

1. 動物体内運命に関する試験

(1) ラットにおける代謝試験

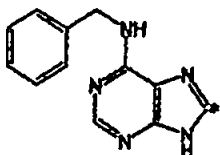
(資料 13)

試験機関

報告書作成年 1978年

供試標識化合物：

構造式；



• ^{14}C 標識

化学名；6-benzylamino [$8\text{-}^{14}\text{C}$] purine

〔プリン環- $8\text{-}^{14}\text{C}$ 〕 6-ベンジルアミノプリン

比放射能；

放射化学的純度；

標識位置の設定理由；

供試動物；CFY系ラット雌雄、体重約 200 g

試験方法；

- 1) 吸収、排泄； に ^{14}C 標識ベンジルアミノプリンを懸濁し、2.5 mg/kg/day
の用量で 1 日 1 回、7 日間連続経口投与した。1 群雌雄各 3 匹を供試した。
ガラス製代謝ケージを用いて、投与後 0~8 時間、8~24 時間及びその後は 24 時間間隔で 12
日間尿を採取し、糞は 24 時間毎に 12 日間採取した。呼吸については最終投与後 6 日間、
を通じて採取して、各々の放射能を測定した。12
日間の試料採取後、動物をと殺して消化管を摘出し、各臓器中の放射能を測定した。

2) 血漿中濃度

- 2-1) 単回経口投与；雌雄各 3 匹のラットに に懸濁した標識 6-ベンジル
アミノプリン 2.5 mg/kg を単回経口投与し、投与後 20、40、60 分、2、4、6、7.5、24、
48、72、120、144、192 及び 240 時間に尾静脈より採血し、血漿中の放射能を測定した。
2-2) 連続経口投与；雌雄各 3 匹のラットに 0.5% トラガカントガムに懸濁した標識 6-ベンジル
アミノプリン 2.5 mg/kg を 1 日 1 回、7 日間連続経口投与した。
2 回目以降の投与直前及び最終投与後 10、20、40、60 分、2、4、6、7.5、24、48、72、
96、120、144、168、192、240 時間に採血し、遠心分離後、血漿中の放射能を測定した。

3) 組織内分布；雌雄各5匹のラットに¹⁴C標識ベンジルアミノプリン2.5 mg/kgを1日1回、7日間連続経口投与した。最終投与後0.5、6、24、72、240時間に雌雄各1匹のラットをと殺し、次の臓器・組織中の放射能測定を行って分布を調べた。肝臓、心臓、腎臓、肺、脳、脾臓、生殖腺、膵臓、副腎、眼、胃腸管(含内容物)、筋肉、脂肪、血漿及びカーカス。

さらに、非妊娠及び妊娠雌ラット各5匹に同様に投与し、最終投与後、非妊娠ラットは0.5、6、24、72、240時間、妊娠ラットは0.5、6、24、48、72時間にそれぞれ屠殺して全身オートラジオグラフィーを作製した。

4) 胆汁排泄；総胆管にカニューレを挿入した雄ラット5匹に、¹⁴C標識ベンジルアミノプリン2.5 mg/kgを単回経口投与した。3匹のラットから、胆汁を3時間毎に48時間まで採取し、尿は0~24及び24~48時間、糞は48時間にそれぞれ採取した。さらに残り2匹のラットから胆汁を0~24、24~48時間に採取し放射能を測定した。

5) 代謝物の分析；7日間連続投与した雌雄ラットから1、4及び7日目に採取した尿及び単回投与後0~24、24~48時間に採取した胆汁を用いて抽出後、で代謝物を定量した。さらに、大量の代謝物を分離するために、2匹の雄ラットに標識6-ベンジルアミノプリン36 mg/kgを単回経口投与し、投与後0~24、24~48時間の尿を採取した。0~24時間の尿を抽出後、TLCで代謝物を分離し、に供した。

試験結果：

1) 吸収、排泄；結果の概要を以下に示した。

<投与量；2.5 mg/kg/day、7日間投与>

試料	性	時間(日)及び累積排泄率(累積投与量に対する割合%、3匹の平均)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
尿	雄	41.8	44.7	44.2	44.5	46.0	46.2	47.0	49.4	51.0	52.0	53.0	53.7
	雌	37.0	39.4	40.5	41.6	43.4	43.6	45.5	47.9	49.5	50.6	51.6	52.2
糞	雄	11.0	10.6	10.9	11.2	11.7	12.0	12.1	12.6	12.7	12.7	12.8	12.8
	雌	8.6	7.8	13.0	12.9	11.2	12.6	12.5	13.5	13.6	13.7	13.7	13.7
呼気	雄							1.0	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4
	雌							0.9	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4
胃腸	雄												0.3
	雌												0.2
カーカス	雄												12.8
	雌												11.9
ゲージ洗 浄	雄												1.4
	雌												2.2
計	雄												82.5
	雌												81.6

(空欄：測定該当なし)

放射能は主に尿中に排泄され、排泄パターンは雌雄間で差はなかった。この結果から、全試験期間を通して総投与量の約10%が呼気系に排泄されたと試算された。カーカス中には約

12%が残存した。

2) 血漿中濃度；結果の概要を以下に示した。

投与量 mg/kg	性	時間及び濃度(μg 親化合物換算/ml, 3匹の平均)													
		分		時 間											
		20	40	1	2	4	6	7.5	24	48	72	120	144	192	240
単回投与 2.5	雄	0.71	0.61	0.39	0.27	0.12	0.10	0.11	0.19	0.12	0.05	0.01	0.03	0.07	0.02
	雌	0.75	0.60	0.41	0.25	0.11	0.10	0.11	0.24	0.13	0.07	0.08	0.06	0.09	0.05
7回投与 2.5	性	投与日数(日)						7日後の時間(分)				同(時間)			
		1	2	3	4	5	6	10	20	40	1	2	4	6	7.5
	雄	0.80	0.81	0.39	0.17	0.32	0.41	0.59	0.78	0.84	0.51	0.40	0.15	0.84	0.83
	雌	0.30	0.32	0.36	0.24	0.89	0.29	1.00	1.08	1.02	0.70	0.64	0.22	0.75	0.68
	性	時 間													
		24	48	72	96	120	144	168	192	240					
		雄	0.09	0.59	0.28	0.05	0.03	0.02	0.04	0.03	0.03				
雌	0.14	0.60	0.22	0.08	0.08	0.05	0.13	0.09	0.02						

<パラメーターのまとめ>

投与	性	パラメーター			
		C _{max} μg/mL	T _{max} (分)	半減期(時間)	AUC _{0-t} μg·h/mL
単回	雄	0.71	20	4.1	16.3
	雌	0.75	20	4.1	23.5
7回	雄	0.84	40	46.2	35.6
	雌	1.08	20	53.3	44.4

註：半減期、AUC は申請者が計算した。単回投与は DFOP モデルを用いて、7回投与は一次速度式から半減期を算出。AUC は 0~240 hr を算出。

反復投与期間中の投与直前の血漿中濃度はほぼ一定であり、このことは血漿中での放射能の蓄積がないことを示している。放射能濃度のピークは、7回投与後 20~40 分に現れたが、さらに 6 時間後と 48 時間後にもみられ、つづく 2 日以内に放射能濃度は急速に減少したが、その後は緩やかに減衰した。

3) 組織内分布；結果の概要を次ページの表に示した。最高放射能濃度は 0.5 時間及び 6 時間後に見られ、肝臓、腎臓及び肺で最も高かった。240 時間後でも同様であった。最高放射能濃度がみられた動物では血漿中濃度より臓器・組織中濃度の方が高く、組織中に放射能がよく吸収されていることを示した。

一方、妊娠及び非妊娠ラットに連続投与した際の全身オートラジオグラフィーでは、両ラットとも肝臓、腎臓、肺、副腎、脾臓及び甲状腺に高い放射能が検出され、脳を除いて全身に分布していた。また、妊娠ラットにおいては乳腺組織で比較的高い放射能が検出され、胎盤には中程度の放射能が検出されたが、胎児中ではごくわずかであった。この結果は、組織内

