828 mg/kgで認められ、1000mg /kg以上の投与群で認められた症状は、攣縮及び眼、口部或いは鼻部周囲の汚れであった。

1000、2000及び2828mg/kg投与群で認められた症状は、流涙、流涎の増加で瘦削の頻度は1414mg/kg以上の投与群で認められた。

2828mg/kg投与群で脱水症状が、2000mg/kg投与群の雄1匹に下痢が認められた。これらの症状は投与12日目には完全に回復した。

試験期間中に死亡した動物の剖検所見では、肺の出血、肝の暗黒化、脾の白色化、腎の暗黒化及び胃粘膜の肥厚であった。試験の終了時に屠殺した動物の剖検では異常は認められなかった。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 32)

試験実施機関: Safeparm Laboratories(英国) (GLP対応)
報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名 : MBI-951 SP)

試験動物 : CD-1系白色マウス 1群雌雄各 5匹 6~8週齢
開始時体重 雄; 22~28g 雌; 20~26g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を蒸留水に溶解し、1晩絶食させたマウスに10ml/kgの容量で1回強制経口投与した。
給餌は投与後3から4時間に行った。

観察・検査項目 : 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後とその後は毎日1回14日間観察した。

体重は投与日の投与前、投与後7及び14日に測定した。死亡及び切迫屠殺動物についてはその都度、生存動物については試験終了時に屠殺し、剖検した。

結果 :

| 投与方法 | 経口 |
|---------------------------------------|----------------------|
| 投与量 (mg/kg) | 397、500、630、794、1000 |
| LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界) | 雄 : 481(351-659) |
| | 雌 : 561(500-630) |
| | 両性 : 530(481-583) |
| 死亡開始及び終了時間 | 投与後1日から開始、投与後6日に終了 |
| 症状発現及び消失時間 | 投与後30分に開始、投与後14日に消失 |
| 毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg) | 全投与群に認められた |
| 死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg) | 500 |

397mg/kg投与群では投与1及び2日後に雄の1例ずつが死亡した。

500mg/kg投与群では死亡例は認められた。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

630mg/kg以上の投与群では第6日に死亡した1000mg/kgの雌の1例を除いて、全例が第1日目と2日目に死亡した。

全投与群で認められた症状は、円背位、嗜眠、流涙、眼瞼下垂、呼吸数の低下、喘ぎ呼吸、外股歩行及び振戦であった。397、630、794或いは1000mg/kg投与群では、更に爪先歩行、瘦削、脱水症状、攣縮及び流涎が認められた。また、1000mg/kg投与群では、血涙、起毛、眼、口部及び鼻部周囲の赤/茶色化が認められた。

生存動物では投与第1週目に体重減少か或いは体重の増加が認められなかったが、第2週には正常な体重増加が認められた。

試験期間中に死亡した動物の剖検では、肺の出血、肝の暗黒化、脾の白色化、腎の暗黒化及び胃粘膜の白色化、胃の腺胃及び前胃部位の上皮の痂皮形成及び出血、小腸及び大腸の出血が認められた。試験終了時に解剖した動物には異常は認められなかった。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

2) 急性経皮毒性

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No. 33)

試験実施機関: Safepharm Laboratories (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名 : MBI-951 SP)

試験動物 : Sprague-Dawley系ラット 1群雌雄各5匹、10~14週齢
開始時体重 雄; 200~214g 雌; 200~219g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を蒸留水で湿らせてペースト状にし、剪毛したラットの背部(全体表面積の約10%)に体重1kg当り2000mg/kgの用量で均一に塗布した。その上をガーゼで覆い伸縮性の目の粗い粘着性包帯で固定した。24時間後にガーゼ及び包帯を除去し、検体が残存しないように蒸留水で湿らせた脱脂綿で処理部及びその周囲を拭き取った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は14日の間日に1度観察した。体重は、投与日の投与前、投与7及び14日後に測定した。試験終了時に全ての生存動物を屠殺し、剖検を実施した。

結 果:

| 投 与 方 法 | 経 皮 |
|--------------------|---------|
| 投 与 量 (mg / kg) | 2000 |
| LD50 (mg / kg) | >2000 |
| 死亡開始及び終了時間 | 死亡例なし |
| 症状発現及び消失時間 | 症状の発現なし |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 | 症状の発現なし |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 | 2000 |

雌雄共死亡例は認められなかった。

検体に関連したと考えられる臨床症状は認められなかった。

試験期間中に皮膚刺激性の反応は認められなかった。

全ての動物は、正常な体重増加を示した。

剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(3) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) 皮膚刺激性

ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

(資料 No. 34)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名 : MBI-951 SP)

試験動物 : ニュージーランド白色ウサギ 1群 雄6匹 12~16週齢

開始時体重 2.51~2.80kg

観察期間 : 72時間

投与方法 : 0.6mlの蒸留水で湿らせた0.5gの検体を6匹のウサギの剪毛した背部の皮膚に適用してガーゼ(25×25mm)で覆い、更にその上を外科用粘着テープ(25×40mm)で覆って固定した。パッチは動かない様に伸縮性のテープで胴に固定した。

4時間後に、ガーゼを取り除き適用部位を湿らせた脱脂綿で残存する検体を拭き取った。

観察・検査項目: 検体除去1、24、48及び72時間後に適用部位の皮膚反応を観察した。

刺激性変化の採点は、Draize法に準拠した。

結果 : 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

| 項目 | 最高評点 | 塗布後時間 | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|
| | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 |
| 紅斑・痂皮 | 4 | (0.8) | 0.5 | (0.0) | 0.0 |
| 浮腫 | 4 | (0.3) | 0.0 | (0.0) | 0.0 |
| 合計 | 8 | (1.1) | 0.5 | (0.0) | 0.0 |

1時間から72時間の数字は、6匹の平均、()内の数字は刺激性の評価には使用しなかった。

軽度の紅斑が1時間後の5匹の動物の処理部に認められ、3匹では24時間まで持続した。極軽度の浮腫が1時間後の観察時に2動物に認められた。48時間後には全ての動物が正常に復した。

以上のように検体を4時間半閉塞状態でウサギに接触させて一次刺激性の指数を計算した結果、0.5となり、検体はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があると判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

2) 眼刺激性

ウサギにおける眼一次刺激性試験

(資料 No. 35)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名 : MBI-951 SP)

試験動物 : ニュージランド白色系ウサギ 12~16週齢
開始時体重 2.81~3.16 kg 非洗眼群 雄6匹

観察期間 : 72時間

投与方法 : 検体点眼前に局所麻酔薬を1滴ウサギの両眼に処理し、その後65mgに相当する検体0.1mlを6匹のウサギの右眼に点眼し、左眼は無処理対照とした。洗眼はしなかった。

観察・検査項目: 検体投与後1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩及び結膜の変化を観察した。
刺激性変化の採点は、Kay and Calandraの基準に従った。

結果 : 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

| | 最高評点 | 点眼後時間 | | | | |
|------|------|-------|------|------|------|-----|
| | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | |
| 角膜 | 80 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 虹彩 | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 結膜 | 発赤 | 6 | 2.3 | 2.3 | 0.6 | 0.0 |
| | 浮腫 | 8 | 1.4 | 0.6 | 0.6 | 0.0 |
| | 分泌物 | 6 | 2.3 | 0.3 | 0.0 | 0.0 |
| 合計評点 | 110 | 6.0 | 3.2 | 1.2 | 0.0 | |

数字は群の平均を示す。

角膜及び虹彩には影響は認められなかった。

極軽度から軽度の結膜への刺激性が24時間後の全ての処理眼に認められ、その内2眼では48時間後まで症状は持続した。72時間後には全ての眼が正常に回復した。

以上のように6匹のウサギの結膜囊に1回点眼した場合、結膜に最高評点6.0が観察された。

Kay and Calandraの基準により、アセフェートの50%水溶剤は、ウサギの眼に対して軽度の刺激性があると判断された。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(3) 皮膚感作性

モルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 No. 36)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 50%水溶剤 (試験名 : MBI-951 SP)

試験動物 : Dunkin-Hartley系モルモット 8~12週齢
開始時体重 301~380g、 1群20匹 (陽性対照群1群10匹)

方法 : Buehler法

投与量設定根拠: 無処理のモルモット夫々2匹を用い予備試験を実施した。感作時の濃度に対しては検体を蒸留水で種々の濃度(75%、50%、25%及び10%)に調製した溶液を処理した。6時間閉鎖暴露終了後、24時間及び48時間目に皮膚反応を観察した。その結果最高濃度でも皮膚刺激性を示さなかったため、本試験の感作時の濃度は75%水溶液とした。惹起時の濃度に対しては75%及び50%水溶液を処理し、更に処理0、7及び14日後に再度同様に処理した。どちらの濃度の水溶液も皮膚刺激性を示さなかったため、両濃度を惹起暴露時の濃度とした。

[感作] 試験開始日(0日)に動物の左腹側部を剪毛し、検体の75%水溶液を吸湿性リント布(20mm x 20mm)にしみ込ませて適用部位に置き、外科用粘着テープで固定し、その上をアルミ箔で被覆し、更に伸縮性粘着テープで固定した。この状態を6時間維持した。この手順を8日目及び14日目にも同じ部位に行い、6時間暴露を計3回行った。
陽性対照としてDNCBの0.5%無水エタノール溶液を用い、検体の場合と同様の処理をした。また、夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。

[惹起] 29日目の投与直前に剪毛した動物の右腹側部に検体の75%水溶液をしみ込ませた吸湿性リント布(20mm x 20mm)を置き、外科用粘着テープで固定した。
刺激性のない最高濃度が惹起暴露に用いられたことを確認するために、検体の50%水溶液を右腹側部の別の部位に同様に処理した。これらの部位をアルミ箔で被覆し、伸縮性粘着テープで固定した。陽性対照としてDNCBの0.05%無水エタノール溶液を用い、検体の場合と同様の処理をした。また、夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。処理6時間後にこれらの被覆物を取り除き、処理部を不滅インキで識別出来る様に印を付けた。

観察・検査項目: 惹起貼付除去後24及び48時間目に、右腹部皮膚の感作性変化を観察した。

結果 : 24及び48時間後の皮膚反応の結果を次頁の表にまとめた。

検体投与群の1動物及びその対照群の2動物を7日目と14日目に人道的な理由で夫々切迫屠殺した。検体投与動物及びその対照動物の投与部位には有害な皮膚反応は認められなかった。一方陽性対照として用いたDNCB投与群では1動物が16日目に死亡して発見されたが死因は特定出来なかった。DNCBにより明確に識別出来る紅斑及び僅かな浮腫が認められた。

溶媒である0.05%無水エタノール溶液では感作部位に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、検体はモルモットの皮膚に対して感作性はないと判断された。

本頁に記載された情報に保わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

| 試験群 | | 供試動物数 | 24時間後の感作反応動物数 | | | | | | | | | | 平均評点 | 感作陽性率 |
|------|------------|------------------|---------------|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|------|-------|
| | | | 紅斑 | | | | | 浮腫 | | | | | | |
| | | | 皮膚反応の強さ | | | | | 皮膚反応の強さ | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 検体 | 感作群 (75%) | 19 ¹⁾ | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 感作群 (50%) | 19 ¹⁾ | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 溶媒対照群 | 18 ²⁾ | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 陽性対照 | 感作群(0.05%) | 9 ³⁾ | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1.7 | 100 |
| | 溶媒対照群 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |

| 試験群 | | 供試動物数 | 48時間後の作反応動物数 | | | | | | | | | | 平均評点 | 感作陽性率 |
|------|------------|------------------|--------------|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|------|-------|
| | | | 紅斑 | | | | | 浮腫 | | | | | | |
| | | | 皮膚反応の強さ | | | | | 皮膚反応の強さ | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 検体 | 感作群 (75%) | 19 ¹⁾ | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 感作群 (50%) | 19 ¹⁾ | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 溶媒対照群 | 18 ²⁾ | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 陽性対照 | 感作群(0.05%) | 9 ³⁾ | 2 | 1 | 6 | 0 | 0 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1.4 | 100 |
| | 溶媒対照群 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |

1); 7日目に1動物切迫屠殺、 2); 14日目に2動物切迫屠殺、 3); 16日目に1動物死亡

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(2) アセフェート粒剤の急性毒性

1) 急性経口毒性試験

① ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.37)

試験実施機関: Safepharm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : Sprague-Dawley CD系ラット 1群雌雄各 5匹 8~12週齢
開始時体重 雄; 215~225g 雌; 210~221g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を粉砕して蒸留水に溶解し、一晚絶食させたラットに5000mg/kgの用量で1回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。
給餌は投与後3から4時間に行った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は毎日1度14日間観察した。体重は投与日の投与前、投与後7及び14日目に測定した。途中死亡動物、切迫屠殺動物についてはその都度、生存動物については試験終了時に屠殺・剖検した。

結果:

| 投与経路 | 経口 |
|----------------------------|---------------------|
| 投与量 (mg/kg) | 5000 |
| LD50 (mg/kg) | >5000 |
| 死亡開始及び終了時間 | 死亡例なし |
| 症状発現及び消失時間 | 投与後1時間から発現、投与後2日に消失 |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 (mg/kg) | 全動物に認められた |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg) | 5000 |

死亡例は認められなかった。

全動物は試験期間中に予期した通りの体重増加を示した。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

試験期間中に全体に認められた症状は、運動失調、円背位及び嗜眠であった。

投与4時間後の雄動物に一次的な振戦が認められた。更に呼吸数の低下、外股歩行、血涙及び眼周囲の赤/茶色化が観察された。これらの症状は2日後には正常に回復した。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 38)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年: 2005年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名: MBI-951 5G)

試験動物 : Sprague-Dawley CD系ラット 1群雌 6匹 8~12週齢 開始時体重 ; 183~208g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 以前に実施された試験結果から、雌動物が雄動物より検体に感受性が高いことが分かっていたことから、試験には雌動物のみを用いた。
検体を粉砕して蒸留水に溶解し、一晚絶食させたラットに2000mg/kgの用量で1回強制経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。先ず3匹に投与し、生存が十分に確認されてから次の3匹に投与した。給餌は投与後3から4時間に行った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は毎日1度14日間観察した。体重は投与日の投与前、投与後7及び14日目に測定した。
全生存動物を試験終了時に屠殺・剖検した。

結果:

| 投与経路 | 経口 |
|----------------------------|---------------------|
| 投与量 (mg/kg) | 2000 |
| LD50 (mg/kg) | >2500* |
| 死亡開始及び終了時間 | 死亡例なし |
| 症状発現及び消失時間 | 投与後2時間から発現、投与後1日に消失 |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 (mg/kg) | 全動物に認められた |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg) | 2000 |