放射能濃度の結果とよく一致していた。

<2.5 mg/kg/day、7回投与>

組織 臓器	性別、最終投与後時間、及び濃度(μg 親化合物換算/g)									
	雄					雌				
	0.5	6	24	72	240	0.5	6	24	72	240
肝臓	37.9	45.8	39.0	22.8	11.0	73.2	75.0	50.4	36.4	16.5
心臓	3.4	3.6	3.3	3.0	1.9	5.4	4.9	4.4	3.3	2.0
腎臓	7.6	6.9	7.2	5.3	2.7	12.9	10.2	9.0	7.3	4.2
肺	19.6	19.8	17.5	14.0	10.2	27.5	32.5	15.1	18.9	8.8
脳	0.29	0.32	0.24	0.19	0.15	0.38	0.33	0.31	0.24	0.13
胃腸 (含内容物)	11.1	7.4	0.84	0.52	0.20	19.3	8.3	0.98	1.2	0.32
脾臓	2.7	2.6	3.1	2.3	1.4	5.1	5.7	5.3	3.6	2.7
精巣または 卵巣	0.23	0.20	0.18	0.15	0.11	2.3	2.5	2.9	1.8	0.63
膵臓	2.5	2.9	2.3	2.3	0.58	4.5	3.3	3.9	2.8	2.0
副腎	3.4	3.5	4.9	2.4	1.2	5.8	5.3	6.5	4.4	2.2
眼	0.35	0.31	0.11	0.27	0.18	0.40	0.44	0.43	0.33	0.16
筋肉	0.55	0.49	0.43	0.39	0.24	0.77	0.60	0.59	0.41	0.44
脂肪	0.52	0.51	0.56	0.27	0.28	0.46	0.53	0.78	0.30	0.38
血漿	0.41	0.32	0.15	0.07	0.02	0.71	0.17	0.09	0.12	0.02
カーカス	0.83	0.69	0.66	0.66	0.43	1.1	0.94	0.71	0.70	0.43

4) 胆汁排泄；結果の概要を以下に示した。

胆汁中には平均 23.6%が排泄され、尿中に 39.8%、糞中には 3.1%が排泄された。

肝臓中に 17.5%が残存した。

<投与量：単回投与、2.5 mg/kg>

試料	投与量に対する割合%、3匹の平均	
	0~24 時間	0~48 時間
胆汁	23.5	23.7
尿(含ケージ洗浄)	34.9	39.8
糞		3.1
カーカス		5.9
肝臓		17.5
胃腸(含内容物)		0.5
計		90.5

5) 代謝物の TLC 分析 ; 尿から約 9 成分、胆汁から 11 成分が認められ、尿中代謝物の一つは、
であった。

<尿中及び胆汁中の代謝成分の分布>

成分 No.	1 日後の尿中の分布割合%				0~24 時間胆汁中の 分布割合%	
	0~8 時間		8~24 時間		成分 No.	雄
	雄	雌	雄	雌		
1						
3						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						

註 : 尿中と胆汁中の同一成分 No. は、同一の代謝物を意味するものではない。

(2) ラットにおける代謝試験

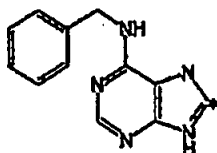
(資料 17)

試験機関

報告書作成年 1989 年

供試標識化合物：

構造式；



• ¹⁴C 標識

化学名；6-benzylamino [8-¹⁴C] purine

[プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリン

比放射能；

放射化学的純度；

標識位置の設定理由；

供試動物：ウイスター系ラット 雄(7~8週令)、雌(9~10週令) 体重約 200 g

試験方法：

1) 投与液の調製及び投与方法

¹⁴C 標識-ベンジルアミノプリンを非標識体ベンジルアミノプリンで希釈し、

に懸濁して投与液を調製した。シリンジを用いて胃挿管法により上記投与液を

5 ml/kg の割合でラットに単回経口投与した。

2) 試験群の構成と飼育管理は次のとおり。

試験項目	投与量(mg/kg)	1群当り動物数	飼育管理
排泄バランス(予備)	10	雄 1、雌 1	個別密閉ガラス代謝ケージ、 飼料、水は自由摂取
排泄バランス	10、200	雄 3、雌 3	
胆汁排泄	10、200	雄 3	解放拘束ケージ
血中濃度変化	10、200	雄 3、雌 3	雌雄ごとにステンレスバッテリー ケージ、飼料、水は自由摂取
組織内分布	10、200	雄 8、雌 8	

3) 分析方法

・放射能の測定；液体シンチレーションカウンター

・代謝物の同定、定量；シリカゲル TLC によるコクロマトグラフィー(傾相系)及び HPLC

4) 排泄バランス

投与後 14 日間にわたり、尿は 0~6 時間、6~24 時間、その後 24 時間間隔で、糞は 24 時間間
隔で、呼吸は 24 時間間隔で 中に、それぞ
れ採取した。

14 日後に動物を心穿刺により屠殺し、消化管、肝臓、腎臓を摘出し、また、血液も採取した。

5) 胆汁排泄

投与後 48 時間にわたり、胆管にカニューレを挿入した動物から胆汁を 3 時間間隔で 12 時間まで、その後は 12 時間間隔で 48 時間まで採取した。

6) 血中濃度の変化

投与後 120 時間まで尾静脈より 12 回、経時的に採血した。遠心分離により血漿を分離し、放射エネルギーを測定した。

7) 組織内分布

投与後 3 時点(雌雄別々の時点)に動物を屠殺し、血液、副腎、脳、眼、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、下垂体、膵臓、胸腺、甲状腺、生殖器、子宮、骨、骨髄、脂肪、筋肉を抽出し、放射エネルギーを測定した。

8) 代謝物分析用試料

尿、糞は各群の雌雄各 3 匹についてそれぞれ試料をプールした。

尿試料は 0~24 時間、24~48 時間を別々とし、糞試料は 0~48 時間、胆汁は雄のみ各群 3 匹について 0~6 時間をプールした。

尿試料は直接 HPLC または TLC に、胆汁試料は直接 HPLC で分析した。糞試料は溶媒抽出、遠心分離、濃縮操作ののち HPLC で分析した。

肝臓、腎臓、肺(雌雄別々に)は 10 mg/kg 群投与 1 時間後、200 mg/kg 群投与 6 時間後の屠殺動物から抽出し、各群 3 匹の試料をプールした。組織試料をホモジネートし、抽出、遠心分離、濃縮後に HPLC で分析した。

試験結果：

1) 排泄物中の放射能の変化 (投与量に対する割合、%)

試験区分		予備試験		本試験(3匹平均)			
性別		雄	雌	雄		雌	
投与量(mg/kg)		10	10	10	200	10	200
試料	採取時点						
呼吸	1日	11.0	12.9	10.9	6.62	8.78	4.99
	2	0.38	0.66	1.23	2.30	1.42	2.29
	3	0.70	0.84	0.59	0.69	0.51	0.48
	4	0.86	0.25	0.74	0.57	0.64	0.32
	5	0.40	0.31	0.41	0.57	0.43	0.48
	6	0.36	0.49	0.42	0.36	0.44	0.23
	7	0.28	0.76	0.31	0.29	0.44	0.34
	8-14	1.05	1.83	1.18	1.61	1.57	2.16
	計	14.8	17.5	15.3	13.0	14.2	11.3
尿	6時間	37.6	28.8	34.1	8.22	32.7	10.2
	1日	11.5	20.1	11.7	33.4	9.78	34.4
	2	3.08	4.80	4.09	6.42	3.87	8.31
	3	2.11	3.34	1.90	3.18	2.44	3.31
	4	1.54	2.28	1.31	2.09	1.82	1.70
	5	1.14	1.02	1.06	1.60	1.15	1.46
	6	0.78	0.86	0.82	1.18	0.98	0.87
	7	0.73	0.66	0.70	0.81	0.79	0.81
	8-14	2.92	2.63	3.17	2.92	3.18	2.19
計	61.4	62.5	58.8	59.9	56.7	63.3	
糞	1日	13.0	7.17	10.8	7.77	8.61	6.57
	2	0.89	1.43	1.88	5.28	2.96	4.27
	3	0.18	0.26	0.30	0.44	0.29	0.38
	4	0.09	0.09	0.08	0.11	0.09	0.09
	5	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.08
	6	0.04	0.04	0.03	0.04	0.06	0.05
	7	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
	8-14	0.11	0.13	0.09	0.10	0.12	0.12
	計	14.4	9.19	12.8	13.8	12.2	11.6
ケージ洗液	7日	0.07	0.13	0.08	0.29(5日)	0.05	0.19(5日)
	14	0.02	0.06	0.03	0.06	0.03	0.04
屍体	14日	4.41	5.97	6.30	6.49	7.23	6.75
合計		95.1	95.4	93.3	93.5	90.4	93.2
総吸収率(%)		80.7	86.2	81.0	79.7	78.2	81.6

2) 胆汁排泄 (投与量に対する割合、雄3匹の平均)

試料	採取時間	投与量(mg/kg)		試料	採取時間	投与量(mg/kg)	
		10	200			10	200
胆汁	0-3	3.34	1.76	尿	0-24	35.7	31.5
	3-6	6.09	2.23		24-48	5.55	9.47
	6-9	5.72	2.39		計	41.3	40.9
	9-12	2.26	2.25	糞	0-24	3.19	2.56
	12-24	3.79	10.8		24-48	1.07	1.73
	24-36	0.72	3.20		計	4.26	4.29
	86-48	0.12	0.09	ケージ洗液	48	0.56	0.44
計	21.5	22.7	合計		67.6	68.4	