*: 2000mg/kgから開始する試験方法のチャートに基づいた値

死亡例は認められなかった。

全動物は試験期間中に予期した通りの体重増加を示した。

試験期間中に全体に認められた症状は、円背位、嗜眠、よろめき歩行、立毛、眼瞼突出、一時的な振戦及び呼吸数の低下であった。これらの症状は2日後には正常に回復した。

剖検では異常は認められなかった。

以上の結果から、2000mg/kgから開始する試験方法のチャートに基づき、検体のLD₅₀値は、2500 mg/kg以上と判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

③ マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 39)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : CD-1系白色マウス 1群雌雄各 5匹 6~8週齢
開始時体重 雄; 23~24g 雌; 21~24g

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 検体を蒸留水に懸濁させ、1晩絶食させたマウスに10ml/kgの容量で1回強制経口投与した。
給餌は投与後3から4時間に行った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後とその後は毎日1回14日間観察した。

体重は投与日の投与前、投与後7及び14日に測定した。

死亡及び切迫屠殺動物についてはその都度、生存動物については試験終了時に屠殺し、剖検した。

結 果:

| 投 与 方 法 | 経 口 |
|----------------------------|----------------------|
| 投 与 量 (mg / kg) | 5000 |
| LD ₅₀ (mg / kg) | >5000 |
| 死亡開始及び終了時間 | 投与後1日に開始、投与後2日に終了 |
| 症状発現及び消失時間 | 投与後1時間から発現、投与後10日に消失 |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 | 全動物に認められた |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 | — |

投与1日後に雌雄各2匹ずつが死亡した。

体重には影響は認められなかった。

全般的に認められた症状は、円背位、嗜眠、運動失調、呼吸数の低下、振戦、流涙及び眼瞼下垂、流涎、喘ぎ呼吸、眼周囲赤/茶色化、四肢の蒼白及び瘦削であった。

試験期間中に死亡した動物の剖検では、肺の出血、肝の暗黒化、腎の暗黒化、胃粘膜の出血及び/又は上皮の肥厚が異常所見として認められた。

試験終了時に解剖した動物には異常は認められなかった。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

2) 急性経皮毒性

① ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No. 40)

試験実施機関: Safepharm Laboratories (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : Sprague-Dawley系ラット 1群雌雄各5匹、10~14週齢
開始時体重 雄; 208~218g 雌; 200~215g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を蒸留水で湿らせてペースト状にし、剪毛したラットの背部(全体表面積の約10%)に体重1kg当たり2000mg/kgの用量で均一に塗布した。その上をガーゼで覆い伸縮性の目の粗い粘着性包帯で固定した。24時間後にガーゼ及び包帯を除去し、検体が残存しないように蒸留水で湿らせた脱脂綿で処理部及びその周囲を拭き取った。

観察・検査項目 : 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は14日間毎日1度観察した。

体重は、投与日の投与前、投与7及び14日後に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を屠殺し、剖検を実施した。

結果:

| 投与方法 | 経皮 |
|--------------------------|------------|
| 投与量 (mg/kg) | 2000 |
| LD ₅₀ (mg/kg) | >2000 |
| 死亡開始及び終了時間 | 死亡例なし |
| 症状発現及び消失時間 | 症状の発現なし |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 | 2000 mg/kg |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 | 2000 mg/kg |

雌雄共死亡例は認められなかった。

検体に関連したと考えられる臨床症状は認められなかった。

試験期間中に皮膚刺激性の反応は認められなかったが、検体の除去により雄2匹、雌4匹の処理部の皮膚が光沢を持っていた。全ての動物は、正常な体重増加を示した。

剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No. 41)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (GLP対応)

報告書作成年: 2005年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : Sprague-Dawley CD系ラット 1群雌雄各5匹、8~12週齢
開始時体重 雄: 236~246g 雌: 212~229g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 検体を蒸留水で湿らせてペースト状にし、剪毛したラットの背部(全体表面積の約10%)に体重1kg当たり2000mg/kgの用量で均一に塗布した。その上をガーゼで覆い伸縮性の目の粗い粘着性包帯で半閉塞状態にした。24時間後にガーゼ及び包帯を除去し、残存した検体を除去するために、蒸留水で湿らせた脱脂綿で処理部及びその周囲を拭き取った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は14日間毎日1度観察した。

体重は、投与日の投与前、投与7及び14日後に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を屠殺し、剖検を実施した。

結果:

| 投与方法 | 経皮 |
|--------------------|--------------|
| 投与量 (mg / kg) | 2000 |
| LD50 (mg / kg) | >2000 |
| 死亡開始及び終了時間 | 死亡例なし |
| 症状発現及び消失時間 | 症状の発現なし |
| 毒性兆候の認められなかった最高投与量 | 2000 mg / kg |
| 死亡例の認められなかった最高投与量 | 2000 mg / kg |

雌雄共死亡例は認められなかった。

検体に関連したと考えられる臨床症状は認められなかった。

試験期間中に皮膚刺激性の反応は認められなかった。

雌1匹が試験の第2週に僅かな体重減少を示した以外は、他の全ての動物は、予期通りの体重増加を示した。

剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) 皮膚刺激性

① ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

(資料 No. 42)

試験実施機関: Safepharma Laboratories(英国) (GLP対応)
報告書作成年: 1998年

検体純度 : 5%粒剤(試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : ニュージーランド白色ウサギ 1群 雄5匹、雌1匹 12~16週齢
開始時体重 2.45~2.79kg

観察期間 : 7日間

投与方法 : 0.5mlの蒸留水で湿らせた0.5gの検体を6匹のウサギの剪毛した背部の皮膚に適用してガーゼ(25×25mm)で覆い、更にその上を外科用粘着テープ(25×40mm)で覆って固定した。パッチは動かない様に伸縮性のテープで胴に固定した。4時間後に、ガーゼを取り除き適用部位を湿らせた脱脂綿で残存する検体を拭き取った。

観察・検査項目 : 検体除去1、24、48及び72時間後に適用部位の皮膚反応を観察した。
刺激性変化の採点は、Draize法に準拠した。
皮膚の回復能力を評価するために7日目にも観察を実施した。

結果 : 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

| 項目 | 最高評点 | 塗布後時間 | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | 7日 |
| 紅斑・痂皮 | 4 | (1.0) | 0.5 | (0.3) | 0.3 | (0.0) |
| 浮腫 | 4 | (0.3) | 0.3 | (0.1) | 0.0 | (0.0) |
| 合計 | 8 | (1.3) | 0.8 | (0.4) | 0.3 | (0.0) |

1時間から72時間の数字は、6匹の平均、()内の数字は刺激性の評価には使用しなかった。

極軽度の紅斑が1時間後の全動物の処理部に認められ、3動物では24時間まで、2動物では48及び72時間後まで持続した。

極軽度の浮腫が1時間後及び24時間後の観察時に2動物に認められ、1動物では48時間後まで持続した。7日後には全ての動物が正常に復した。

以上のように検体を4時間半閉塞状態でウサギに接触させて、一次刺激性の指数を計算した結果、0.8となり、検体はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があると判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② ウサギにおける皮膚一次刺激性スクリーニング試験

(資料 No. 43)

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

③ ウサギにおける急性皮膚刺激性試験

(資料 No. 44)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年: 2005年

検体純度 : 5%粒剤(試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : ニュージーランド白色ウサギ 1群 雄2匹、雌1匹 12~20週齢
開始時体重 2.0~3.5kg

観察期間 : 72時間

投与方法 : 最初に1匹のウサギの背部3ヶ所に0.5mlの蒸留水で湿らせた0.5gの検体を適用してガーゼ(25×25mm)で覆い、更にその上を外科用粘着テープ(25×40mm)で覆って固定した。パッチに接触しないように動物の胴体をコルセットで巻いた。処理3分、1時間及び4時間後に、ガーゼを取り除き適用部位を湿らせた脱脂綿で残存する検体を拭き取った。最初の動物の皮膚反応を考慮した後、追加の2匹の動物の背部1ヶ所を同様に処理して4時間後にガーゼを除去した。

観察・検査項目: 検体除去1、24、48及び72時間後に適用部位の皮膚反応を観察した。
刺激性変化の採点は、Draize法に準拠した。

結果 : 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

| 項目 | 最高評点 | 塗布後時間 | | | | |
|-------|------|-------|------|------|------|----|
| | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | 7日 |
| 紅斑・痂皮 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 浮腫 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

4時間暴露した皮膚に何等刺激性を示す反応は認められなかった。

また、最初の1匹の3分暴露及び1時間暴露についても刺激性反応は認められなかった。

以上のように検体を4時間半閉塞状態でウサギに接触させて、一次刺激性の指数を計算した結果、0.08となり、検体はウサギの皮膚に対して刺激性はないと判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

2) 眼刺激性

① ウサギにおける眼一次刺激性試験

(資料 No. 45)

試験実施機関: Safepharm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 1998年

検体純度: 5%粒剤 (試験名: MBI-951 5G)

試験動物: ニュージーランド白色系ウサギ 12~16週齢 開始時体重 2.88~3.38 kg
非洗眼群 雄5匹、雌1匹、 洗眼群 雄3匹

観察期間: 7日間

投与方法: 検体点眼前に局所麻酔薬を1滴ウサギの両眼に処理し、その後95mgに相当する検体0.1mlを6匹のウサギの右眼に点眼し、左眼は無処理対照とした。

洗眼群は検体点眼後2から3分に微温の蒸留水100mlで処理眼を静かに洗眼した以外は、非洗眼群と同様の処理をした。

観察・検査項目: 検体投与後1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩及び結膜の変化を観察した。

刺激性変化の採点は、Kay and Calandraの基準に従った。更に7日目に回復性を観察した。

結果: 観察された刺激性変化の評点を次頁の表に示した。

非洗眼群では角膜の光沢の曇りが1時間後の4処理眼に認められた。散在性の角膜混濁が24時間後の4処理眼に認められ、3処理眼では48時間、1処理眼では72時間後の観察時まで持続した。虹彩の炎症(程度1)が1及び24時間後に3処理眼で認められたが、これ以外には虹彩への影響は認められなかった。

極軽度から中等度の結膜への刺激性が1及び24時間後の全処理眼に認められ、処理5眼では48時間後にも認められた。極軽度の結膜への刺激性が72時間後の処理3眼に認められたが、7日目にはこれらの症状は消失していた。

洗眼群では散在性の混濁を伴った角膜の光沢の曇りが、1時間後の1処理眼に認められ、この混濁は24及び48時間後の観察時には明白なものとなった。

虹彩の炎症が24及び48時間後の1処理眼に認められた。

極軽度の結膜への刺激性が1時間後の全処理眼に認められ、24時間後には2処理眼で極軽度から中等度の刺激性が認められた。極軽度の発赤が1処理眼で48時間後まで持続した。72時間後には全ての症状は消失していた。

以上のように検体を6匹のウサギの結膜囊に1回点眼し、洗眼処理を施さなかった場合の最高評点は、13.6でKay and Calandraの基準に従えば、検体は、ウサギの眼に対し中等度の刺激性があると判断された。洗眼処理により刺激性はやや軽減されるが、最高評点6.6で軽度の刺激性を示した。

申請者注: 表中の数値は各項目毎の平均値を算出した後に合計評点を算出したため、各観察時点での合計評点を先に算出した後に平均合計評点を算出した報告書の値とは、僅かな数値の違いが認

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

められたが、Kay and Calandraの基準での評価には差はない。

| | | | 最高 評点 | 点 眼 後 時 間 | | | | | |
|------------------|-------------|------|----------|-----------|------|------|------|-----|---|
| | | | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | 7日 | |
| 非 洗 眼 群 | 角 膜 | 混濁程度 | 4 | 0.0 | 0.7 | 0.5 | 0.8 | 0.2 | |
| | | 混濁面積 | 4 | 1.0 | 0.8 | 0.5 | 0.2 | 0.0 | |
| | | 角膜合計 | 80 | 0.0 | 2.8 | 1.3 | 0.8 | 0.0 | |
| | 虹 彩 | | 10 | 2.5 | 2.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 結 膜 | 発 赤 | 6 | 3.6 | 3.3 | 2.6 | 1.3 | 0.0 | |
| | | 浮 腫 | 8 | 3.3 | 3.0 | 1.6 | 0.3 | 0.0 | |
| | | 分泌物 | 6 | 3.6 | 2.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 合計評点 | | 110 | 13.0 | 13.6 | 6.5 | 2.4 | 0.0 | |
| | 洗 眼 群 | 角 膜 | 混濁程度 | 4 | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | — |
| | | | 混濁面積 | 4 | 0.3 | 0.7 | 0.3 | 0.0 | — |
| 角膜合計 | | | 80 | 0.0 | 1.1 | 0.5 | 0.0 | — | |
| 虹 彩 | | 10 | 0.0 | 1.6 | 1.6 | 0.0 | — | | |
| 結 膜 | | 発 赤 | 6 | 2.0 | 2.0 | 0.6 | 0.0 | — | |
| | | 浮 腫 | 8 | 1.3 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | — | |
| | | 分泌物 | 6 | 0.6 | 1.3 | 0.0 | 0.0 | — | |
| 合計評点 | | 110 | 3.9 | 6.6 | 2.7 | 0.0 | — | | |

数字は群の平均を示す。—；観察せず。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② ウサギにおける限一次刺激性スクリーニング試験

(資料 No. 46)

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

③ ウサギにおける眼一次刺激性試験

(資料 No. 47)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 2005年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名 : MBI-951 5G)

試験動物 : ニュージーランド白色系ウサギ 12~20週齢 開始時体重 2.0~3.5 kg
非洗眼群 雄3匹

観察期間 : 72時間

投与方法 : 最初に1匹のウサギ右眼の下瞼を眼球から静かに引き離して結膜嚢内に86mgに相当する検体0.1mlを処理し、左眼は無処理対照とした。最初に処理した動物の反応を考慮して、更に2匹の動物に対して同様に処理した。

観察・検査項目: 検体投与1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩及び結膜の変化を観察した。
刺激性変化の採点は、Draizaの基準に従った。

結果 : 観察された刺激性変化の評点を次の表に示した。

| | | 最高 評点 | 点 眼 後 時 間 | | | | |
|------|------|----------|-----------|------|------|------|-----|
| | | | 1時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | 7日 |
| 角 膜 | 混濁程度 | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 混濁面積 | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 角膜合計 | 80 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 虹 彩 | | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 結 膜 | 発 赤 | 6 | 4.0 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 浮 腫 | 8 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 分泌物 | 6 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 合計評点 | | 110 | 8.0 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

数字は群の平均を示す。

1時間後の観察時点で、薄い灰色の検体の残存物が観察された。

角膜及び光彩への影響は認められなかった。

中等度の結膜の刺激性が処理1時間後の全処理眼に認められ、24時間後にも軽度ではあるが全処理眼に認められた。48時間以降には影響は認められなかった。

以上のように検体は最高評点で8.0を示し、Kay and Calandraの分類に従えば軽度の刺激性があると判断された。

本頁に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

3) 皮膚感作性

① モルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 No. 48)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年: 1998年

検体純度: 5%粒剤 (試験名: MBI-951 5G)