3) 血中濃度の変化 (μg 親化合物換算/ml, 各群 3 匹の平均)

試料	性別	全血				血漿			
		雄		雌		雄		雌	
		10	200	10	200	10	200	10	200
採取時間	投与量(mg/kg)								
	0.25	3.68	14.1	3.27	15.8	2.17	10.1	2.15	10.8
	0.5	7.58*	21.1	8.41	22.4	3.24	14.3	2.47	18.6
	1	5.77	25.1	4.03	25.8	3.20	16.7	2.33	16.4
	2	3.26	26.1	3.47	26.1	1.63	18.8	1.48	17.5
	4	2.10	29.3	2.65	26.7	0.38	21.8	0.55	16.8
	6	1.97	31.5	2.37	29.2	0.25	22.8	0.45	19.2
	12	1.65	32.0	2.05	24.6	0.88	22.7	1.01	17.6
	24	1.53	21.0	1.88	29.5	0.28	4.2	0.33	11.8
	48	1.37	15.7	1.60	19.7	0.08	2.0	0.13	4.2
	72	1.13	12.0	1.36	16.8	0.17	7.2	0.25	8.9
	96	0.96	10.7	1.15	14.0	0.46	5.6	0.49	6.4
120	0.82	8.7	0.72	12.7	0.39	0.8	0.41	2.4	

* 1 匹が異常に高い値であったため、血中最高濃度から除外した。

全血中放射能濃度の平均半減期：24 時間以降について検討したところ、10 mg/kg 群では雌雄一緒にして 104 時間、200 mg/kg 群の雄では 78 時間、雌では 81 時間であった。

申請者註：上表にもとづき半減期及び AUC を以下のとおり申請者が算出した。

全血中濃度の減少では、二相性がみられた。血漿中の変化では複数の極大値がみられたので、 C_{max} からの α 相半減期のみを記した。

相	試料	全血				血漿			
		雄		雌		雄		雌	
		10	200	10	200	10	200	10	200
α 相	投与量 (mg/kg)								
	T_{max} (時間)	1	12	1	24	0.5	6	0.5	6
	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.77	32.0	4.03	29.5	3.24	22.8	2.47	19.2
	計算ポイント (時間)	1-6	12-48	1-12	24-72	0.5-120	6-120	0.5-120	6-20
	半減期 (時間)	3.4	37.1	12.0	59.2	55	34	69	47
β 相	β 相開始時間 (時間)	4	48	12	72				
	計算ポイント (時間)	6-120	48-120	12-120	72-120				
	半減期 (時間)	98	88	78	119				
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)		161	1945	169	2381	42	829	49	1027

4) 組織内濃度の分布

< μg 親化合物換算/g または ml >

投与量(mg/kg)		10						200					
性別		雄			雌			雄			雌		
屠殺時間 hr		1	12	168	1	12	168	6	24	168	6	24	168
臓器・組織	副腎	7.0	4.8	1.7	10.0	8.5	8.0	62.9	95.2	57.6	97.1	158	72.2
	骨	1.3	0.9	0.3	1.3	0.8	0.2	10.2	16.1	5.1	6.7	16.0	4.0
	骨髄	2.4	1.0	0.2	3.4	1.1	0.3	17.0	15.5	9.2	15.4	22.7	3.9
	脳	0.8	0.2	0.1	1.1	0.2	0.1	8.3	3.5	2.2	6.1	5.0	2.2
	眼	1.4	0.5	0.2	1.7	0.4	0.2	7.5	7.9	4.0	6.9	10.9	3.5
	脂肪	0.8	0.3	0.2	1.1	0.8	0.3	9.8	6.4	4.3	5.3	7.0	3.2
	心臓	4.2	3.3	1.3	6.0	2.9	1.7	31.9	51.7	37.0	30.5	64.8	35.9
	腎臓	13.4	7.2	2.8	18.9	8.3	4.4	85.7	153	76.0	78.0	192	83.0
	肝臓	24.2	42.9	10.9	30.1	48.3	18.9	196	635	217	161	751	314
	肺	9.8	20.2	7.2	15.0	20.6	10.0	70.6	225	104	78.8	260	126
	筋肉	2.0	0.3	0.2	2.8	0.4	0.3	14.2	8.9	5.5	12.5	12.2	5.5
	卵巣	-	-	-	4.3	1.8	0.6	-	-	-	21.1	46.0	14.6
	脾臓	3.8	2.6	1.1	5.7	3.2	1.9	31.9	47.1	32.9	31.1	62.5	42.5
	下垂体	3.1	2.1	0.7	4.6	1.5	0.7	19.6	32.9	8.7	24.6	43.5	11.6
	脾臓	3.2	3.0	0.7	5.0	3.3	2.1	26.8	46.1	16.0	27.4	88.9	34.0
	精巣	1.3	0.2	0.1	-	-	-	11.0	4.4	2.0	-	-	-
	胸腺	1.9	0.7	0.2	2.8	0.8	0.3	14.9	11.5	5.9	13.3	18.3	6.6
	甲状腺	4.3	4.7	1.8	5.3	5.2	2.2	36.4	86.4	110	125	104	41.1
	子宮	-	-	-	4.7	1.4	0.4	-	-	-	19.2	24.7	9.7
	全血	4.1	2.5	1.3	5.8	2.3	1.8	28.1	27.2	15.1	27.8	34.4	17.8
血漿	3.3	0.3	0.02	4.7	0.6	0.02	18.1	5.4	0.3	20.4	13.1	0.3	

5) 尿中代謝物

HPLC 分析の結果、12種の構成成分が得られたが、同定された代謝物は次のとおりであった。

< 投与量に対する割合、% >

試料	代謝物 []は本抄録中の略称	投与量(mg/kg)			
		10		200	
		雄	雌	雄	雌
0~24, 0~48 時間、雌雄 各3匹のプ ール尿の合 計					

*このうち、例えば雄の 10 mg/kg 群、0~24 時間尿から分離した成分では放射能の約 % がと判明した。24~48 時間尿中にも の存在が確認された。親化合物は検出されなかった。

6) 糞中代謝物

8種の成分が HPLC で得られたが、 のみが同定された。

その定量値は 10 mg/kg 群の雄で %AR、雌で %AR、200 mg/kg 群の雄で %、雌で %であった。

7) 胆汁中代謝物

13 種の成分が分離され 5 種が尿中成分と一致した。そのうち同定されたものはのみで各投与群とも %AR であった。そのほか、胆汁中放射能の 10% 以上を占める成分が 5 種認められた。

8) 組織中代謝物

抽出可能な放射能の割合は肝臓<腎臓<肺の順で増加した。低用量群の雄の組織抽出物について HPLC 分析を行った結果、が主要代謝物で、親化合物の存在も確認できた。

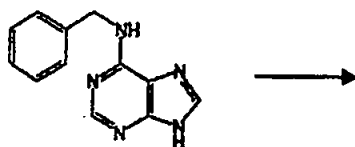
以上の結果、ベンジルアミノプリンのラット体内での主要代謝物は

であり、他にであった。排泄は長期にわたり、血中濃度の減少もゆるやかで、肝臓、腎臓、肺、副腎、甲状腺を中心に臓器中に分布した。中に %~ %AR がとして排泄され、肝臓中に高いレベルの放射能が存在した。

代謝経路としては、

が考えられた。

ラット体内における想定代謝経路を以下に示した。



6-ベンジルアミノプリン

(3) イヌにおける代謝試験

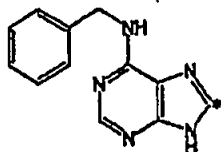
(資料 18)

試験機関

報告書作成年 1989 年

供試標識化合物：

構造式：



• ¹⁴C 標識

化学名：6-benzylamino [8-¹⁴C] purine

[プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリン

比放射能：

放射化学的純度：

標識位置の設定理由：

供試動物：ビーグル犬、雌雄 6~7 ヶ月令、体重 10~14 kg

試験方法：

1) 投与液の調製及び投与方法、投与量

¹⁴C 標識ベンジルアミノプリンを非標識ベンジルアミノプリンで希釈し、

に懸濁して投与液を調製した。シリンジを用いて胃挿管法により上記投与液を 1 匹
当り約 50 ml の割合で単回経口投与した。

2) 試験群の構成と飼育管理は次のとおり。

試験項目	群	投与量(mg/kg)	1群当り動物数	飼育管理
尿糞排泄バランス 血中濃度変化 組織内分布	1a	5	雄 2、雌 2	ステンレススチール代謝ケージ、 飼料、水は自由摂取
	2a	100	雄 2、雌 2	
呼吸排泄 組織内分布	1b	5	雄 1、雌 1	密閉スチール箱、 投与後 24 時間給餌、給水せず
	2b	100	雄 1、雌 1	