試験動物: Dunkin-Hartley系モルモット 8~12週齢
開始時体重 300~432g、 1群20匹 (陽性対照群1群10匹)

投与方法: Buehler法

用量設定根拠: 無処理のモルモット夫々2匹を用い予備試験を実施し、投与用量を決定した。

感作時の濃度に対しては検体を蒸留水で種々の濃度(75%、50%、25%及び10%)に調製し、処理した。

6時間閉鎖暴露終了後、24時間及び48時間目に皮膚反応を観察した。その結果最高濃度でも皮膚刺激性を示さなかったため、本試験の感作時の濃度は75%水溶液とした。

惹起時の濃度に対しては75及び50%水溶液を処理し、更に処理0、7及び14日後に再度同様に処理した。どちらの濃度の水溶液も皮膚刺激性を示さなかったため、両濃度を惹起暴露時の濃度とした。

[感作]: 試験開始日(0日)に動物の左腹側部を剪毛し、検体の75%水溶液を吸湿性リント布(20mm x 20mm)にしみ込ませて適用部位に置き、外科用粘着テープで固定し、その上をアルミ箔で被覆し、更に伸縮性粘着テープで固定した。この状態を6時間維持した。この手順を7日目及び14日目にも同じ部位に行い、6時間暴露を計3回行った。
陽性対照としてDNCBの0.5%無水エタノール溶液を用い、検体の場合と同様の処理をした。また、夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。

[惹起]: 28日目の投与直前に剪毛した動物の右腹側部に検体の75%水溶液をしみ込ませた吸湿性リント布(20mm x 20mm)を置き、外科用粘着テープで固定した。
刺激性のない最高濃度が惹起暴露に用いられたことを確認するために、検体の50%水溶液を右腹側部の別の部位に同様に処理した。これらの部位をアルミ箔で被覆し、伸縮性粘着テープで固定した。
陽性対照としてDNCBの0.05%無水エタノール溶液を用い、検体の場合と同様の処理をした。また、夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。
処理6時間後にこれらの被覆物を取り除き、処理部を不滅インキで識別出来る様に記しを付けた。

観察・検査項目: 惹起貼付除去後24及び48時間目に、右腹部皮膚の感作性変化を観察した。

結果: 24及び48時間後の皮膚反応の結果を次頁の表にまとめた。
検体投与動物及びその対照動物の投与部位には有害な皮膚反応は認められなかった。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

一方陽性対照として用いたDNCB投与群では1動物を15日目に人道的な理由で切迫屠殺した。
DNCBにより明確に識別出来る紅斑及び僅かな浮腫が認められた。
溶媒である0.05%無水エタノール溶液では感作部位に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、検体はモルモットの皮膚に対して感作性はないと判断された。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

| 試験群 | | 供試動物数 | 24時間後の感作反応動物数 | | | | | | | | | | 平均評点 | 感作陽性率 |
|------|------------|-----------------|---------------|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|------|-------|
| | | | 紅斑 | | | | | 浮腫 | | | | | | |
| | | | 皮膚反応の強さ | | | | | 皮膚反応の強さ | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 検体 | 感作群 (75%) | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 感作群 (50%) | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 溶媒対照群 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 陽性対照 | 感作群(0.05%) | 9 ¹⁾ | 0 | 7 | 2 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.2 | 100 |
| | 溶媒対照群 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |

| 試験群 | | 供試動物数 | 48時間後の作反応動物数 | | | | | | | | | | 平均評点 | 感作陽性率 |
|------|------------|-----------------|--------------|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|------|-------|
| | | | 紅斑 | | | | | 浮腫 | | | | | | |
| | | | 皮膚反応の強さ | | | | | 皮膚反応の強さ | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 検体 | 感作群 (75%) | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 感作群 (50%) | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 溶媒対照群 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 陽性対照 | 感作群(0.05%) | 9 ¹⁾ | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 100 |
| | 溶媒対照群 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |

1) ; 15日目に切迫屠殺

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

② マウスにおける局所リンパ節増殖試験

(資料 No. 49)

試験実施機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年: 2005年

検体純度 : 5%粒剤 (試験名: アセフェート5%粒剤)

試験動物 : CBA/Ca (CBA/CaBkI)系マウス 8~12週齢
開始時体重 15~20g、1群 4匹(雌)

観察期間 : 6日間

投与方法 : 検体をジメチル硫酸に溶解し、1、2.5及び5%溶液を調製した。

1群4匹のマウスの両耳背部に夫々の濃度の溶液を塗布した。6日後に全動物に³H-メチルチミン(³HTdR: 80 μ Ci/mL、比放射能2.0/mモル)を含有したリン酸緩衝食塩水250 μ L(各動物に対して20 μ Ci/mL)を尾の静脈から注入した。³HTdR注入4時間後に全動物を二酸化炭素で窒息死させ、耳介リンパ節を摘出して群毎にプールし、これに1mLのPBSを添加した。更に200メッシュのステンレス製ガーゼを通して凝集しないように、単細胞懸濁液を調製した。この懸濁液を4mLのPBSでペトリ皿に洗い入れ、10mLの遠心管に移し、更に5mLのPBSでペトリ皿を洗い流し、これを遠心管に加えた。10分間1400rpmで遠心分離してペレット化し、これを10mLのPBSに懸濁させて再度ペレット化させ、5%トリクロ酢酸3mL中に懸濁させて放射性物質を沈殿させた。4°Cで一晩放置した後、2100rpmで10分間遠心分離して沈殿物を回収し、10mLのシンチレーション溶液に移した。

用量設定根拠: ジメチル硫酸を溶媒として検体の5%溶液を調製し、1匹のマウスの両耳背部表面に毎日1回、連続して3日間塗布して予備試験を実施した。塗布後6日目まで全身毒性及び過剰な局所刺激性を示さなかった。この結果に基づき、本試験の濃度を1、2.5及び5%とした。

観察・検査項目 : 1日から3日目までは毎日2回、4日から6日目までは毎日1回全動物について毒性症状及び健康状態の異常を記録した。

体重は投与日の投与前と6日目に測定した。

³HTdR総量は β -シンチレーションカウンターで測定した。

リンパ節の増殖は、リンパ節当りの1分間に計測される放射性壊変数及び対照群のリンパ節細胞に取り込まれた³HTdR総量に対する³HTdR総量の割合(増殖指数)として表した。

処理群の少なくとも1濃度で対照群の3倍以上の³HTdR総量の増加が認められた場合に、検体は皮膚感作性を有すると判断した。

結果 : 予備試験及び本試験ともに、死亡例及び毒性症状は認められなかった。

体重変化においても、処理群と対照群に差は認められなかった。

リンパ節当りの放射性壊変数及び増殖指数を次頁の表に示した。

3濃度共増殖指数は3倍未満であり、検体は皮膚感作性を有しないと判断された。

本頁に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は丸紅株式会社及、Sinon Corporation 及び全国農業協同組合連合会にある。

| ジメチル硫酸中の 検体濃度 (%, w/w) | 放射性壊変数 | *放射性壊変数/節 | **増殖指数 | 結果 |
|------------------------------|----------|-----------|--------|----|
| 溶媒 | 7708.40 | 963.55 | — | — |
| 1 | 8768.00 | 1096.00 | 1.14 | 陰性 |
| 2.5 | 10577.54 | 1322.19 | 1.37 | 陰性 |
| 5 | 12054.12 | 1506.77 | 1.56 | 陰性 |

* : 8リンパ節(リンパ節総数)で除した放射性壊変数

** : 各群の平均放射能総量を溶媒対照の平均放射能総量で除した値

IX. 動植物及び土壌等における代謝分解運命

〈代謝分解運命試験一覧表〉

| 資料番号 | 試験の種類及び試験系 | 試験内容・結果の概要 | 試験機関 (報告年) | 頁 |
|------|-------------------------|---|---|-----|
| 1 | 1. 動物代謝 Crl:CDBR系ラット | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 用量 : 1mg/kg 及び 50mg/kg 投与液 : 水溶液 投与経路・回数 : 1回強制経口投与 14日間反復経口投与 調査項目 : 排泄と体内分布(4時点)、血中及び血漿中濃度の推移、尿、糞中の代謝物の定量・同定</p> <p>投与された¹⁴Cは、7日後には高用量で約95%が、低用量で81%から87%が回収され、24時間以内に高用量で84.2%(雄)から87.1%(雌)が、又低用量では72.4%から81.8%(雄)、79.3%から80.4%(雌)が尿中に排泄された。糞への排泄は5.7%(雄高用量)から1.4%(雄低用量)でその殆どが24時間以内に排泄された。168時間後の組織中の残留量は、皮膚、心、肺、脾、肝(高用量のみ)、腎、副腎及び生殖腺(低用量のみ)で高かった。又低用量では、最高9%までがCO₂に変換される揮発性物質として回収された。</p> <p>両用量共検体の吸収は急速に起こり、血漿及び血中の濃度は投与1時間以内に最高値が検出され、高用量の最高値は低用量の約50倍、又AUC(0-t)値は約30倍であった。低用量での血中の半減期が血漿中に比較して3倍高く、放射能が赤血球に結合していることを示唆していた。高用量の血漿及び血中濃度の二次的な上昇は静脈内注射投与により、物質の吸収の影響である事が判明した。尿中に排泄された放射能の殆どが未変化の親化合物であった。</p> | Covance Laboratories (英国) (1998) | 代 7 |
| 2 | 2. 植物代謝 ① トマト | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 用量 : 1.25kg/Ha 投与液 : 水溶液 投与経路・回数 : 茎葉散布; 3回、土壌施用; 2回 調査項目 : 施用方法及び収穫時期の相違による植物体中及び土壌中での放射能の分布、代謝物の同定・定量</p> <p>両施用での放射能の分布は、質的には同じであったが茎葉散布の方が量的には多く認められ、特に果実及び茎葉部では2倍に達した。未成熟期の茎葉部では全放射能の90%以上が抽出可能フラクションに存在し、未変化の親化合物が60%占めた。</p> | Covance Laboratories (英国) (1997) | 代18 |

| 資料 番号 | 試験の種類及び 試験系 | 試験内容・結果の概要 | 試験機関 (報告年) | 頁 |
|----------|----------------|---|---|-----|
| 3 | ②キャベツ | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 用量 : 1.25kg/ha 投与液 : 水溶液 投与経路・回数 : 茎葉散布; 3回、土壌施用; 2回 調査項目 : 施用方法及び収穫時期の相違による植物体中及び土壌中での放射能の分布、代謝物の同定・定量</p> <p>両施用での放射能の分布は、質的には同じであったが茎葉散布の方が量的には多く認められ、成熟期の茎葉部では土壌施用区に比較して2倍に達した。未成熟期の茎葉部では全放射能の80%以上が抽出可能フラクションに存在し、未変化の親化合物が63%占めた。</p> | Covance Laboratories (英国) (1997) | 代30 |
| 4 | ③)オレンジ | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 用量 : 1.25kg/ha、3.75kg/ha 投与液 : 水溶液 投与経路・回数 : 茎葉散布; 3回 調査項目 : 植物体中での放射能の分布、代謝物の同定・定量</p> <p>果実の洗浄水中に全残留放射能の36%が存在し、未変化の親化合物(64.7%)、</p> | Covance Laboratories (英国) (1997) | 代44 |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

| | | | | |
|---|----------|---|---|-----|
| 5 | 3. 土壤中運命 | <p>検 体 : (¹⁴C)-アセフェート 施用量 : 3kg ai/ha 試験条件 : 20°C(5土壤)及び10°C(1土壤)、暗所 試験期間 : 59日間 調査項目 : 土壤中での分解率(DT₅₀及びDT₉₀) 及び代謝物の同定・定量</p> | Covance Laboratories (英国) (1997) | 代51 |
| | | <p>1土壤(D群、壤土)を除いて他の土壤での放射能の回収は92%以上であった。D群土壤では早い時期に炭酸ガスが急激に生成されて放射能が消失したと思われた。20°C下では全土壤で検体は急速に分解され、DT₅₀は1日から3.2日、DT₉₀は3日から10.4日であった。 10°C下のDT₅₀及びDT₉₀は同じ土壤の約2倍であった。</p> | | |

環境に係る試験

| 資料番号 | 試験の種類及び試験系 | 試験内容・結果の概要 | 試験機関 (報告年) | 頁 |
|------|-----------------------|--|---|-----|
| 6 | 4. 土壌吸着 | <p>検体 : アセフェート標準品 初期添加量(μg) : 平衡化試験; 40.00 高次試験; 0.744, 3.720, 18.60, 93.00 供試土壌 : 日本土壌, 4種 試験条件 : 25℃, 48時間 調査項目 : 土壌吸着平衡係数、有機炭素吸着係数、物質収支</p> <p>平衡化試験で土壌への吸着が認められなかったために、平衡化時間が設定出来ず、平衡化時間を48時間として高次試験を実施した。 土壌吸着平衡定数 : 9 (相関係数0.381) 有機炭素吸着係数 : 3.77~21.4 物質収支 : 93.6%~100%</p> | 化学分析コンサルタント (1999年) | 代59 |
| 7-1 | 5. 水中光分解 ① 自然水中光分解 | <p>検体 : アセフェート標準品 供試水 : 相模川河水 濃度 : 50ppm 試験水温 : 23.3~27.0℃ (平均24.9℃) 光源 : キセノンランプ 試験期間 : 14日間 調査項目 : 半減期 (DT₅₀)</p> <p>14日後の残存率 照射区 : 60.5% 非照射区 : 94.0% 照射区のDT₅₀ : 480時間 (20日) (自然環境換算 130.7日) 非照射区のDT₅₀ : 3941時間 (164.2日)</p> | 全農・営農・技術センター (2000年) | 代65 |
| 7-2 | ② 自然水中光分解 | <p>検体 : アセフェート原体 供試水 : 1) 自然水 英国Shardlow DerbyshireのTrent川河水 : 2) 純水 ELGA水精製装置で調製 濃度 : 1) 自然水中 10.02mg/L : 2) 純水中 10.52mg/L 試験水温 : 25±2℃ 光源 : ポリクロムランプ 試験期間 : 1) 自然水 6日間 : 2) 純水 40日間 調査項目 : 半減期 (DT₅₀)</p> <p>1) 自然水 6日後の残存率 照射区 : 13.0% 非照射区 : 84.7% 照射区のDT₅₀ : 4.72日 (日本地域換算26.7日) 2) 純水 40日後の残存率 照射区 : 24.0% 非照射区 : 81.5% 照射区のDT₅₀ : 21.9日 (日本地域換算124日)</p> | Safepharm Laboratories Limt. 英国 (2006年) | 代68 |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及びSinon Corporationにある。