3) 分析方法

・放射能の測定：液体シンチレーションカウンター

・代謝物の同定、定量： によるコクロマトグラフィー(傾相系)及び HPLC

4) 尿、糞排泄バランス 1a, 2a

14 日間にわたり、尿は投与後 0~6 時間、6~24 時間、その後 24 時間間隔で、糞は 24 時間間
隔でそれぞれ採取した。

5) 血中濃度の変化 1a, 2a

投与前 1 回及び投与後 336 時間まで 11 回、計 12 回、経時的に頸静脈より採血した。全血及び血漿中の放射エネルギーを測定した。

6) 組織内分布 1a, 2a

上記試験の動物を 14 日目にシャ血により屠殺し、副腎、小脳、大脳、眼、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、脳、下垂体、卵巣、精巣、子宮、脾臓、胸腺、甲状腺、骨、骨髄、脂肪、筋肉、皮膚を摘出し、放射エネルギーを測定した。

7) 呼気中排泄 1b, 2b

0~24 時間の呼気を にトラップ・採取した。同時に 0~24 時間の尿及び糞を採取した。

8) 組織内分布 1b, 2b

低用量群；投与後 1 日に動物を屠殺して、肝臓、腎臓及び膀胱の内容物を取り出し、放射エネルギーを測定した。

高用量群；投与後 14 日に動物を屠殺して、6)と同じ臓器・組織を摘出し放射エネルギーを測定した。

9) 代謝物分析用試料：尿、糞は各群の雌雄各 2 匹についてそれぞれの試料をプールした。

尿試料は 0~24 時間、24~48 時間を別々とし、糞試料は 0~48 時間とした。

尿試料は直接 HPLC または TLC に、糞試料は溶媒抽出、遠心分離、濃縮操作の後 HPLC で分析した。

肝臓及び腎臓試料は、100 mg/kg 群の投与 24 時間後、及び 14 日後に屠殺した雌雄各 2 匹から摘出し、それぞれの試料をホモジネートして抽出、遠心分離、濃縮後に HPLC で分析した。

試験結果：

1) 排泄物中の放射エネルギーの変化

<投与量に対する割合(%)；雌雄各 2 匹 4 匹の平均>

試料		尿		糞		その他の試料	投与量(mg/kg)	
		5	100	5	100		5	100
採取 時 点	6 時間	16.5	4.69	-	-	ケージ洗液		
	1 日	23.9	14.4	15.4	23.0	0~14 日	3.02	1.60
	2	3.88	2.95	3.97	4.27	全血 注 1)		
	3	1.44	0.66	0.69	0.28	0~14 日	0.45	0.17
	4	1.08	0.37	0.13	0.08	組織 注 2)		
	5	0.85	0.37	0.07	0.05	14 日	6.16	2.85
	6	0.80	0.23	0.07	0.07	嘔吐物 注 3)		
	7	0.66	0.25	0.06	0.02	0~2 時間	-	28.4
	8~14	3.02	1.08	0.22	0.14			
計		62.2	24.5	20.6	27.9	総合計%	82.4	84.8

注 1) 連続的血液サンプルの総放射エネルギー

注 2) 投与後 14 日に屠殺し、分析した組織の放射エネルギー：脂肪、筋肉、皮膚及び血液は各々体重の 14%、39%、9%及び 9%として算出。

注 3) 100 mg/kg 投与群で全例が 2 時間以内嘔吐した。嘔吐物の放射エネルギーを測定した。

2) 呼気排泄の試料中濃度 (投与量に対する割合、%) - : 試料なし / : 測定せず

試料	採取時点 hr	5 mg/kg 群		100 mg/kg 群	
		雄	雌	雄	雌
呼気	0~24	1.8	3.6	3.4	5.1
尿	0~24	-	24.1	22.8	17.1
膀胱内容物	24	46.3	7.7	1.3	1.2
糞	0~24	-	0.4	-	1.4
肝臓	24	11.6	15.1	3.8	2.9
腎臓	24	0.2	0.3	0.1	0.1
ケージ洗浄液	0~24	-	1.2	4.9	6.0
消化管	24	/	/	28.4	17.7
合計		59.9	52.4	64.7	50.9

3) 血中濃度の変化 (μg 親化合物換算/ml、雌雄各 2 匹計 4 匹の平均)

試料		全血		血漿	
投与量(mg/kg)		5	100	5	100
採取 時点 hr	0.5	4.83	22.2	9.13	32.1
	1	5.83	31.6	10.4	45.6
	1.5	5.89	34.1	10.4	49.6
	2	5.49	34.0	9.26	50.2
	4	3.70	32.7	6.11	49.9
	6	3.25	29.9	5.51	47.9
	12	1.34	17.6	1.20	28.2
	24	0.77	5.8	0.19	6.2
	48	0.72	2.4	0.10	0.6
	72	0.69	2.2	0.05	0.4
336(14日)		0.54	1.8	0.01	0.1
AUC $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$		248	1141	84	362

5 mg/kg 群の血漿中濃度は、1~1.5 時間後に最高値に達したのち、減少は二相性を示した。最初は急速に減衰したが、第二相での減衰速度は緩やかであった。全血中濃度の最高値も投与 1~1.5 時間後であり、投与後 12 時間には血漿中濃度と同じであったが、その後の減衰速度は血漿よりもさらに緩やかであった。100 mg/kg 群の全血及び血漿中濃度の挙動は、曲線の形として 5 mg/kg 群と類似していた。

申請者註：上表にもとづき半減期を以下のとおり申請者が算出した。全血及び血漿中濃度の減少ではともに二相性がみられた。

相	試料	全血		血漿	
	投与量 (mg/kg)	5	100	5	100
α 相	Tmax (時間)	1.5	1.5	1.5	2
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.89	34.1	10.4	49.6
	計算ポイント (時間)	1.5~24	1.5~48	1.5~24	2~48
	Cmax からの半減期 (時間)	7.6	11.2	3.8	6.9
β 相	β 相開始時間 (時間)	24	48	24	48
	計算ポイント (時間)	24~336	48~336	24~336	48~336
	半減期 (時間)	630	770	83	119

4) 組織内放射能濃度の分布

項目		濃度(μ g親化合物換算/gまたはml)			血漿放射能比	
		5		100	5	100
投与量(mg/kg)		5		100	血漿放射能比	
屠殺時期		14日*	1日**	14日*	14日*	1日**
臓器・組織	副腎	0.77	26.8	9.2	49	2.4
	骨	0.03	3.8	0.3	1.8	0.4
	骨髓	0.15	6.7	1.0	9.4	0.6
	小脳	0.02	1.3	0.2	1.5	0.1
	大脳	0.02	1.1	0.2	1.3	0.1
	眼(1)	0.04	3.9	0.5	2.8	0.4
	眼(2)	0.05	3.7	0.4	2.9	0.4
	脂肪	0.05	3.8	0.7	3.2	0.3
	心臓	0.33	10.0	4.4	21	0.9
	腎臓	0.84	25.8	8.2	58	2.3
	肝臓	6.39	102	38.7	410	8.5
	肺	1.49	23.5	9.2	98	2.0
	筋肉	0.13	3.8	1.5	8.2	0.4
	卵巣	0.19	11.1	2.6	12	1.2
	脾臓	0.40	12.2	3.2	26	1.1
	下垂体	0.50	15.1	3.4	30	1.4
	皮膚	0.06	6.9	0.5	3.4	0.6
	脾臓	0.91	14.0	4.3	58	1.3
	精巣	0.08	5.3	0.6	5.4	0.4
	胸腺	0.10	5.8	0.8	6.3	0.6
	甲状腺	0.47	11.3	3.1	30	1.0
	子宮	0.19	10.2	2.1	11	1.1
	腸管	0.12	56.5	1.3	7.5	3.6
	胃	0.16	11.0	1.8	9.9	1.0
	消化管内容物	0.05	1040	0.5	3.3	8.7
	全血	0.57	8.5	1.9	36	0.7
血漿	0.01	11.9	0.1	1.0	1.0	

* 雌雄各2匹計4匹の平均、** 雌雄各1匹計2匹の平均 (いずれも生殖腺を除く)

5) 尿中代謝物 0~48時間尿

HPLC分析の結果、16の成分が検出された。親化合物は検出されず、同定された代謝物は次のとおりであった。

0~48時間尿中の代謝物	投与量(mg/kg)及び投与量に対する割合(%)			
	5		100	
	雄	雌	雄	雌

6) 糞中代謝物

糞中でも尿中と同じ

及び

を含む4成分が主であった。親化合物は定量できなかったが存在は確認された。

7) 組織中代謝物

抽出可能であった放射能の割合は以下のとおりであった。

性	屠殺時期(日)	抽出された割合、%	
		肝	腎
雄	14		
雌	14		
雄	1		
雌	1		

組織抽出物中の放射能レベルは低く、HPLC ラジオクロマトグラムから定量するには至らなかった。組織抽出物には、主として極性の放射性成分が含まれ、尿中の主成分はないか、または極めて少量であった。また、肝臓と腎臓では成分の構成に違いが認められた。