| 8 | ② 緩衝液中光分解 | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 濃度 : 51µg/mL 光源 : キセノンランプ 試験条件 : 25°C、滅菌条件 試験期間 : フロリダの太陽光30.5日間に相当 調査項目 : 光分解率、分解物の同定・定量</p> <table border="1" data-bbox="568 358 1129 632"> <thead> <tr> <th>群</th> <th>DT₅₀(日)</th> <th>DT₉₀(日)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>照射区</td> <td>98</td> <td>324</td> </tr> <tr> <td>非照射区</td> <td>326</td> <td>1083</td> </tr> </tbody> </table> | 群 | DT ₅₀ (日) | DT ₉₀ (日) | 照射区 | 98 | 324 | 非照射区 | 326 | 1083 | Covance Laboratories (英国) (1998) | 代75 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|----------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|-----|----|-----|------|-----|------|---|-----|--|-----|-----|------|----|--|----|--|------|-----|-----|-----|----|-------|-----|--|-----|----|---|-----|
| 群 | DT ₅₀ (日) | DT ₉₀ (日) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 照射区 | 98 | 324 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 非照射区 | 326 | 1083 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 6. 加水分解 | <p>検体 : (¹⁴C)-アセフェート 試験条件 : 50°C (pH4, pH7, pH9) : 38°C (pH4, pH7) : 25°C (pH4, pH5, pH7, pH9) 調査項目 : 分解速度、分解物の同定</p> <table border="1" data-bbox="568 780 1129 1086"> <thead> <tr> <th rowspan="2">DT₅₀(日)</th> <th colspan="4">pH</th> </tr> <tr> <th>pH4</th> <th>pH5</th> <th>pH7</th> <th>pH9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50°C</td> <td>10</td> <td></td> <td>6.2</td> <td>1.1</td> </tr> <tr> <td>38°C</td> <td>44</td> <td></td> <td>34</td> <td></td> </tr> <tr> <td>25°C</td> <td>208</td> <td>359</td> <td>118</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>20°C*</td> <td>492</td> <td></td> <td>560</td> <td>68</td> </tr> </tbody> </table> <p>(* ; アレニウスの式により換算)</p> | DT ₅₀ (日) | pH | | | | pH4 | pH5 | pH7 | pH9 | 50°C | 10 | | 6.2 | 1.1 | 38°C | 44 | | 34 | | 25°C | 208 | 359 | 118 | 33 | 20°C* | 492 | | 560 | 68 | Covance Laboratories (英国) (1999) | 代80 |
| DT ₅₀ (日) | pH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | pH4 | pH5 | pH7 | pH9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50°C | 10 | | 6.2 | 1.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 38°C | 44 | | 34 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25°C | 208 | 359 | 118 | 33 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20°C* | 492 | | 560 | 68 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。
代謝物一覧表

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

1. ¹⁴C標識アセフェートを用いたラット体内における代謝試験

(資料番号 1)

試験実施機関：Covance Laboratories Limited (英国) (GLP対応)

報告書作成年：1998年

検 体：非放射性被験物質 アセフェート

化学名；O,S-ジメチル-N-アセチルホスホロアミドチオエート

放射性被験物質 (¹⁴C)-MBI-951

試験動物：Cri:CDBR系ラット 雄；73匹、雌；70匹

開始時；6から8週齢、177gから336g

試験方法：試験の目的により下記の試験群を設けた。

| 群名 | 試験目的 | 濃度(mg/kg) | 雄 | 雌 | 期間(時間) |
|-----|---------|-----------|----|----|-------------|
| A1 | 排泄 予備 | 50 | 2 | 2 | 168 |
| A2 | PK 予備 | 50 | 2 | 2 | 168 |
| A3* | 排泄 | 1 | 2 | 2 | 48 |
| A4* | 排泄 | 1 | 1 | 1 | 48 |
| A5* | PK (静脈) | 1 | 3 | 0 | 24 |
| B | PK | 1 | 10 | 10 | 120 |
| C | PK | 50 | 10 | 10 | 120 |
| D | PK | 1 | 5 | 5 | 168 |
| E | 排泄 | 50 | 5 | 5 | 168 |
| F** | 排泄 | 1 | 5 | 5 | 168 |
| G | 組織分布 | 1 | 12 | 12 | 0.25、1、3、48 |
| H | 組織分布 | 50 | 12 | 12 | 0.25、1、3、48 |
| I | 胆汁 | 50 | 4 | 4 | 48 |

*；本試験の後に実施した追加試験。PK；ファーマコキネティクス

**；非標識MBI-951を毎日1回14日間にわたって経口投与した。最終投与の24時間後に(¹⁴C)-MBI-951を1回経口投与した。

(¹⁴C)-MBI-951は水に溶解した。(¹⁴C)-MBI-951水溶液に非標識の検体を混合し、経口投与には体重1kg当たり4ml、静脈注射には1mlの名目投与容量になるように水を加えた。投与用量は1及び50mg/kgとし、放射能濃度100µCi/mgに相当する濃度を投与した。

投与はA5群の静脈注射以外は全て強制経口投与した。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

呼気及び糞尿への排泄；

呼気及び糞尿は下記の時間間隔で分別採取した。尿の収集容器はその都度少量の水で洗浄し、この洗浄水は尿試料に加えた。最後の採取時に水及びメタノールを用いてケージを洗浄し、ケージ洗浄水とした。

尿：投与後12及び24時間、以降屠殺時まで24時間間隔

糞：投与後24時間間隔

呼気：0から12時間、12時間から24時間、24時間から48時間

血漿/血中¹⁴C濃度のキネティクス分析；

投与0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24及び48時間後に側尾部の血管から150μLの血液を採取した。血液最終採取後に動物をCO₂で窒息死させ、血液及び血漿中の放射能を分析した。

排泄及び組織中残留試験；

非標識MBI-951を1mg/kg毎日1回、連続14日間投与した後15日目に(¹⁴C)-MBI-951を同用量で1回経口投与した。尿及び糞試料を投与12時間及び24時間後、以降168時間後まで24時間毎に採取した。

ケージ付着物は168時間を通じて各動物毎にプールした。ケージ洗浄水は24及び48間に収集し、48時間から168時間の間はプールした。

168時間後に心臓穿孔刺により屠殺し、次の試料を採取した。

骨、肝、脳、肺、皮膚、筋肉(四頭筋)、脂肪(腎周囲)、副腎、脾、心、腎、
胃腸管(内容物を含む)、カーカス。

尿、糞、ケージ付着物、ケージ洗浄水、組織及びカーカス中の放射能の分析を実施した。

組織内分布；

1及び50mg/kgの用量で(¹⁴C)-MBI-951を1回経口投与した後、0.25、1、3及び48時間目に心臓穿孔刺により各3匹ずつ屠殺し、リチウムヘパリン管に血液を採取して一部を血漿用に用いた。前項と同じ組織を採取し、組織中の放射能を分析した。

胆汁排泄調査；

胆管にカニューレ手術を施し、(¹⁴C)-MBI-951を50mg/kgの用量で1回経口投与した。胆汁は投与前及び投与1、4、6、12、24及び48時間後に採取した。尿及び糞は24時間及び48時間後に採取した。

放射能の測定；

尿、血漿、胆汁、呼気トラップ及びケージ洗浄水は、直接シンチラントに添加し、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

糞、肝、胃腸管及びその内容物及びケージ付着物は適量の脱イオン水でホモジナイズした。骨は乳鉢で粉碎し、カーカスは適量の40%水酸化カリウムのメタノール溶液に浸漬させた。骨、糞及びケージ付着物はサンプルオキシダイザーで燃焼させて、液体シンチレーションカウンターで計測した。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

代謝物のプロファイル；

0から24時間に収集した尿及び糞試料は雌雄別、濃度別にプールして、HPLC及びLC-MSを用いて代謝物のプロファイルを検討した。

胆汁中への放射性物質の排泄が殆ど認められなかったため、胆汁中の代謝物については検討は加えなかった。

結果：排泄及びバランス

1mg/kg及び50mg/kgの濃度で(¹⁴C)-MBI-951を1回及び反復投与して放射能の排泄及び組織残留を検討した。結果を次頁以降の表(第2表～5表)に示した。下表(第1表)に投与168時間後に回収された濃度を投与濃度に対する%で示した。

| 試料名 | D群(1 mg/kg) | | E群(50 mg/kg) | | F群*(1 mg/kg) | |
|--------|-------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| 尿 | 64.99 | 71.91 | 73.46 | 78.29 | 76.31 | 71.78 |
| 糞 | 2.830 | 1.661 | 5.690 | 4.778 | 1.361 | 1.928 |
| ケージ洗浄液 | 9.085 | 9.112 | 14.46 | 10.48 | 6.669 | 10.47 |
| ケージ破片 | 0.005 | 0.185 | 0.356 | 0.505 | 0.001 | 0.017 |
| 組織 | 3.973 | 3.106 | 1.551 | 1.199 | 2.336 | 2.468 |
| 合計 | 80.88 | 85.97 | 95.52 | 95.2 | 86.68 | 86.66 |

*非標識MBI-951を14日間毎日1回経口投与し、最終投与の24時間後に(¹⁴C)-MBI-951を1回経口投与した。

1mg/kg投与群(D群)での投与168時間後に回収された放射能は雄及び雌で夫々80.9%及86.0%であった。ケージ洗浄水中の放射能を含め尿中に回収された放射能は、雄で74.1%、雌で81.0%であった(第1表)。投与した放射能の72.4%及び79.3%が24時間以内に雄及び雌動物の尿中に排泄された(第2表)。糞への排泄は雄で2.8%、雌で1.7%(第1表)で、その殆どが24時間以内に排泄された(第2表)。

168時間後の組織中の濃度は、皮膚、心、肺、脾、肝、腎、副腎及び生殖腺中に高い濃度が検出され、残りの組織では0.05µg equiv./g以下であった(第5表)。

50mg/kg投与群(E群)での168時間後に回収された放射能は雄及び雌で夫々95.5%及び95.3%であった(第1表)。ケージ洗浄水中に回収された放射能を含めた尿中に回収された放射能は87.9%(雄)及び88.8%(雌)(第1表)で、その殆ど(雄で84.2%、雌で87.1%)が24時間以内に回収された(第3表)。

糞への排泄は、雄で5.7%、雌で4.8%で(第1表)、その殆どが24時間以内に排泄された(第3表)。168時間後の組織中の濃度は皮膚、心、肺、脾、腎及び副腎中で高く、その他の組織中では1.00µg equiv./g以下であった(第5表)。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第2表 1回経口投与後の排泄のまとめ (1mg/kg投与 D群)

| 時間 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------|-------|------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 |
| 0 - 12 | 61.57 | 8.175 | 1.619 | 71.36 | 69.17 | 7.529 | 0.792 | 77.49 |
| 0 - 24 | 63.71 | 8.71 | 2.260 | 74.68 | 70.8 | 8.498 | 1.157 | 80.49 |
| 0 - 48 | 64.21 | 8.872 | 2.582 | 75.67 | 71.2 | 8.767 | 1.400 | 81.42 |
| 0 - 72 | 64.54 | 8.872 | 2.681 | 76.09 | 71.5 | 8.767 | 1.532 | 81.82 |
| 0 - 96 | 64.71 | 8.872 | 2.744 | 76.33 | 71.6 | 8.767 | 1.589 | 82.03 |
| 0 - 120 | 64.82 | 8.872 | 2.773 | 76.47 | 71.7 | 8.767 | 1.620 | 82.16 |
| 0 - 144 | 64.92 | 8.872 | 2.811 | 76.61 | 71.85 | 8.767 | 1.649 | 82.2 |
| 0 - 168 | 64.99 | 9.085 | 2.830 | 76.90 | 71.91 | 9.112 | 1.649 | 82.68 |

第3表 1回経口投与後の排泄のまとめ (50mg/kg投与 E群)

| 時間 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------|-------|------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 |
| 0 - 12 | 61.19 | 10.86 | 4.147 | 76.19 | 70.62 | 8.828 | 3.760 | 83.21 |
| 0 - 24 | 70.97 | 13.23 | 4.978 | 89.18 | 70.62 | 9.957 | 4.221 | 91.28 |
| 0 - 48 | 72.94 | 13.90 | 5.371 | 92.21 | 77.83 | 10.22 | 4.583 | 92.63 |
| 0 - 72 | 73.16 | 13.90 | 5.526 | 92.59 | 78.06 | 10.22 | 4.646 | 92.93 |
| 0 - 96 | 73.31 | 13.90 | 5.608 | 92.82 | 78.14 | 10.22 | 4.711 | 93.07 |
| 0 - 120 | 73.38 | 13.90 | 5.646 | 92.92 | 78.20 | 10.22 | 4.740 | 93.16 |
| 0 - 144 | 73.43 | 13.90 | 5.668 | 93.00 | 78.27 | 10.22 | 4.767 | 93.26 |
| 0 - 168 | 73.46 | 14.46 | 5.690 | 93.61 | 78.29 | 10.48 | 4.778 | 93.55 |

第4表 反復経口投与後の排泄のまとめ (1mg/kg投与 F群)

| 時間 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------|-------|------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 | 尿 | ケージ 洗浄水 | 糞 | 合計 |
| 0 - 12 | 73.73 | 6.156 | 0.787 | 80.67 | 69.00 | 9.175 | 1.140 | 79.32 |
| 0 - 24 | 75.36 | 6.444 | 1.099 | 82.90 | 70.54 | 9.895 | 1.509 | 81.94 |
| 0 - 48 | 75.82 | 6.538 | 1.231 | 83.59 | 71.17 | 10.14 | 1.764 | 83.08 |
| 0 - 72 | 76.03 | 6.538 | 1.289 | 83.85 | 71.41 | 10.14 | 1.845 | 83.39 |
| 0 - 96 | 76.13 | 6.538 | 1.332 | 84.01 | 71.56 | 10.14 | 1.884 | 83.58 |
| 0 - 120 | 76.22 | 6.538 | 1.352 | 84.11 | 71.65 | 10.14 | 1.912 | 83.69 |
| 0 - 144 | 76.27 | 6.538 | 1.356 | 84.16 | 71.71 | 10.14 | 1.924 | 83.77 |
| 0 - 168 | 76.31 | 6.669 | 1.361 | 84.34 | 71.78 | 10.47 | 1.928 | 84.17 |

非標識MBI-951を毎日1回14日間わたって連続投与した後に(¹⁴C)-MBI-951を1回投与した。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第5表 投与後168時間後の組織中残留放射能及び回収量

| 組織 | 1回投与 1mg/kg (D群) | | | | 1回投与 50mg/kg (E群) | | | | 反復投与 1mg/kg (F群) | | | |
|-------------|------------------|-------------|----------------|-------------|-------------------|-------------|----------------|-------------|------------------|-------------|----------------|-------------|
| | 雄 | | 雌 | | 雄 | | 雌 | | 雄 | | 雌 | |
| | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% | 残留量 µg eq/g | 回収量 投与量% |
| カーカス | 0.042 | 3.333 | 0.033 | 2.568 | 0.876 | 1.356 | 0.673 | 1.031 | 0.024 | 1.866 | 0.022 | 1.732 |
| 皮膚 | 0.065 | 0.005 | 0.030 | 0.002 | 2.465 | 0.003 | 0.943 | 0.001 | 0.040 | 0.002 | 0.028 | 0.002 |
| 骨 | 0.021 | 0.009 | 0.015 | 0.007 | 0.340 | 0.003 | 0.209 | 0.002 | 0.014 | 0.005 | 0.009 | 0.004 |
| 脳 | 0.023 | 0.017 | 0.021 | 0.015 | 0.302 | 0.004 | 0.204 | 0.003 | 0.016 | 0.009 | 0.015 | 0.011 |
| 脂肪 | 0.033 | 0.002 | 0.020 | 0.001 | 0.580 | <0.001 | 0.237 | <0.001 | 0.013 | <0.001 | 0.010 | <0.001 |
| 心 | 0.051 | 0.021 | 0.047 | 0.017 | 0.756 | 0.006 | 1.200 | 0.009 | 0.056 | 0.020 | 0.048 | 0.019 |
| 肺 | 0.096 | 0.053 | 0.091 | 0.053 | 1.376 | 0.012 | 1.443 | 0.014 | 0.079 | 0.039 | 0.067 | 0.037 |
| 脾 | 0.058 | 0.014 | 0.055 | 0.014 | 1.217 | 0.005 | 1.157 | 0.006 | 0.066 | 0.012 | 0.059 | 0.012 |
| 肝 | 0.053 | 0.200 | 0.055 | 0.211 | 0.847 | 0.064 | 0.796 | 0.058 | 0.046 | 0.142 | 0.038 | 0.136 |
| 腎 | 0.066 | 0.052 | 0.062 | 0.044 | 1.175 | 0.018 | 0.990 | 0.015 | 0.060 | 0.041 | 0.046 | 0.037 |
| 腸管及び 内容物 | 0.021 | 0.193 | 0.018 | 0.166 | 0.226 | 0.064 | 0.189 | 0.058 | 0.026 | 0.168 | 0.048 | 0.470 |
| 筋肉 | 0.040 | 0.003 | 0.030 | 0.002 | 0.615 | 0.001 | 0.471 | 0.001 | 0.024 | 0.001 | 0.019 | 0.001 |
| 副腎 | 0.118 | 0.002 | 0.131 | 0.003 | 2.104 | 0.001 | 3.144 | 0.001 | 0.049 | 0.001 | 0.066 | 0.002 |
| 生殖腺 | 0.060 | 0.070 | 0.058 | 0.003 | 0.598 | 0.014 | 0.713 | 0.001 | 0.032 | 0.029 | 0.030 | 0.004 |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及びSinon Corporationにある。

1mg/kgを反復投与した群(F群)では、1mg/kgの1回投与(D群)の場合と排泄の様相は類似していた。168時間後に回収された放射能は雌雄共に86.7%でその内尿中(ケージ洗浄水を含む)には雄で83.0%、雌で82.3%が排泄され(第1表)、その殆ど(雄;81.8%、雌;80.4%)が24時間以内に排泄された(第4表)。糞への排泄は1.4%(雄)及び1.9%(雌)(第1表)でその殆どが24時間以内に排泄された。168時間後には全組織中に放射能が検出され、心、肺、脾、腎、副腎中に高い濃度が検出され、他の組織では0.05 μ gequiv./g以下であった。

血漿/血中¹⁴C濃度のキネティクス分析;

1回投与後の血漿中及び血中の¹⁴C濃度の推移及びファーマコキネティクスパラメータを第6及び7表にまとめた。

第6表 血漿中及び血中の¹⁴C濃度の推移(各5匹の平均)

| 時間 | 血漿 (μ g equiv./g) | | | | 血中 (μ g equiv./g) | | | |
|------|------------------------|-------|-------------|-------|------------------------|-------|-------------|-------|
| | B群(1mg/kg) | | C群(50mg/kg) | | B群(1mg/kg) | | C群(50mg/kg) | |
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| 0.25 | 0.484 | 0.787 | 27.88 | 43.09 | 0.293 | 0.666 | 19.30 | 33.61 |
| 0.5 | 0.717 | 0.865 | 43.34 | 54.49 | 0.533 | 0.769 | 30.16 | 46.17 |
| 1 | 0.786 | 0.925 | 49.33 | 48.39 | 0.765 | 0.821 | 35.08 | 40.39 |
| 2 | 0.644 | 0.626 | 33.36 | 25.60 | 0.638 | 0.605 | 4.829 | 3.779 |
| 4 | 0.428 | 0.312 | 11.69 | 9.613 | 0.352 | 0.437 | 5.531 | 3.808 |
| 6 | 0.302 | 0.220 | 6.119 | 5.113 | 0.256 | 0.234 | 2.008 | 1.678 |
| 8 | 0.240 | 0.174 | 5.549 | 5.482 | 0.181 | 0.176 | 4.009 | 3.842 |
| 12 | 0.133 | 0.112 | 4.305 | 5.669 | 0.108 | 0.118 | 5.429 | 4.119 |
| 24 | 0.097 | 0.075 | 2.916 | 2.090 | 0.083 | 0.086 | 2.478 | 2.116 |
| 48 | 0.047 | 0.048 | 0.659 | 0.884 | 0.068 | 0.081 | 0.934 | 0.972 |
| 72 | 0.032 | 0.034 | 0.459 | 0.629 | 0.065 | 0.065 | 0.756 | 1.079 |
| 120 | 0.018 | 0.018 | ND | 0.410 | 0.054 | 0.056 | 0.605 | 0.664 |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第7表 血漿及び血中¹⁴C濃度のキネティックパラメータ

| | 血漿 | | | | 血中 | | | |
|-------------------------|------------|-------|-------------|-------|------------|-------|-------------|-------|
| | B群(1mg/kg) | | C群(50mg/kg) | | B群(1mg/kg) | | C群(50mg/kg) | |
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| Cmax* | 0.790 | 0.982 | 49.80 | 53.86 | 0.765 | 0.878 | 35.22 | 46.39 |
| Tmax(h) | 0.900 | 0.750 | 0.900 | 0.500 | 1.0 | 0.750 | 0.9 | 0.6 |
| 半減期(h) | 54.26 | 51.27 | 20.75 | 61.69 | 166.8 | 156.5 | 60.75 | 66.83 |
| AUC _(0-t) ** | 9.665 | 8.794 | 270.8 | 288.4 | 11.16 | 11.98 | 229.0 | 233.3 |
| AUC _(0-∞) ** | 11.12 | 10.12 | 284.8 | 324.9 | 24.08 | 24.68 | 281.7 | 297.3 |

*;単位 μg equiv./g. **;単位 μg equiv. h/g

血中及び血漿中への吸収は急速に起こり、両投与濃度共に1時間以内に放射能の濃度は最高値に達した。両濃度におけるMBI-951のファーマコキネティクスはかなり直線的で、低濃度及び高濃度間での放射能最高濃度は約50倍、無限大までのAUC値では約30倍の差が認められた。低濃度群での血中の半減期は血漿中に比較して約3倍で、これは放射能が赤血球に結合していることを示している。高濃度群では、試料中の放射能濃度が高く、結合の影響がそれほどでもなかったために、この現象はそれほど明白ではなかった。高濃度群での雄動物の血漿中の半減期が比較的短いのは、120時間後に放射能が検出されなかったためである。同群の血中及び血漿中濃度の減少に続いて二次的な放射能レベルの上昇が認められ、吸収による影響か或いは代謝による影響かを検討するために静脈注射によりMBI-951を投与した。この結果、二次的な上昇は認められず、従って高濃度群で観察された現象は代謝過程の相違によるものではなく、物質の吸収による影響と考えられた。

組織内分布；

投与15分、1、3及び48時間後の全組織中に検出され、1時間後には最高濃度に達した。ファーマコキネティクスのデータと一致して組織内の放射能濃度は、低濃度と高濃度投与間に約50倍の差があり、3時間後までそれが顕著であった。48時間後では血中及び血漿中の放射能濃度は他の組織に比較して大幅に減少した。この時点では、肝、腎、肺、副腎及び生殖腺にはまだ高い濃度の放射能が検出された。168時間後(排泄バランス試験)ではこれらの組織中の放射能レベルは48時間目に比較して、2分の1から3分の1まで減少したのみで、このことは放射能が初期には急激な排泄が認められるにも係わらず、ある組織中には低濃度であるが、放射能が残存していることを示している。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第8表 組織内分布 1mg/kg投与群 (G群)($\mu\text{gequiv./g}$)

| 組織 | 0.25時間後 | | 1時間後 | | 3時間後 | | 48時間後 | |
|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| 血漿 | 0.450 | 0.711 | 0.814 | 0.658 | 0.457 | 0.442 | 0.031 | 0.045 |
| 血中 | 0.393 | 0.602 | 0.681 | 0.576 | 0.375 | 0.382 | 0.055 | 0.066 |
| 肝 | 0.389 | 0.460 | 0.640 | 0.488 | 0.444 | 0.451 | 0.152 | 0.183 |
| 腎 | 0.242 | 0.618 | 0.763 | 0.704 | 0.390 | 0.393 | 0.157 | 0.167 |
| 肺 | 0.331 | 0.468 | 0.700 | 0.613 | 0.524 | 0.512 | 0.206 | 0.284 |
| 副腎 | 0.353 | 0.558 | 0.792 | 0.525 | 0.364 | 0.352 | 0.242 | 0.216 |
| 生殖腺 | 0.103 | 0.595 | 0.553 | 0.610 | 0.360 | 0.383 | 0.107 | 0.188 |
| カーカス | 0.222 | 0.360 | 0.543 | 0.477 | 0.335 | 0.292 | 0.079 | 0.076 |

第9表 組織内分布 50mg/kg投与群 (H群) ($\mu\text{gequiv./g}$)

| 組織 | 0.25時間後 | | 1時間後 | | 3時間後 | | 48時間後 | |
|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| 血漿 | 27.84 | 28.10 | 40.59 | 43.26 | 15.98 | 13.41 | 0.435 | 0.492 |
| 血中 | 25.09 | 24.96 | 36.17 | 38.29 | 14.07 | 12.07 | 0.848 | 1.094 |
| 肝 | 24.22 | 23.77 | 28.92 | 29.47 | 13.60 | 12.11 | 2.245 | 2.299 |
| 腎 | 29.61 | 32.71 | 56.02 | 62.39 | 23.56 | 22.66 | 2.455 | 2.159 |
| 肺 | 22.35 | 23.54 | 33.06 | 37.64 | 16.21 | 13.48 | 2.719 | 2.714 |
| 副腎 | 29.23 | 24.41 | 37.75 | 34.64 | 14.79 | 15.92 | 4.684 | 5.720 |
| 生殖腺 | 5.877 | 25.70 | 29.54 | 30.67 | 20.12 | 15.28 | 1.231 | 2.369 |
| カーカス | 13.32 | 12.95 | 26.29 | 30.02 | 12.34 | 9.429 | 1.868 | 1.590 |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

胆汁排泄調査；

| 第10表 胆汁への排泄試験(1群)(投与量%) | | |
|-------------------------|-------|-------|
| | 雄 | 雌 |
| 胆汁 | 0.435 | 0.571 |
| 尿 | 73.85 | 66.19 |
| 糞 | 2.164 | 2.384 |
| ケージ洗浄水 | 8.370 | 12.70 |
| ケージ付着物 | 0.042 | 1.776 |
| カーカス | 6.129 | 7.624 |
| 合計 | 90.99 | 91.24 |

50mg/kg、1回投与48時間後の放射能の回収を第10表に示した。投与量の91.0%及び91.3%が夫々雄動物及び雌動物から回収された。排泄された放射能の大部分は尿中に認められ、ケージ洗浄水中の値を合わせると、雄で投与された量の82.2%、雌で78.9%が回収された。胆汁中には投与量の0.44%及び0.57%のみが夫々雄及び雌動物から回収された。

代謝物のプロファイル；

尿中の代謝物のプロファイル；

0から24時間間にプールした尿中には、投与量の約70%が存在した。

尿中の放射能の87%(投与量の55.1%)から91%(投与量の68.2%)は親化合物として同定された。

糞中の代謝物のプロファイル；

0から24時間間にプールした糞中には投与量の約5%が存在した。

試料中の放射能レベルが低かったためにクロマトグラムはかなり弱いものであったが、代謝物のプロファイルは質的には尿中に見られたものと類似していた。HPLCで親化合物の合成標準品と同時に溶出されたピークが主要物質(最高4.6%)で、

排泄バランス試験に用いた投与群D、E及びF群で収集した24時間までの尿及び糞中の代謝物のプロファイルを検討した。その結果を第11表にまとめた。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第11表 投与24時間後までの尿及び糞中の代謝物合計 (投与量%)

| | D群1mg/kg、1回投与 | | | | E群50mg/kg、1回投与 | | | | F群1mg/kg、反復投与 | | | |
|--------|---------------|------|------------|------|----------------|-----|------------|-----|---------------|------|------------|------|
| | 雄 | | 雌 | | 雄 | | 雌 | | 雄 | | 雌 | |
| | 尿中 | 糞中 | 尿中 | 糞中 | 尿中 | 糞中 | 尿中 | 糞中 | 尿中 | 糞中 | 尿中 | 糞中 |
| 親化合物 | 55.1 | 2.3 | 62.5 | 1.2 | 62.2 | 4.6 | 68.2 | 3.9 | 66.1 | 1.1 | 63.8 | 1.5 |
| 合計 | 60.7 | 2.3* | 69.7 | 1.2* | 68.8 | 5.0 | 75.8 | 4.2 | 73.8 | 1.1* | 69.7 | 1.5* |
| 尿及び糞合計 | 63.0(71.7) | | 70.9(79.4) | | 73.8(87.0) | | 80.0(90.0) | | 74.9(81.3) | | 71.2(81.1) | |

合計の欄の()内の数字は、投与後の最初の24時間には尿に由来するケージ洗浄水中に高い放射能が検出されたためケージ洗浄水中で認められた量を加算した値。この値の方が正確な値をあらわしていると考えられる。

*: クロマトグラム中で識別出来るピークは、親化合物のみであったため、親化合物の値を24時間後に回収した合計値とした。

濃度別或いは低濃度での反復投与の雄及び雌から得られた代謝物のプロファイルには明白な差は認められなかった。

結 論:

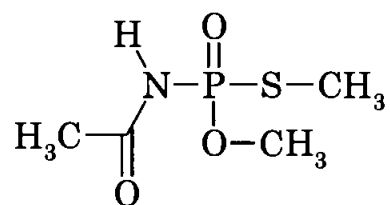
名目濃度1mg/kg及び50mg/kgで1回経口投与した場合、放射能は急速に吸収され、残存する間もなく大量に尿中に主に親化合物として排泄された。