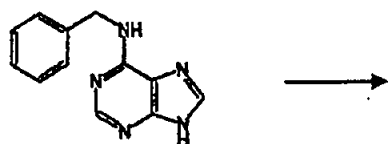
以上の結果、尿糞排泄では14日後でも放射能が検出された。血中濃度の減少もゆるやかであり、投与14日後の組織中では、肝臓、副腎、腎臓、肺を中心に各臓器に分布した。

ベンジルアミノプリンのイヌ体内での主要代謝物は、

及び

で、ラット体内のそれと同じであった。

イヌ体内での想定代謝経路を以下に示した。



6-ベンジルアミノプリン

2. 植物体内運命に関する試験

(1) ブドウにおける代謝試験

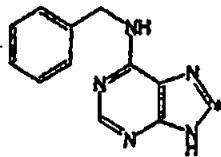
(資料 13-2)

試験機関

報告書作成年 1978年

供試標識化合物：

構造式；



• ¹⁴C 標識

化学名；6-benzylamino (8-¹⁴C) purine

[プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリン

比放射能；

放射化学的純度；

標識位置の設定理由；

供試植物及び維持管理；

- 1) 葉面処理；ブドウ若木（品種 Marshall Joffre）。薬剤処理 2 ヶ月前から若木を直径 25 cm のポットに移植し、日中は 20℃に、夜間は 12℃に制御可能な温室で栽培管理した。
- 2) 房への処理；生育ブドウ樹木から採取した枝付きブドウ房（品種 Madeleine Angevine 6772）。各回のサンプリングまで、枝部分を栄養培地に浸漬して日中は 20℃に、夜間は 12℃に制御可能な温室で維持管理した。

試験方法；

- 1) 葉面処理；ブドウ葉面に ¹⁴C 標識ベンジルアミノプリンの 200 ppm 溶液を樹木 1 本当たり約 130 μg、4 枚の葉に塗布処理した。処理後 0、1、4、8、15、28、64、128 及び 177 日に葉と茎を採取して洗浄液、抽出液、残渣について放期能を測定した。
- 2) 房への処理；ブドウ房に ¹⁴C 標識ベンジルアミノプリン 0.22 mg/ml の溶液を噴霧器で散布処理した。散布後 0、1、3、7、10、14 及び 21 日に果実を採取し、洗浄液、抽出液、残渣について放期能を測定した。無処理対照群も用意した。
- 3) 代謝物の分析；葉及び果実（房から茎を除いた部分）の洗浄液、及び抽出液について、で代謝物の定量、同定を行った。

試験結果：

1) 葉面処理後の放射能濃度

処理後 日数	分析部位	親化合物換算 μg				処理放射 能の合計 回収率%	合計濃度 親化合物換算 $\mu\text{g/g}$ 植物体
		洗浄液	抽出液	残渣	計		
0	処理葉	116	5.2	0.90	122	91.9	23.1
	未処理葉	-	<0.3	0.06	<0.36		<0.08
	茎部	-	0.08	0.04	0.07		0.004
1	処理葉	111	4.3	1.7	117	88.7	19.2
	未処理葉	-	<0.3	0.04	<0.34		<0.01
	茎部	-	<0.2	0.04	<0.24		<0.002
4	処理葉	107	12.2	3.0	122	91.5	12.2
	未処理葉	-	<0.8	0.07	<0.87		<0.01
	茎部	-	0.09	0.09	0.18		<0.004
8	処理葉	99	7.7	2.7	109	82.4	12.8
	未処理葉	-	<0.3	0.06	<0.36		<0.02
	茎部	-	0.07	0.08	0.15		<0.006
15	処理葉	98	17.5	5.6	121	90.2	12.5
	未処理葉	-	1.6	0.34	1.9		0.03
	茎部	-	0.30	0.21	0.51		0.007
28	処理葉	96	10.4	5.1	112	83.4	7.7
	未処理葉	-	0.25-0.40	0.12	0.37-0.52		0.006-0.008
	茎部	-	0.15	0.29	0.44		0.004
64	処理葉	73	18.0	3.3	94	75.1	13.4
	未処理葉	-	<0.95	0.15	<1.1		<0.01
	茎部	-	0.32	0.23	0.55		0.004
128	処理葉	83	6.8	5.6	95	72.1	15.6
	未処理葉	-	0.73	0.22	0.95		0.004
	茎部	-	0.11	0.22	0.33		0.001
177	処理葉	52	6.1	3.2	61	47.2	12.8
	未処理葉	-	0.30	0.26	0.56		0.002
	茎部	-	0.16	0.50	0.66		0.002

-: 試料を採取せず

2) 房への散布処理後の放射能濃度

処理後 日数	総放射能に対する割合: %TRR				合計濃度: 親化合物換算 $\mu\text{g/g}$ 植物体 () 内は対照群の値	
	房の	洗浄液	果実の	抽出液		果実の残渣
0	84.1		14.6		1.4	1.5
1	79.1		15.8		5.0	2.3
3	63.3		19.7		16.9	1.0
7	52.0		25.4		22.6	3.0 (0.002-0.004)
10	43.6		30.5		26.0	1.5
14	51.1		21.4		27.5	1.1
21	40.7		32.0		27.3	2.2 (0.002-0.003)

3) 代謝物の分析

分析部位	処理後日数	画分	代謝成分の総放射能に対する割合；%TRR	
			親化合物	
葉	0	洗浄液	95	
		抽出液	97	
	1	洗浄液	98	
		抽出液	97	
	4	洗浄液	99	
		抽出液	98	
	8	洗浄液	96	
		抽出液	97	
	15	洗浄液	94	
抽出液		100		
28	洗浄液	96		
	抽出液	96		
64	洗浄液	76		
	抽出液	92		
128	洗浄液	87		
	抽出液	77		
177	洗浄液	90		
果実	0	洗浄液	99	
		抽出液	100	
	1	洗浄液	97	
		抽出液	97	
	3	洗浄液	98	
		抽出液	95	
	7	洗浄液	92	
抽出液		87		
10	洗浄液	90		
	抽出液	82		
14	洗浄液	82		
	抽出液	91		
21	洗浄液	91		
	抽出液	85		

¹⁴C 標識ベンジルアミノプリンを葉面塗布した場合、回収放射能の大部分は葉に存在し、植物体のほかの部分への移行はほとんどみられなかった。房への散布では、果実中の放射能濃度は 21 日間を通してほぼ一定で、洗浄液中の放射能の割合は経時的に減少し、抽出液中のそれは 21 日目に 32%まで、及び果実の抽出残渣は 21 日目に 27%までそれぞれ増大した。

葉及び果実中の放射能のほとんどは _____ であり、ほかに検出された少量の代謝物のうち、ひとつは _____ であった。

(2) 植物における代謝試験

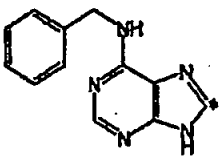
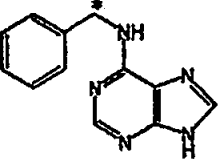
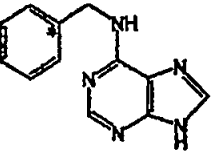
(資料 13-3)

引用文献

(1967)

文献 1: ^{14}C 標識サイトカイニンの培養組織における標識リボ核酸の特性

供試標識化合物:

構造式及び ^{14}C 標識			
化学名	[プリン環-8- ^{14}C] 6-ベン ジルアミノプリン	[メチレン- ^{14}C] 6-ベン ジルアミノプリン	[ベンゼン環-1- ^{14}C] 6-ベン ジルアミノプリン
比放射能			

供試植物: 大豆組織、*in vitro* で生育のためサイトカイニン要求型。

試験方法: 大豆組織をインドール酢酸 2.0 mg/l を含む培養液中に各標識化合物 0.5 mg/l を加え、20 日間組織培養した。培養終了後、組織重量を測定した。

により核酸を抽出したのち、組織中核酸をクロマトグラフィーで分画し、各画分への放射能の取り込みを測定した。

RNA ヌクレオチドは、全核酸を 37°C、24 時間培養して で分画調製した。

試験結果: いずれの標識化合物も、放射能は RNA 画分に取り込まれた。取り込まれた物質のほとんどは、 によって

と思われた。 に

よって、ほぼすべての放射能は可溶性 RNA 画分 (sRNA) 中に入った。さらに

カラムで のクロマトグラフィーを

行った結果、6つのサブ画分が得られそのうちの一つだけが ^{14}C を含んでいた。このことは、サイトカイニンが優先的に sRNA に取り込まれることを示していると思われた。

(3) 植物における代謝試験

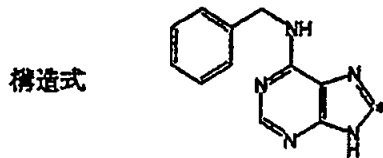
(資料 18-4)

引用文献

(1982)

文献 2: カイニンのひとつ、ベンジルアデニンの代謝

供試標識化合物:



化学名 [プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリン

供試植物: オナモミ (Cocklebur)

試験方法: オナモミの成熟葉を直径 12 mm のディスクに切り滅菌したのち、¹⁴C-6-ベンジルアミノプリン液 (50 mg/l) の入ったペトリ皿に入れ、22 時間、20°C 暗所に保管した。22 時間経過後、ディスクを蒸留水で速やかに洗浄し、
で抽出した。
抽出液について、ペーパークロマトグラム上で放射能を測定するとともに、代謝生成物の同定を行った。

試験結果: まず、
で未変化体ベンジルアデニンが確認された。6-ベンジルアミノプリンは速やかに代謝された。生成した主な代謝物は、
であり、これはさらに
された。
となった。

次いで
として、

が検出されたが少量であった。

ここで生成する
のうち、
は、RNA にとり込まれることは
明確であったが、
が同様にとり込まれているかは明らかでなかった。

(4) 植物における代謝試験

(資料 13-5)

引用文献

(1972)

文献 3 :

供試標識化合物 :

構造式 ;

³H General

標識

化学名 ;

比放射能 ;

供試植物 : 大根苗、9 日令

試験方法 : 大根苗の根を切り取り、胚軸の切り口を 溶液に 24℃ で一定時間浸漬した。
苗は蒸留水で洗浄後溶媒とともに -20℃ で凍結した。

18 時間後、組織と溶媒をホモジナイズ、遠心分離し、抽出、濃縮し、クロマトグラフィーを用いて分画した。

放射能は、液体シンチレーションカウンターで測定し、薄層クロマトグラフィーで代謝物を同定した。

試験結果 : 代謝物としては、

及

び

が生成した。しかし、主な代謝物は そのものの
で、主に苗の子葉部分に存在した。

(5) 植物における代謝試験

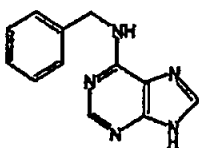
(資料 13-6)

引用文献

(1973)

文献 4: サイトカイニンのグルコシレーション

供試標識化合物:

化合物		[G- ³ H] 6-ベンジルアミノプリン
構造式		
³ H General 標識		
化学名		6-benzylaminopurine
比放射能		

供試植物: トウモロコシ実生、大根苗

試験方法:

- 1) トウモロコシ実生; 10 日令の根部を 溶液 (μM) に 20 時間浸漬、根部を切り取った。それを水で洗浄し、65°C で に 5 分間置いた。冷却後溶媒でホモジナイズしたのち、抽出液を遠心分離し、濃縮した。
- 2) 大根苗; 9 日令の根部を切り取り、胚軸を標識 6-ベンジルアミノプリン溶液 (60 μM) に 8 時間浸漬し、さらに 16 時間水中に置いた。苗をホモジナイズ、遠心分離、抽出、濃縮した。

1)、2)とも抽出液の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、種々の溶媒系を用いた薄層クロマトグラフィーで代謝生成物を同定した。

試験結果:

- 1) トウモロコシ実生; 主な代謝物として $\text{6-aminobenzylamine}$ が生成し、その他 $\text{6-aminobenzylamine}$ 及び $\text{6-aminobenzylamine}$ が認められた。マイナー代謝物として、 $\text{6-aminobenzylamine}$ が根及び根を除いた実生部分に認められた。
- 2) 大根苗; 根を除いた部分に $\text{6-aminobenzylamine}$ 及び $\text{6-aminobenzylamine}$ が生成しており、これら 2 つの $\text{6-aminobenzylamine}$ で抽出代謝物の放射能量の約 70% を占めた。

3. 土壌中運命に関する試験

(1) 好氣的土壌中代謝分解

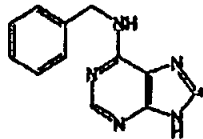
(資料 13-7)

試験機関

報告書作成年 1978 年

供試標識化合物：

構造式：



• ¹⁴C 標識

化学名；6-benzylamino [8-¹⁴C] purine [プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリン

比放射能：

放射化学的純度；

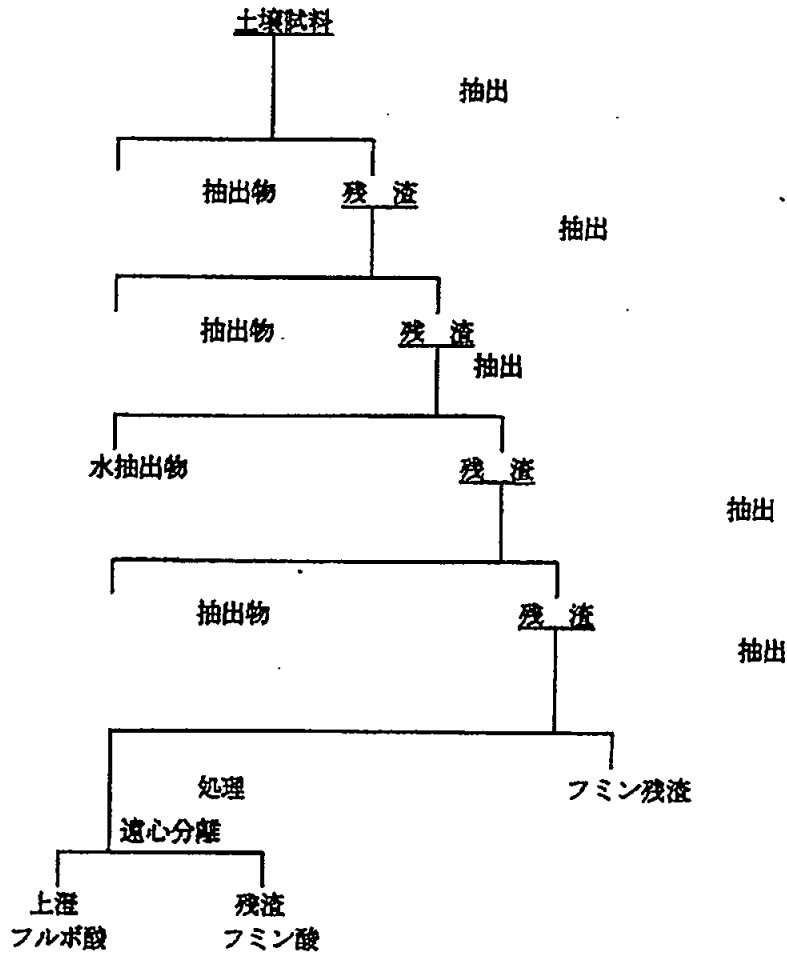
供試土壌：シルト質壤土(silty loam) 及び砂壤土(石灰質 loamy sand) の 2 種類の土壌を用いた。土壌水分を 120°C オープン中で乾燥させ測定した。

土 壤	土壌中成分 mg/l			pH	有機物%
	りん酸	カリウム	マグネシウム		
シルト質壤土	48	66	106	6.6	3.0
砂壤土	25	186	80	7.4	1.9

試験方法：

- 1) 土壌の維持；土壌 g を三角フラスコに採り、蒸留水を加えて土壌保持量の 40% に水分量を保った。標識化合物を 1 mg/100 g 土壌(乾土重)の割合で添加混合し、22±2°C で暗所に保持した。1 種土壌あたり 1 フラスコの対照群を設けた。
- 2) 処理量の確認；投与液中の放射能を測定することで、処理放射エネルギーを確認した。
- 3) 測定時期；処理後、0、4、8、16、32、64 及び 128 日に各土壌を分析のため取り出した。
- 4) 揮発性物質；土壌からの揮発性放射能は、CO₂ フリーの空気を通した 及び に毎週 10 週間連続してトラップした。
- 5) 土壌からの抽出；次ページの抽出操作スキームに示した。すべての抽出物について放射能を測定し、抽出残渣をフミン、フミン酸及びフルボ酸に分画して放射能を測定した。
- 6) 放射能の測定；抽出液及びトラップ成分の放射能について LSC 測定を行った。土壌サンプル残渣中の放射能をサンプルオキシダイザーにより燃焼法で測定した。放射活性成分については、薄層クロマトグラフィー-TLC により放射能の測定及び分離を行った。
- 7) TLC； プレートを用い、厚さ 0.25 mm とした。展開溶媒 放射性成分は、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーによって検出した。