低濃度試験では

投与168時間後にはカーカス及び恐らく赤血球に結合しているために血管系がより多く集約している組織に僅かに放射能が検出された。投与濃度或いは投与回数の増加は、排泄率及び代謝経路には影響を及ぼさず、試験したどの項目にも性差は認められなかった。代謝物は植物代謝試験で認められたものと同一で、代謝経路は次頁の様に推定された。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

MB I - 951 の推定代謝経路



MB I - 951

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

2. 植物における代謝試験

1) トマトにおける代謝試験

(資料番号 2)

試験実施機関：Covance Laboratories Limited (英国) (GLP対応)
報告書作成年：1997年

検 体 : 非放射性被験物質 アセフェート
化学名 ; O,S-ジメチル-N-アセチルホスホロアミドチオエート
放射性被験物質
(¹⁴C)-MBI-951

試験作物 : トマト (*Lycopersicon esculentum*)、品種 Arasta F1

播種日 ; 1996年4月10日、7粒 / コンテナ (45L容量)
1996年5月24日に6本に間引き (第1回目の土壌施用直前)
生育 ; ガラスハウス内
土壌 ; 殺菌土壌、コンポスト、パーライト (2:2:1)

試験方法 :

1. 放射性検体の調製

(¹⁴C)-アセフェート 118.0mg を含有する保存水溶液 (5ml) を調製し全ての施用に用いた。施用 2、3 日前に非標識アセフェート及びその他の内成分を混合して施用溶液を調製した。放射性アセフェートと非標識アセフェートとの混合は 1:3 含有にしたため実際の比放射能は 21.6μCi/mg (47952 dpm / μg) となりこの値を以後の計算に用いた。

2. 施用量、施用方法及び施用時期

実際に用いる 1.25kg ai/ha に基づいて計算し、コンテナ表面積当り、15ml とした。茎葉散布は 1996年5月24日、6月4日及び6月7日に圧縮空気散布器を用いて散布チャンバーの各角から散布した。土壌施用については、1996年5月24日と6月13日に、パスツールピペットを用いて植物の周囲の土壌に処理液を滴下して施用した。

3. 植物試料の採取

3.1 未成熟区

土壌施用区及び茎葉施用区から、最終散布の7日後の1996年6月20日に、茎葉は地際部から、根は根系を掘り起こして軽く叩いてブラシで土壌を掃い、水ですすいで出来るだけ土壌を掃い落とした。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

土壌は表層5から10cmの土壌を採取した。これらの試料は採取日に -20°C の暗所に保存した。

3.2成熟区

果実は1996年8月8日(最終施用の56日後)から10月2日(最終施用の111日後)までの間に3から4日毎に収穫した。茎葉部及び土壌は1996年10月3日に採取し、採取方法は全て未成熟区と同様にした。これらの試料は、採取した当日に -20°C の暗所に保存した。

4. 試料の抽出

各試料からの抽出は下記の図に従って実施した。

4.1未成熟区

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

土壌試料(50g)

4.2成熟区

果実試料(100g)

茎葉部試料(100g)

根部及び土壌からの抽出は未成熟区と同様に行った。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

4.5クロマトグラフィー分析

HPLC分析

前記の濃縮抽出物の一部は、HPLCを用いて分析した。非標識アセフェート及び の参照標準液は、標識化合物と共にクロマトグラフィーにより同時分析し、UV検出器を用いて215nmで検出した。放射能は液体シンチレーションウンターにより計測した。

TLC分析

濃縮抽出物の一部は、Merck silica 60F254薄層を用いて、酢酸エチル:メタノール:水:アンモニア(60:15:5:1)の溶媒で展開し、標識化合物はリニアアナライザーで、非標識標準物質はヨウ素蒸気により可視化した。

4.6抽出不可能放射性残渣の特徴付け

未成熟区の茎葉部の抽出後の固体残渣は、0.1M塩酸(100ml)で磨砕し、液体抽出物は遠心分離により分離し、Whatman No.54ろ紙でろ過後LSCにより放射能を測定した。

未成熟区及び成熟区の茎葉部及び成熟区の果実の抽出後の固体残渣は、2Mの塩酸(150ml)で約3時間還流させて更に抽出した。冷却、遠心分離後に液体抽出物中に残存している放射能はLSCで測定した。

2M塩酸処理後に残存した固体残渣は、6Mの水酸化ナトリウム(100ml)で1晩還流させ、冷却・遠心分離後に液体抽出物中に残存している放射能はLSCにより測定した。

未成熟区の茎葉部の試料は還流に先立ち乾燥を進めるためにアセトンですすぎ、このアセトン中に存在している放射能もLSCで測定した。

4.7マスペクトル分析

アセフェート、

構造決定のため、アセフェート

の参照標準物質溶液、ラットの代謝試験で得られた放射性アセフェート試料、オレンジの代謝試験件で得られた試料及び本試験の抽出試料を用いてマスペクトル分析を実施し、比較検討した。

4.8放射能の測定

抽出後乾燥させた植物及び土壌試料は、サンプルオキシダイザーを用いて酸素中で燃焼させ、液体シンチレーションカウンターで測定した。

結 果:

1. 各処理によるトマト中の放射性残留物の分布

茎葉散布及び土壌施用による、未成熟及び成熟トマトの茎葉部及び根部及び成熟トマト果実中における放射性残留物の分布を表1に示した。

成熟区

果実中の放射性残渣の殆どが、メタノール:水(4:1)で抽出可能で、更に水抽出中に分布した。残渣を更に酸及び塩で抽出したところ、ほぼ等量が夫々で抽出された。土壌施用区で約4%、茎葉散布区で約3%が抽出不可能であった。茎葉部でも同様に殆どがメタノール:水(4:1)及び水で抽

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

出可能で、残渣の酸及び塩抽出では、酸により抽出された量が塩に比較してほぼ2倍量に達した。茎葉部での抽出不可能残渣は、果実に比較して多く土壌施用区で19%、茎葉散布区で13%に達した。

根部では、抽出不可能残渣中に殆どが分布し、土壌施用区で87%、茎葉散布区で83%が残存した。

未成熟区

未成熟区の茎葉部では、土壌施用区及び茎葉散布区と共に、90%以上がメタノール:水(4:1)及び水で抽出された。根部ではメタノール:水(4:1)で抽出された量は、土壌施用区で約50%、茎葉散布区で約45%で、残りは全て抽出不可能な残渣として残存した。

2. トマト中の放射性残留物の特徴付け

メタノール:水(4:1)抽出区分を用いて放射性残留物の特徴付けをTLC及びHPLCで分析し、その結果を夫々表2及び3に示した。

成熟区

果実:

TLC分析では、放射能レベルが低く、試料中に同時に抽出される植物物質の量が多かったために分析は実施しなかった。HPLC分析ではアセフェート及び の存在は認められなかった。各抽出物中に認められた放射能は全て未同定の極性物質で、マススペクトラム分析により構造決定された代謝物 であった。

茎葉部:

メタノール:水(4:1)及び水抽出区分のHPLC分析では土壌施用、茎葉散布共、アセフェート及び は少量検出されたが、大部分は前記の代謝物1であった。TLC分析は水抽出物の放射能レベルが低かったためにメタノール:水(4:1)抽出区分のみについて分析を実施したが、アセフェート及び の存在と量の確認は出来たが TLCでは検出されなかった。

根部:

土壌施用及び茎葉散布のどちらの場合も、HPLC及びTLC分析共にアセフェート及び は検出されず、 のみが検出された。

未成熟区

茎葉部:

未成熟区のHPLCでは、土壌及び茎葉散布区共に、メタノール:水(4:1)及び水抽出区分の主成分は、アセフェート、 であった。

アセフェートの両抽出区分の合計は土壌施用で全体の60.2%、茎葉施用で62.6%であった。

残りは 更に詳細な代謝物の特徴付けのために抽出残渣を2Mの塩酸抽出をした結果、回収はかなり低かった(3%以下)が、土壌施用で

根部:

HPLCでは、メタノール:水(4:1)区分の主成分は、アセフェート、 であった。

アセフェートの量は土壌施用区で22.0%、茎葉散布区で8.9%であった。

各試料の残り であった。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第1表 各処理によるトマト中の放射性残留物の分布

| 試料 | MeOH/H ₂ O ¹ | | 水 ¹ | | 0.1M HCl ¹ | | フラクション 2M HCl ² | | 6M NaOH ² | | アセトン洗浄液 | | 抽出不可能 | | 合計 |
|---------|------------------------------------|------|----------------|------|-----------------------|-----|-------------------------------|------|----------------------|------|---------|-----|-------|------|--------|
| | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | µg/g |
| 成熟区果実 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.033 | 59.0 | 0.008 | 15.3 | NA | NA | 0.007 | 11.8 | 0.006 | 10.1 | NA | NA | 0.002 | 3.8 | 0.055 |
| 茎葉散布 | 0.061 | 63.4 | 0.016 | 16.3 | NA | NA | 0.008 | 8.8 | 0.008 | 8.7 | NA | NA | 0.003 | 2.8 | 0.096 |
| 成熟区茎葉部 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.308 | 44.4 | 0.048 | 6.9 | NA | NA | 0.134 | 19.4 | 0.069 | 10.0 | NA | NA | 0.134 | 19.3 | 0.693 |
| 茎葉散布 | 0.710 | 57.4 | 0.101 | 8.2 | NA | NA | 0.175 | 14.1 | 0.087 | 7.0 | NA | NA | 0.164 | 13.3 | 1.238 |
| 成熟区根部 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.081 | 12.9 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0.547 | 87.1 | 0.628 |
| 茎葉散布 | 0.089 | 16.7 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0.443 | 83.3 | 0.532 |
| 未成熟区茎葉部 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 土壌施用 | 7.528 | 81.2 | 0.930 | 10.0 | 0.109 | 1.2 | 0.401 | 4.3 | 0.146 | 1.6 | 0.037 | 0.4 | 0.120 | 1.3 | 9.270 |
| 茎葉散布 | 10.225 | 82.9 | 1.110 | 9.0 | 0.132 | 1.1 | 0.477 | 3.9 | 0.183 | 1.5 | 0.049 | 0.4 | 0.153 | 1.2 | 12.329 |
| 未成熟区根部 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 土壌施用 | 1.537 | 48.3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 1.642 | 51.7 | 3.179 |
| 茎葉散布 | 0.909 | 43.9 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 1.160 | 56.1 | 2.069 |

NA; データなし。¹; 磨砕抽出。²; 還流抽出

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第2表TLC分析によるトマト中の放射性残留物の特徴付け

| 試料/抽出液 | アセフェート μg/g | バックグラウンド μg/g | 抽出フラクション 合計 μg/g |
|----------------------------|-----------------|------------------|------------------------|
| 成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 0.022 3.1 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 0.084 6.8 % | | |
| 成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 未成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 5.136 55.4 % | | |
| 土壌施用 H ₂ O | 0.610 6.6 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 6.867 55.7 % | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 0.694 5.6 % | | |
| 未成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 0.753 23.7% | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 0.192 9.3% | | |

ND; 検出されず。*; 存在するが、0.0005μg/g 或いは0.05%以下、 下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係る権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第3表HPLC分析によるトマト中の放射性残留物の特徴付け

| 試料/抽出液 | アセフェート | バックグラウンド | 抽出フラクション 合計 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | $\mu\text{g/g}$ | $\mu\text{g/g}$ | $\mu\text{g/g}$ |
| 成熟区果実 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 0.020 2.9 % | | |
| 土壌施用 H ₂ O | 0.003 0.4 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 0.063 5.1 % | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 0.007 0.6 % | | |
| 成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 茎葉施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |

ND ; 検出されず。* ; 存在するが、0.0005 $\mu\text{g/g}$ 以下又は総残留の 0.05%以下
下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第3表 HPLC 分析によるトマト中の放射性残留物の特徴付け (つづき)

| 試料/抽出液 | アセフェート | バックグラウンド | 抽出フラクション 合計 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | $\mu\text{g/g}$ | $\mu\text{g/g}$ | $\mu\text{g/g}$ |
| 未成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 4.990 | | |
| | 53.8 % | | |
| 土壌施用 H ₂ O | 0.591 | | |
| | 6.4 % | | |
| 土壌施用 2M HCl | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 6.988 | | |
| | 56.7 % | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 0.728 | | |
| | 5.9 % | | |
| 茎葉散布 2M HCl | ND | | |
| 未成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 0.700 | | |
| | 22.0 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 0.184 | | |
| | 8.9 % | | |

ND ; 検出されず。

下段は放射性残留物中に占める割合

3. 土壌分析

未成熟区及び成熟区から採取した土壌中の放射性残留及びクロマトグラフィ分析結果を表4に示した。また土壌中の放射性残留物の特徴付けのため、アセトニトリル抽出区分及びアセトン抽出区分を合わせてTLC及びHPLC分析を実施した結果を第5表に示した。

未成熟区:

アセトニトリル:水(7:3)抽出区分にはアセフェートが土壌施用区で52.5%、茎葉散布区で29.9%が検出された。更に残渣からアセトンにより夫々2.7%及び2.0%が抽出された。抽出不可能部分は、夫々44.8%及び68.1%であった。

土壌施用区の放射性残留物のTLC及びHPLC分析による代謝物の特徴付けをした結果、放射能の大部分は、未変化の親化合物(約46%)であった。

成熟区:

アセトニトリル:水(7:3)抽出物には放射性残留物が土壌施用区で2.6%、茎葉散布区で2.8%が検出された。両試料のアセトン抽出中にも僅かに放射能は検出されたが、放射能の大部分は、抽出不可能な残渣として存在した。

成熟区土壌の抽出物については放射能レベルが低いため、クロマトグラフィ分析は実施しなかった。

第4表 土壌分析

放射性残渣量

| 試料 | アセトニトリル | | アセトン | | 抽出不可能区分 | | 合計 µg/g |
|------|---------|------|-------|-----|---------|------|------------|
| | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | |
| 成熟区 | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.011 | 2.6 | 0.005 | 1.1 | 0.405 | 96.3 | 0.421 |
| 茎葉施用 | 0.013 | 2.8 | 0.004 | 0.8 | 0.445 | 96.4 | 0.461 |
| 未成熟区 | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.814 | 52.5 | 0.042 | 2.7 | 0.696 | 44.8 | 1.552 |
| 茎葉施用 | 0.221 | 29.9 | 0.015 | 2.0 | 0.501 | 68.1 | 0.737 |

第5表 放射性残留物の特徴付け

| 試料 | アセフェート | | バックグラウンド | |
|------|--------|------|----------|---|
| | µg/g | % | µg/g | % |
| TLC | 0.723 | 46.6 | | |
| HPLC | 0.698 | 45.0 | | |

試料は未成熟区のアセトニトリルとアセトン抽出区分を合わせたもの(0.856µg/g: 残留合計の55.2%)