土壌からの抽出、測定操作スキーム



試験結果：概要を以下に示した。

1) 抽出液及び残渣の放射能

<処理量に対する割合、%AR、2 連の平均>

処理後 日数	土壌タイプ	抽出液			抽出残渣				合計
		有機溶媒	水	0.1M NH ₃	フルボ酸	フミン	フミン酸	計	
0 日	シルト質壤土	87.5	2.3	2.5	-	13.4*	-	13.4	106
	砂壤土	95.8	-	-	-	8.6*	-	3.6	89.0
4 日	シルト質壤土	68.0	2.6	8.5	1.5	8.5	12.5	22.5	91.5
	砂壤土	71.5	2.7	3.0	5.4	1.3	5.0	11.7	88.8
8 日	シルト質壤土	28.9	3.2	4.1	2.9	10.2	12.9	26.0	60.2
	砂壤土	23.2	3.8	3.8	5.1	2.7	6.7	14.5	45.0
16 日	シルト質壤土	10.0	2.6	3.2	3.8	4.5	14.0	22.1	37.9
	砂壤土	7.7	2.2	3.1	4.9	2.7	7.0	14.6	27.5
32 日	シルト質壤土	3.4	2.1	2.7	2.8	9.1	12.6	24.5	32.7
	砂壤土	1.7	0.74	1.4	2.4	1.9	4.1	8.4	12.1
64 日	シルト質壤土	1.4	3.0	4.5	2.3	7.5	4.4	14.2	22.9
	砂壤土	1.5	1.3	1.9	1.4	1.7	2.8	5.9	10.6
128 日	シルト質壤土	0.80	1.3	1.6	2.7	6.6	6.7	16.0	19.9
	砂壤土	0.68	0.26	0.58	1.7	1.5	1.6	4.8	6.2

-: サンプルなし

*: 0.1M アンモニア液で抽出後の残渣

土壌中の総放射能は経時的に減少し、32 日後には 12%~33%AR になった。また、抽出可能な放射能も 128 日後で 1.5%~3.6%AR まで減少した。

2) 揮発性放射能

<処理量に対する割合、%AR>

処理後の経過週	(捕集)		()	
	シルト質壤土	砂壤土	シルト質壤土	砂壤土
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

は経時的に増大し、5 週間後には %~ %AR に達し、10 週間後では %~ %AR と、ほぼプラトーになった。

9) 親化合物及び代謝生成物の存在割合；4、16、128日後の結果を以下に示す。

経過 日数	成分	シルト質壤土				砂壤土			
		有機溶媒	水		計	有機溶媒	水		計
4日 ()内は %AR	1*	81 (51)				64 (46)			
	2 その他								
16日	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
	9*	66	18	25	7.8	60	18	9.4	5.3
	10								
128日	11								
	12								
	1								
	2+3								
	4								
	5								
	6								
7									
8									
9*	29	3.5	12	0.5	65	<3.0	<2.4	0.4	
10									
11+12									

*: 親化合物 (ベンジルアミノプリン)

4) 親化合物の減衰及び半減期

土 壤	経過日数(日)及び処理量に対する割合、%AR							半減期 (日)*		
	0	4	8	16	32	64	128	作図法	一次式	
									半減期	R ²
シルト質 壤土	86	55	21	7.8	2.0	1.0	0.5	11	18.4	0.7539
砂壤土	87	47	20	5.3	1.2	1.1	0.4	7	18.3	0.7141

* 減衰半減期は、申請者が上記%ARデータから求めた。

以上のことから、ベンジルアミノプリンは土壌中で速やかに代謝分解され、土壌抽出物中に存在する親化合物は、32日後で約1~2%ARまで減少した。ベンジルアミノプリンは最終的には殆どが二酸化炭素として揮散するものと考えられた。

4. 水中運命に関する試験

(1) 加水分解性試験

(資料 物化-13)

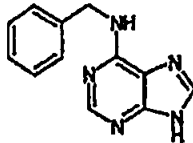
試験機関

[GLP]

報告書作成年 2000年

供試化合物：化学名 6-ベンジルアミノプリン

構造式



純度

試験方法：9農産第 5089号及び OECD ガイドライン 111 に準拠して実施した。

窒素ガスで脱酸素したミリ Q 水を用いて、フラスコ振盪法により供試化合物の飽和水溶液を調製した。これにそれぞれ pH 4, 7, 9 の緩衝液を等量加えて試験溶液とした。これらを遮光条件下で 5 日間、50℃恒温槽内に保管後、6-ベンジルアミノプリンの濃度を測定した。

pH4 緩衝液：0.1M クエン酸-カリウム水溶液 500 ml + 0.1N NaOH 90 ml の混合液をミリ Q 水で 1L に定容し、0.1M クエン酸-カリウム水溶液または 0.1N NaOH を用いて pH を 4.00±0.02 の範囲内に調整した。その後窒素ガスを吹き込み脱酸素した。

pH7 緩衝液：0.1M KH₂PO₄ 水溶液 500 ml + 0.1N NaOH 296.3 ml の混合液をミリ Q 水で 1L に定容し、0.1M KH₂PO₄ 水溶液または 0.1N NaOH を用いて pH を 7.00±0.02 の範囲内に調整した。その後窒素ガスを吹き込み脱酸素した。

pH9 緩衝液：0.1M KCl + 0.1M H₃BO₃ 水溶液 500 ml + 0.1N NaOH 213 ml の混合液をミリ Q 水で 1L に定容し、0.1M KCl + 0.1M H₃BO₃ または 0.1N NaOH を用いて pH を 9.00±0.02 の範囲内に調整した。その後窒素ガスを吹き込み脱酸素した。

試験結果：

試験溶液の pH		項目	n (遊数)			平均値
初期値	5日後		1	2	3	
4.00	4.00	初期濃度(mg/L)	27.4	27.4	27.4	27.4
		5日後の濃度(mg/L)	27.3	27.4	27.3	27.3
		分解率(%)				0.3
7.00	7.01	初期濃度(mg/L)	27.7	27.8	27.8	27.8
		5日後の濃度(mg/L)	27.8	27.8	27.7	27.8
		分解率(%)				0
9.00	8.99	初期濃度(mg/L)	27.8	27.8	27.8	27.8
		5日後の濃度(mg/L)	27.9	27.7	27.7	27.8
		分解率(%)				0

以上のとおり、50℃、5日間の分解率がいずれの pH においても 10% 以下であったため、ベンジルアミノプリンの 25℃における半減期は 1 年以上と推定された。

(2) 加水分解運命試験

本化合物は、50℃、5日間の加水分解試験で殆ど分解がみられず（資料 物化-12）、いずれのpHにおいても半減期が1年以上と推定された。このことから、13生産第3986号、記5「加水分解運命試験」の項の記載にもとづき、加水分解性を示さないと考えられるため、当該運命試験の実施を省略した。

(3) 水中光分解運命試験

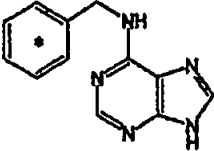
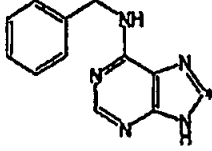
(資料 25)

試験機関

[GLP]

報告書作成年 2007年

供試化合物：

化学名	[¹⁴ C]-6-ベンジルアミノプリン	6-ベンジル[8- ¹⁴ C]アミノプリン
構造式及び 標識位置		
ロット番号	302-025-055	150-084-053
比放射能		
放射化学的純度		
本抄録中の略称	Bz-BA	Pu-BA

供試水：蒸留水及び自然水

蒸留水；高速液体クロマトグラフ用

自然水；静岡県掛川市成滝、逆川の河川水

供試水はろ過滅菌フィルターにより滅菌した

供試水の物理化学的特性

項目	蒸留水	自然水
pH (16°C)	6.0	8.0
電気伝導率 (mS/m)	0.14	25.0
全蒸発残留物量 (mg/L)	<1	177
懸濁物質 (mg/L)	<1	<1
溶存酸素量 (mg/L)	7.9	7.2

光照射装置：

機種；

光源；

フィルター；

放射照度；

試験方法：

1) 溶液の調製；試験溶液の設定濃度はベンジルアミノプリンの水溶解度（約 60 mg/L, 20°C）の 1/2 以下である 2 mg/L とした。Bz-BA 及び Pu-BA の保存溶液からそれぞれの計算量を取り、溶媒を除去後試験水（蒸留水または自然水）加えて超音波により物質を溶解させた。試料調製時の濃度は 2.0~2.05 mg eq/L であった。