ND*; 検出されず、しかし存在するが0.0005µg/g或いは全残留の0.05%以下

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

4. マススペクトラム分析

トマト中の未同定代謝物の構造決定のために、予めラットの代謝試験で使用した調製液を用いてマススペクトラム分析を実施した。この結果

であることを確認した。

トマト中の代謝物の同定には土壌施用及び茎葉散布区の未成熟区の茎葉部のメタノール:水(4:1、v/v)抽出物を用いた。MRMクロマトグラムでは、

存在は確認できた。

別に実施したオレンジの代謝試験でも

の存在が確認されている。

5. 極性代謝物のTLCによる確認

ラットの試料中の代謝物1及び2をHPLCにより分離し、これらを未成熟及び成熟区の根部及び茎葉部の抽出試料と一緒にTLCにより展開した。

その結果、未成熟試料中にこれらの存在が確認された。このクロマトグラフィでは認められ、分離した代謝物の領域に相当するものであった。しかし成熟区の試料についてはクロマトグラフィが鮮明でなかったため判然としなかった。

結 論 :

土壌及び茎葉にアセフェートを施用した結果、全ての植物試料中に放射能の存在が認められ、この化合物が浸透移行性であることを示した。土壌施用及び茎葉散布での放射性残留物の分布は、質的には同じであったが、茎葉散布区の方で量的には多く認められ、特に果実及び茎葉部では2倍に達した。成熟時に採取した試料中には、未成熟時に採取した試料と比較して放射性残留量が少なかったが、これは生育に伴い植物体中での希釈と、土壌からの利用出来る放射能の低下によるものと考えられた。

未成熟区の茎葉部では全放射能の90%以上が抽出可能なフラクションに存在し、未変化のアセフェートの存在(全放射性残留物の約60%)がTLC、HPLC及びマススペクトルにより確認された。

これら以外の抽出可能な残留物は、TLC及びHPLCにより

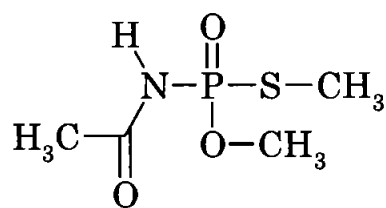
成熟区の茎葉部で抽出可能な残留量が減少していたのは、植物組織内に放射能が広範囲にわたって取り込まれたことによる。これは塩酸及び水酸化ナトリウムで還流した後もかなり高い濃度の抽出不可能な量(13.3%から19.3%)が残存していたことから判断出来る。

又果実中の抽出可能なフラクションは約60%で、アセフェート及びは検出されず、全てであった。

以上の結果から、アセフェートはトマトの体内でを經由する経路及びアセフェートの次頁のような経路を経て代謝分解されると想定される。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

MB I - 951 の推定代謝経路



MB I - 951

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

2) キャベツにおける代謝試験

(資料番号 3)

試験実施機関：Covance Laboratories Limited (英国) (GLP対応)
報告書作成年：1997年

検 体：非放射性検体 アセフェート

化学名；O,S-ジメチル-N-アセチルホスホロアミドチオエート
放射性被験物質
(¹⁴C)-MBI-951

試験作物：キャベツ、品種Destiny F1

播種日； 1996年4月10日、30粒/コンテナ(45L容量)
1996年5月24日に間引き(第1回目の土壌施用直前)
生育； ガラスハウス内
土壌； 殺菌土壌、コンポスト、パーライト(2:2:1)

試験方法：

1. 放射性検体の調製

(¹⁴C)-アセフェート118.0mgを含有する保存水溶液(5ml)を調製し全ての施用に用いた。施用2、3日前に非標識アセフェート及びその他の内成分を混合して施用溶液を調製した。放射性アセフェートと非標識アセフェートとの混合は1:3含有にしたため実際の比放射能は21.6 μ Ci/mg(47952 dpm/ μ g)となりこの値を以後の計算に用いた。

2. 施用量、施用方法及び施用時期

実際に用いる1.25kg ai/haに基づいて計算し、コンテナ表面積当り、15mlとした。茎葉散布は1996年5月24日、6月4日及び6月13日に散布チャンバーの各角から散布した。土壌施用については、1996年5月24日と6月13日に、パスツールピペットを用いて植物の周囲の土壌に処理液を滴下して施用した。

3. 植物試料の採取

3.1 未成熟区

土壌施用区及び茎葉施用区から、最終散布の7日後の1996年6月20日に、茎葉は地際部から、根は根系を掘り起こして軽く叩いてブラシで土壌を掃い、水ですすいで出来るだけ土壌を掃い落とす。土壌は表層5から10cmの土壌を採取した。これらの試料は採取日に-20℃の暗所に保存した。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

3.2成熟区

茎葉部、根部及び土壌は1996年10月3日(最終施用の112日後)に採取した。採取方法は全て未成熟区と同様にした。これらの試料は、採取した当日に-20℃の暗所に保存した。

4. 試料の抽出

各試料からの抽出は下記の図に従って実施した。

4.1未成熟区

茎葉部試料(25g)

更に茎葉部の一部は下記により抽出した。

茎葉部試料(100g)

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

根部の試料は下記により抽出した。

根部試料(30 - 40g)

)

土壌試料(50g)

4.2成熟区

成熟区の茎葉部は下記に従って抽出した。

茎葉部試料(100g)

根部及び土壌からの抽出は未成熟区と同様に行った。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

4.3クロマトグラフィー分析

HPLC分析

前記の濃縮抽出物の一部は、HPLCを用いて分析した。非標識アセフェート の参照標準液は、標識化合物と共にクロマトグラフィーにより同時分析し、UV検出器を用いて215nmで検出した。放射能は液体シンチレーションカウンターにより計測した。

TLC分析

濃縮抽出物の一部は、Merck silica 60F254薄層を用いて、酢酸エチル:メタノール:水:アンモニア(60:15:5:1)の溶媒で展開し、標識化合物はリニアアナライザーで、非標識標準物質はヨウ素蒸気により可視化した。

4.4抽出不可能放射性残渣の特徴付け

未成熟区の茎葉部の抽出後の固体残渣は、0.1M塩酸(100ml)で磨砕し、液体抽出物は遠心分離により分離し、Whatman No.54ろ紙でろ過後LSCにより放射能を測定した。

未成熟区及び成熟区の茎葉部の抽出後の固体残渣は、2Mの塩酸(150ml)で約3時間還流させて更に抽出した。冷却、遠心分離後に液体抽出物中に残存している放射能はLSCで測定した。

2M塩酸処理後に残存した固体残渣は、6Mの水酸化ナトリウム(100ml)で1晩還流させ、冷却・遠心分離後に液体抽出物中に残存している放射能をLSCにより測定した。未成熟区の茎葉部の試料は還流に先立ち乾燥を進めるためにアセトンですすぎ、このアセトン中に存在している放射能もLSCで測定した。

4.5マスペクトル分析

アセフェート、 構造決定のため、アセフェート参照標準物質溶液、ラットの代謝試験で得られた放射性アセフェート試料、オレンジの代謝試験で得られた試料及び本試験の抽出試料を用いてマスペクトル分析を実施し、比較検討した。

4.6放射能の測定

抽出後乾燥させた植物及び土壌試料は、サンプルオキシダイザーを用いて酸素中で燃焼させ、液体シンチレーションカウンターで測定した。

結果:

1. 各処理によるキャベツ中の放射性残留物の分布

1.1 成熟区

成熟区の茎葉部及び根部における放射性残留物の分布を表1に示した。

茎葉部

成熟区の茎葉部の試料は、最終散布112日後に採取した。

放射性残渣の殆ど、即ち土壌施用区では47.7%が、茎葉散布区では53.8%がメタノール:水(4:1)で抽出可能であった。更に7.8%及び8.5%が夫々水抽出中に分布した。残りの抽出不可能残渣は

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

更に酸及び塩で抽出した結果、酸で抽出された量は塩の場合の約2倍であった。土壤施用区の2Mの塩酸還流では25.3%が、6Mの水酸化ナトリウムでは、14.2%が抽出され、茎葉散布では夫々22.1%及び12.0%が抽出された。

根部

根部の試料も又、最終散布112日後に採取した。

メタノール：水(4:1)で抽出された放射性残留物の量は茎葉部に比較して低く、土壤施用区で14.5%、茎葉散布区で21.6%であった。その後の抽出は実施せず、土壤施用区で85.5%、茎葉散布区で78.4%が残渣として残存した。

1.2未成熟区

未成熟区の茎葉部及び根部の放射性残留物の分布も又、表1に示した。

茎葉部

この茎葉部の分析は、100gの副試料について分析した。試料は最終散布の7日後に採取した。放射性残留の殆ど、即ち土壤施用区の73.3%が、茎葉散布区の76.3%がメタノール：水(4:1)で抽出された。更に夫々9.3%及び11.8%が水抽出区分に認められた。残存した固体物質を0.1Mの塩酸で抽出した結果、土壤施用区で1.9%、茎葉散布区で1.8%しか抽出されず、これは本処方が抽出よりもむしろリンスとして機能したと思われた。成熟区の試料と同様に、更に酸及び塩により抽出した結果、土壤施用区で10.3%及び2.6%が2M塩酸及び6M水酸化ナトリウムで抽出され、茎葉散布区では夫々7.0%及び1.5%が抽出された。最終的に抽出不可能な残留量は、土壤施用区及び茎葉散布区で夫々1.7%及び1.0%が検出された。

根部

最終散布の7日後に試料を採取した。

メタノール：水(4:1)中に抽出された量は茎葉部で検出された量に比較して低く、土壤施用区で34.5%、茎葉散布区で37.4%であった。以後の抽出は実施しなかったため、土壤施用区及び茎葉散布区で夫々65.5%及び62.6%が抽出不可能区分として残存した。

2. キャベツ中の放射性残留物の特徴付け

キャベツ中の放射性残留物の特徴について、TLC分析結果を表2、HPLC分析結果を表3に示した。

2.1成熟キャベツ中の残留物の特徴付け

茎葉部

土壤施用及び茎葉散布区のメタノール：水(4:1、v/v)抽出区分のHPLC分析では、アセフェート及びメタミドホスは検出されなかった。水抽出区分では、土壤施用区からは両物質共に検出されなかったが、茎葉散布区の試料中には両物質共痕跡程度の量が検出された(両物質共0.002 μ g/g、0.2%)。残留物の大半はマスペクトル分析により構造決定された極性物質の代謝物1で、メタノール：水(4:1、v/v)抽出区分及び水抽出区分を合わせると、土壤施用区で55.3%、茎葉散布区で61.0%が検出された。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

TLCによる分析は水抽出区分の放射能が低かったために、メタノール:水(4:1、v/v)抽出区分についてのみ実施した結果、HPLCと同様にアセフェートは検出されず、

。

根部

茎葉散布区のメタノール:水(4:1、v/v)抽出区分中には、アセフェートは検出されず、土壌施用区と同抽出区分に痕跡程度認められた。

メタノール:水(4:1、v/v)抽出区分のTLC分析では、存在は確認出来なかった。

2.2未成熟キャベツ中の残留物の特徴付け

茎葉部

土壌施用及び茎葉散布区共に、メタノール:水(4:1、v/v)及び水抽出区分の主成分は、未変化のアセフェートで、夫々56.7%(51.0%+5.7%)及び63.8%(55.6%+8.2%)が検出された。

2Mの塩酸抽出では土壌施用区及び茎葉散布区共に、アセフェートは検出されなかったが、検出された。また茎葉散布区では

根部

メタノール:水(4:1、v/v)抽出区分のHPLC分析では、アセフェートの量は土壌施用区(8.6%)の方が茎葉散布区(1.3%)より多かった。

TLC分析により、HPLC分析により検出されたアセフェート

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第2表TLC分析によるキャベツ中の放射性残留物の特徴付け

| 試料/抽出液 | アセフェート | バックグラウンド | 抽出フラクション 合計 |
|----------------------------|------------------|----------|----------------|
| | µg/g | µg/g | µg/g |
| 成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | ND | | |
| 未成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH H ₂ O | 4.325 48.5 % | | |
| 土壌施用 H ₂ O | 0.512 5.7 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 12.336 52.8 % | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 1.899 8.1 % | | |
| 未成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/H ₂ O | 0.332 8.1 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/H ₂ O | 0.052 1.3 % | | |

ND ; 検出されず。 下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第 3 表 HPLC 分析によるキャベツ中の放射性残留物の特徴付け

| 試料/抽出液 | アセフェート | バックグラウンド | 抽出フラクション 合計 |
|-----------------------------|----------------|----------|----------------|
| | μg/g | μg/g | μg/g |
| 成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/ H ₂ O | ND | | |
| 土壌施用 H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/ H ₂ O | ND | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 0.002 0.2 % | | |
| 成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/ H ₂ O | 0.002 0.1 % | | |
| 茎葉施用 MeOH/ H ₂ O | ND | | |

ND ; 検出されず。 下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第3表 HPLC 分析によるキャベツ中の放射性残留物の特徴付け(つづき)

| 試料/抽出液 | アセフェート μg/g | バックグラウンド | 抽出フラクション 合計 |
|-----------------------------|------------------|----------|----------------|
| 未成熟区茎葉部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/ H ₂ O | 4.550 51.0 % | | |
| 土壌施用 H ₂ O | 0.512 5.7 % | | |
| 土壌施用 2M HCl | ND | | |
| 茎葉散布 MeOH/ H ₂ O | 13.000 55.6 % | | |
| 茎葉散布 H ₂ O | 1.916 8.2 % | | |
| 茎葉散布 2M HCl | ND | | |
| 未成熟区根部 | | | |
| 土壌施用 MeOH/ H ₂ O | 0.356 8.6 % | | |
| 茎葉散布 MeOH/ H ₂ O | 0.052 1.3 % | | |

ND; 検出されず。*; 存在するが、0.0005μg/g以下又は総放射性残留の0.05%以下
下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及びSinon Corporationにある。

2.3 土壌分析

未成熟及び成熟区の生育コンテナーから採取した土壌中の放射性残留物の分布及びクロマトグラフィ分析結果を第4表に示した。

未成熟区は最終散布の7日後に、成熟区は112日後に採取した。

未成熟区

土壌施用区のアセトニトリル:水(7:3, v/v)抽出区分には、34.2%が回収されたが、茎葉散布区では24.5%のみであった。アセトン中にも僅かに抽出されたが、大部分は抽出不可能残渣として残存した。

土壌施用区のアセトニトリル:水(7:3, v/v)及びアセトン抽出区分を混合し、HPLC及びTLC分析を実施した(第5表)。両分析の結果、放射能の大部分は未変化のアセフェートで(31%)で、

成熟区

土壌施用区のアセトニトリル:水(7:3, v/v)抽出区分には3.6%、茎葉散布区では4.4%が含有されていた。各試料中の放射能の大部分は抽出不可能な残渣であった(96.0%)。

成熟区の土壌抽出物については放射能レベルが低いためにクロマトグラフィ分析は実施しなかった。

第4表 土壌分析

| 試料 | アセトニトリル/水 | | アセトン | | 抽出不可能区分 | | 合計 µg/g |
|------|-----------|------|-------|-----|---------|------|------------|
| | µg/g | % | µg/g | % | µg/g | % | |
| 成熟区 | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.002 | 3.6 | ND* | ND* | 0.048 | 96.4 | 0.050 |
| 茎葉施用 | 0.003 | 4.4 | ND* | ND* | 0.059 | 95.6 | 0.062 |
| 未成熟区 | | | | | | | |
| 土壌施用 | 0.249 | 34.2 | 0.011 | 1.5 | 0.467 | 64.3 | 0.727 |
| 茎葉施用 | 0.060 | 24.5 | 0.003 | 1.1 | 0.181 | 74.3 | 0.244 |

ND; 検出されず。*; 存在するが0.0005µg/g以下又は総放射性残留の0.05%以下

第5表 第5表 放射性残留物の特徴付け

| 分析法 | アセフェート | | バックグラウンド | |
|------|--------|------|----------|---|
| | µg/g | % | µg/g | % |
| TLC | 0.223 | 30.7 | | |
| HPLC | 0.226 | 31.1 | | |

試料は未成熟区のアセトニトリルとアセトン抽出区分を合わせたもの(0.260µg/g: 残留合計の35.8%)

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

3. マススペクトル分析

キャベツ中の未同定代謝物の構造決定のために、ラットの代謝試験で調製した調製液を用いてマススペクトラム分析を実施した。

キャベツ中の代謝物の代表事例として、土壌施用及び茎葉散布区の未成熟区の茎葉部のメタノール:水(4:1, v/v)抽出物を用いた。しかしMRMクロマトグラムでは、

更にオレンジの代謝試験の試料についてMRM分析を実施したところ、

存在が確認された。

4. 極性物質のTLCによる確認

ラットの試料中の代謝物1及び2をHPLCにより分離し、これらをキャベツの未成熟及び成熟区の根部及び茎葉部の抽出試料と一緒にTLCにより展開した。

結 論:

土壌及び茎葉にアセフェートを施用した結果、全てのキャベツ試料中に放射能の存在が認められ、この化合物が浸透移行性であることを示した。土壌施用及び茎葉散布での放射性残留物の分布は、質的には同じであったが、茎葉散布区の方で量的には多く認められ、成熟区の茎葉部では土壌施用区の同部位の2倍に達した。成熟時に採取した試料中には、未成熟時に採取した試料に比較して放射性残留量が少なかったが、これは生育に伴い植物体中での希釈と土壌中の残留量の低下にともない土壌から吸収する放射エネルギーの低下によるものと考えられた。

未成熟区の茎葉部では全放射能の80%以上が抽出可能なフラクションに存在し、未変化のアセフェートの存在(全放射性残留物の約63%)がTLC、HPLC及びマススペクトルにより確認された。

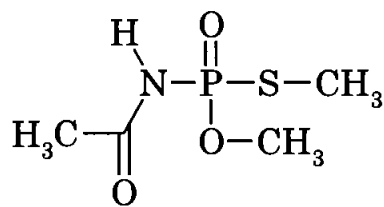
本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

成熟区の茎葉部で抽出可能な残留量が減少していたのは、植物組織内に放射能が広範囲にわたって取り込まれたことによる。これは塩酸及び水酸化ナトリウムで還流した後もかなり高い濃度の抽出不可能な量(37.6%から44.5%)が残存していたことから判断出来る。

以上から、アセフェートはキャベツの体内で 　　　　　　　　　　　 を経由する経路及びアセフェートの 　　　　　　　　　　　 による経路を経て次頁の図のように代謝分解されると想定される。

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

MB I -951 の推定代謝経路



MB I -951

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及びSinon Corporationにある。

3)オレンジにおける代謝試験

(資料番号 4)

試験実施機関：Covance Laboratories Limited(英国)(GLP対応)

報告書作成年：1997年

被験物質：非放射性被験物質 アセフェート

化学名；O,S-ジメチル-N-アセチルホスホロアミドチオエート

放射性被験物質

(¹⁴C)-MBI-951

試験作物：オレンジ(*Citrus sinensis*) 約7年生、6本

生育； 米国ウィスコンシン州、マジソンのCovance Laboratoriesの
温室内

試験方法：

1. 放射性被験物質の調製

(¹⁴C)-アセフェートは、施用する前に非標識アセフェートで希釈した。

その結果、通常散布量の比放射能は、8.905 μ Ci/mg(19769dpm/ μ g)、3倍量の比放射能は、8.763 μ Ci/mg(19453dpm/ μ g)となり、この値を果実及び葉中の親化合物相当の放射能換算にはこの数値を用いた。

2. 施用量、施用方法及び施用時期

処理は3回茎葉散布した。2本は1.25kg ai/ha、1本は3.75kg ai/haの量を処理した。処理は収穫前30日以内の1996年9月5、12及び19日に7日間隔で実施した。

3. 植物試料の採取

最終散布の7日後の1996年9月26日に果実及び葉を採取した。全採取試料を-10から-30℃で保存し、1996年10月8日に英国のCovance Laboratoriesに分析のため送付した。分析用に送付した試料は下表に示した。

| 部 位 | 表 示 | 処 理 量 | 重 量 |
|-----|-----|-------|----------|
| 果 実 | 6T | 通常量 | 738.89g |
| 果 実 | 5T | 通常量 | 1508.96g |
| 果 実 | 8T | 3倍量 | 2070.36g |
| 果 実 | 2C | 無処理 | 1466.02g |
| 葉 | 3T | 通常量 | 158.47g |
| 葉 | 7T | 通常量 | 356.93g |
| 葉 | 4T | 3倍量 | 338.32g |
| 葉 | 1C | 無処理 | 375.31g |

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

4. 試料の分析

4.1 果実の洗浄

無処理(2C; 7個)及び処理(6T; 5個及び5T; 9個)果実を磨砕前に洗浄し、洗浄液を夫々1つの容器に集め、LSCにより測定した。3倍量散布区の試料については分析しなかった。

4.2 果実及び葉の磨砕

個々の果実を4等分し、果肉と果皮とを分離し、夫々少量のドライアイスを加えてブレンダーで磨砕した。葉の試料も同様に磨砕した。

4.3 抽出及び分析

無処理区及び処理区の試料を下記の方法で第1回目の抽出及び分析を実施した。尚、無処理区の試料には放射能が認められなかったため以後の分析は実施しなかった。

作物試料

燃焼(LSC)

メタノール:水(4:1、v/v)の抽出物は合わせてろ過し濃縮した後、倍量の水を用いて遠心分離し、粒状の物質を除去した後クロマトグラフィ分析した。

処理葉のアセトン抽出液は、水中で再構成させたところ非可溶性物質が大量に認められたために、試料をヘキサンで2度分配し、水相及びヘキサン相を夫々濃縮し、水及びヘキサンで希釈した後、水相はHPLC及びTLCで分析し、ヘキサン相はTLCのみで分析した。

果皮及び果肉のアセトン抽出試料の放射能レベルが低かったために以後の分析は実施しなかった。更に同様に第2回目の抽出、分析を実施したが、果肉、果皮及び葉部については下記の方法で抽出分析した。

果肉、果皮及び葉部試料

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

クロマトグラフィ分析には水及びメタノール溶媒系を用いて高速液体クロマトグラフィを用いて、また非標識化合物の検出はUV検出器を用いて215nmで検出した。TLC分析は、酢酸エチル:メタノール:水:アンモニア(60:15:5:1)を用いて展開し、放射能領域を特定し、RITAリニアアナライザーを用いて分析し、非標識化合物についてはヨウ素蒸気により可視化した。

アセフェートの存在の確認と、抽出物中の未同定物質の同定にはマスペクトル分析を実施した。このマスペクトル分析には比較試料として、ラットの代謝試験で得られた抽出溶液を用いた。

放射能の測定には液体シンチレーションカウンター(LSC)を用いた。相関曲線効率は市販のクエンチン標準を用いて計算した。

結果:

表1に各抽出区分における放射性残留物の分布を、表2に放射性残留物の特徴付けを示した。

1. 果実の洗浄液中の放射性残留物

抽出前に果実を洗浄した水(約700mL)中には1.898 μ g/gの放射能が残留していた。

HPLC分析では、本洗浄水中の主成分は未変化のアセフェート(64.7%)で、残りはマスペクトル分析で構造決定された

2. 果実及び葉中の放射性残留物

果肉及び果皮のメタノール:水(4:1、v/v)抽出により全放射能残留量の95.5~96.6%及び90.3%~90.4%が夫々抽出された。果皮には果肉の約10倍の残留量が認められた。

分析した果皮の総重量は578.84gで4.085 μ g/gが残留し、これは比放射能8.905 μ Ci/mgを用いて計算すると21.07 μ Ci/mgが残存したことになり、果実表面の残存放射能の約32%が水で洗浄することにより除去されたことになる。

葉部の放射性残留物の殆ど(90.3%)が、メタノール:水(4:1、v/v)で抽出され、果実(果皮及び果肉の合計)の約16倍の残留量が認められた。

3. 放射性残留物の特徴付け

果実洗浄液、果実、果皮及び葉部の放射性残留物の特徴については表2に示した。

果実洗浄液

HPLC分析では、果実洗浄液中の放射性残留物の殆ど(64.7%)が未変化のアセフェートであった。

しかしTLC分析ではアセフェートが検出された。

果肉

果肉のメタノール:水(4:1)抽出区分のHPLC分析の結果、放射能の大部分が、極性の代謝物1(80.5%~83.1%)として存在し、残りは未変化のアセフェート(9.5%~10.6%)、

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

果皮

果皮の同様の抽出物中の主成分はアセフェートであった(49.4%~49.7%)。

葉部

葉部のメタノール:水(4:1)抽出区分で得られたHPLC分析結果は、果皮の様相と類似していた。

アセフェートは主成分として認められ、

アセフェートは最高54.2%、

葉部のアセトン、水及び2M塩酸抽出物についてHPLC分析を実施した結果、アセトン及び水抽出物中にはアセフェート
検出され、2M塩酸抽出区分には

メタノール:水(4:1)、アセトン及び水抽出区分のTLC分析ではHPLC分析で認められた様相と類似していた。

4. マススペクトル分析

抽出物中の未同定の極性物質の構造を決定するために、ラットの代謝試験で得られた抽出物を比較試料としてマススペクトル分析を実施した。この結果

オレンジの抽出物中の極性物質の構造決定のために葉部のメタノール:水(4:1)抽出区分を選択し、マススペクトル分析を実施した。その結果、上記のラットからの抽出物中に認められた確認された。

結 論：

全ての処理試料中に放射性残留物が認められ、葉部には72.045 $\mu\text{g/g}$ 、果皮中には4.085 $\mu\text{g/g}$ 、果肉中には0.494 $\mu\text{g/g}$ が検出された。葉部に残留量が多かったのは施用が茎葉散布だったこと、容積の割に表面積が大きいことによると思われる。分析に先立って果実を水で洗浄したが、これにより果実上に存在した約30%が除去された。

葉部及び果皮中では、どちらの場合も全放射能の90%以上がメタノール:水(4:1)中に抽出され、50%が未変化のアセフェート、35%が
検出された。

果肉ではメタノール:水(4:1)中に抽出された量は約97%で、高い回収率が認められた。しかし果皮及び葉部の場合と相違して、アセフェートは僅か10%で、

果実の洗浄水中では約65%がアセフェート、
あった。

極性物質のマススペクトル分析では、ラットの代謝試験で検出され物質と同じ物質が確認され、

であった。検出はされなかったが、

以上の結果アセフェートはオレンジ体内で後頁の様な代謝経路を経て代謝分解されると想定される。

本頁に記載されている情報に係る権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

第1表 各処理による果皮、果肉及び葉中の放射性残留物の分布

| 試料 | フラクション | | | | | | | | | | | | | | 合計 μg/g | |
|-----|--------------------------------------|------|-------|-----|-----------------|-----|---------------------|-------------------|----------------------|-----|-----------------------|-----|-------|-----|------------|--|
| | MeOH/ H ₂ O ¹⁾ | | アセトン | | 水 ¹⁾ | | 水 ²⁾ | | 2M HCl ²⁾ | | 6M NaOH ²⁾ | | 抽出不可能 | | | |
| | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | % | μg/g | |
| 果肉 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析A | 0.472 | 95.5 | 0.004 | 0.8 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0.018 | 3.7 | 0.494 | |
| 分析B | 0.477 | 96.6 | NA | NA | 0.011 | 2.3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0.006 | 1.1 | 0.494 | |
| 果皮 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析A | 3.689 | 90.3 | 0.137 | 3.4 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0.258 | 6.3 | 4.085 | |
| 分析B | 3.694 | 90.4 | NA | NA | 0.276 | 6.8 | 0.051 | 1.2 | NA | NA | NA | NA | 0.064 | 1.6 | 4.085 | |
| 葉部 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析A | 67.030 | 93.0 | 1.429 | 2.0 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 3.586 | 5.0 | 72.045 | |
| 分析B | 65.041 | 90.3 | NA | NA | 3.812 | 5.3 | 0.609 ³⁾ | 0.8 ³⁾ | 0.597 | 0.8 | 0.518 | 0.7 | 1.467 | 2.0 | 72.045 | |

NA; データなし。¹⁾; 磨砕抽出、²⁾; 還流抽出、³⁾; アセトン洗浄液を含む
分析Bの抽出不可能残渣は計算によった。

本頁に記載されている情報に係る権利及び責任は丸紅株式会社及び Sinon Corporation にある。

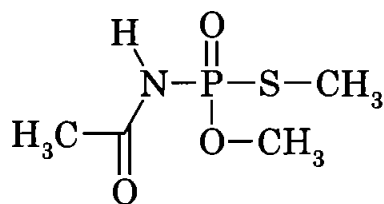
第 2 表 HPLC 分析による放射性残留物の特徴付け

| 試料/抽出液 | アセフェート | バック | 抽出フラク |
|----------------------------|------------------|----------|----------|
| | μg/g | グラント | ション合計 |
| | | μg/g (%) | μg/g (%) |
| 果実洗浄液 | 1.228 64.7% | | |
| 果 肉 | | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O A | 0.052 10.6 % | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O B | 0.047 9.5 % | | |
| 果 皮 | | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O A | 2.016 49.4 % | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O B | 2.031 49.7 % | | |
| 葉 部 | | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O A | 39.072 54.2 % | | |
| 分析 MeOH/H ₂ O B | 37.873 52.6 % | | |
| アセトン A | 1.065 1.5 % | | |
| 水 B | 1.971 2.7 % | | |
| 2M HCL B | ND | | |

ND; 検出されず。*; 存在するが、0.0005μg/g 以下又は総残留の 0.05%以下。 下段は放射性残留物中に占める割合

本頁に記載されている情報に係わる権利及び責任は丸紅株式会社及びSinon Corporationにある。

MB I - 951の推定代謝経路



MB I - 951