2) 照射方法；光照射試料には を用いた。暗下区対照には

をアルミホイルで覆い用いた。

- 3) 揮発性物質の捕集; Bz-BA 試験区について、CO₂フリーの空気を循環させ、照射期間中に発生する揮発性物質及び ¹⁴C₂O₂ を捕集した。捕集溶液として、及びを用いた。Pu-BA 試験区については、予備試験で試験液からの放射能回収率がほぼ 100%であったことから、揮発性物質の捕集は行わなかった。
- 4) 試験条件; 試験温度を 25.0±2°C に維持した。照射期間を 120 時間に設定し、試料採取時点を以下のとおりとした。暗下対照区については最長期間の 120 時間のみ採取した。

標識体	試験水	試験区	試料採取時点 (hr)
Bz-BA 又は Pu-BA	蒸留水	光照射区	6, 24, 48, 72, 96, 120
		暗下対照区	120
	自然水	光照射区	6, 24, 48, 72, 96, 120
		暗下対照区	120

- 5) 分析方法: 各時点において採取した試料の一部を液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。また、試料の一部を直接 HPLC により分析し、放射性成分の定量を行った。各試験区の主要放射性成分は HPLC 分析時に、参照化合物との保持時間を比較して一時的な同定/特徴付けを行った。同定/特徴付けは、参照化合物との共注入による HPLC コクロマトグラフィーを行い保持時間が一致することを確認した。さらに、適切な試料を LC/MS 測定に供し、それらの MS (及び MS/MS) スペクトルを測定し、参照化合物の MS スペクトルと比較することで行った。また、高極性画分では分解物ピークの分離が HPLC では不十分であったことから、照射 120 時間の試料について TLC を行い、高極性分解物の分離及び定量を行った。
- 6) 半減期の算出方法: 6-ベンジルアミノプリンの中光分解を一次反応とみなし、半減期を算出した。

試験結果:

- 1) 放射能回収率; 各試料における ¹⁴C 回収率を以下に示した。試験溶液中の放射能は、各試験区とも 95%以上回収された。Bz-BA 区の 0-120 時間における揮発性物質の捕集では、蒸留水区で 0.2%、自然水区で 0.8%の放射能が回収され、照射期間中の総放射能の回収率はそれぞれ 95.7%及び 92.4%であった。

<試験期間中の物質収支>

試験区	標識体	光照射期間 (時間) 及び処理放射能に対する割合%							
		0	6	24	48	72	96	120	
蒸留水	光照射区	Bz-BA	100	99.0	98.0	97.0	96.5	96.0	95.7
	暗下対照区		—	—	—	—	—	—	98.5
	光照射区	Pu-BA	100	98.0	98.0	98.5	99.0	98.0	98.0
	暗下対照区		—	—	—	—	—	—	98.0
自然水	光照射区	Bz-BA	100	99.0	97.0	96.6	94.6	90.6	92.4
	暗下対照区		—	—	—	—	—	—	99.5
	光照射区	Pu-BA	100	101.5	103.5	100	101.5	102.0	101.0
	暗下対照区		—	—	—	—	—	—	99.5

—: 測定せず

2) 6-ベンジルアミノプリン及び分解物の定量：

各試験区の放射性成分の同定及び定量結果を以下に示した。

蒸留水/暗下区；両標識体の残存率は0時点及び照射120時間後ともに94~96%で、いずれも明らかな分解は認められなかった。

蒸留水/照射区；Bz-BAの残存率は0時点の94.6%から照射時間の経過とともに緩やかに減少した。処理放射能量の10%を超える分解物はなく、分解物として

()%、
()%、 ()%、
()%が検出された。

Pu-BAの残存率は0時点の95.6%から照射時間の経過とともに緩やかに減少した。処理放射能の10%を超える分解物はなく、分解物として ()%、

及び の混合物 ()%、及び ()%が検出された。なお、検出された未知物質は、調製直後が最大生成量であったことから光による分解物であるとは考えられず、また、生成量が %未満であったことから同定しなかった。

<蒸留水における放射性成分> 処理放射能に対する割合(%)

標識体	化合物	照射期間 (hr)							暗下区 120 hr
		0	6	24	48	72	96	120	
Bz-BA	6-ベンジルアミノプリン	94.6	91.5	89.6	85.4	82.7	81.5	80.3	94.6
	合計	98.1	98.1	99.0	98.2	96.4	97.1	96.0	98.9
	6-ベンジルアミノプリン	95.6	93.2	92.0	87.4	86.1	84.8	83.6	93.9
Pu-BA	合計	100.5	98.6	99.4	98.5	97.5	98.4	98.4	98.8

自然水/暗下区; いずれの標識体においても明らかな分解は認められなかった。

<自然水における放射性成分>

処理放射能に対する割合(%)

標識体	化合物	照射期間 (hr)							暗下区 120 hr
		0	6	24	48	72	96	120	
Bz-BA	6-ベンジルアミノプリン	97.0	91.1	79.0	64.5	57.8	50.6	45.6	96.0
	合計	99.5	100.6	99.4	94.4	94.4	92.7	92.3	99.6
	6-ベンジルアミノプリン	97.5	98.1	82.5	72.2	67.0	60.8	54.5	98.5
Pu-BA	合計	101.5	102.5	102.8	102.1	102.8	101.8	100.4	101.1

自然水/照射区; Bz-BA の残存率は照射時間の経過とともに減少した。処理放射能の 10%を超える分解物が

が検出された。少量の分解物として

(%)、

(%)、

(%)、

(%)

が検出された。

は、HPLC クロマトグラムから複数の分解物で構成されていると考えられ、その合計生成量が最大でも %未満であった。

は、複数の分解物から構成されており、HPLC での分離、定量が困難であったことから 120 時間後試料の画分について TLC による定量を行った。その結果、この画分には 14 個以上の分解物が含まれており、それらの生成量は原点部分で %であったほかはいずれも %以下であった。

Pu-BA の残存率は照射時間の経過と共に減少した。処理放射能の 10%を超える分解物として (%) が検出された。また、 (%) が検出され、ほかに少量の分解物として

と

の混合物 (%)、及び
(%) が検出された。

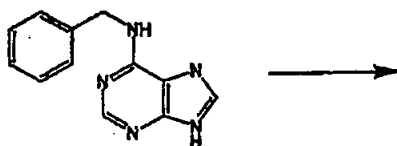
は複数の成分を含み、HPLC での分離、定量が困難であったことから TLC による定量を行った結果、この画分には濃縮操作により揮発する分解物 (%) を含む 11 個以上の分解物が含まれると推定され、それらの生成量はいずれも %以下であった。

3) 推定半減期：ベンジルアミノプリンのキセノン照射による蒸留水及び自然水中における推定半減期は、以下のとおりであった。

水中光分解の推定半減期

供試水	標識体	一次反応速度式	北緯 35° 春の太陽光換算
蒸留水	Bz-BA	22.2 日	146 日
	Pur-BA	26.9 日	179 日
自然水	Bz-BA	4.6 日	30 日
	Pur-BA	6.1 日	40 日

以上のことから、ベンジルアミノプリンの光分解物とその経路は、 及び
の生成、ならびに であった。
以下に想定光分解経路を示した。



ベンジルアミノプリンの想定水中光分解経路

5. 土壌への吸着性

(1) 土壌吸着試験

(資料 物化-12)

試験機関

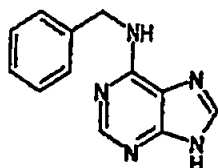
[GLP]

報告書作成年 2001年

供試化合物：

化学名；6-ベンジルアミノプリン

構造式；



純度；

供試土壌：以下の4土壌を用いた。

土壌 No.	8	11	16	20
採取場所				
土壌群名	沖積粘質土	淡色黒ボク土	灰色低地土	砂丘未熟土
土性	軽増土	壤土	軽増土	砂土
粗砂%	5.6	17.5	12.3	7.3
細砂%	36.1	48.0	23.8	82.8
シルト%	31.9	24.9	28.8	5.2
粘土%	26.4	14.6	35.1	4.7
有機炭素含有率%	1.24	2.45	2.17	0.96
pH (H ₂ O)、(CaCl ₂)	6.4, 5.2	5.8, 4.7	6.1, 4.7	6.2, 4.6
陽イオン交換容量 (me/100g)	9.8	12.0	14.3	6.4
リン酸吸収係数	500	1470	610	510
粘土鉱物の種類	クロライト、イライト	アロフェン、パーミキュライト	カオリン、パーミキュライト	アロフェン、ハロイサイト
土壌含水比%	1.3	5.8	2.2	1.4

試験方法：「農薬の物理化学的性状に関する試験方法について」（9農産第5089号）に準拠した。

なお、具体的実施は「OECD 試験指針 106 吸着/脱着」にもとづいた。

土壌/水混合比；土壌/水=1/25 (1 g/25 mL)

被験物質の調製溶液；100 μg/mL 0.01M 塩化カルシウム溶液を調製し、この溶液を 0.01M 塩化カルシウム溶液で希釈して、検体 0.50~49.48 μg/mL の調製溶液を用意した。

吸着平衡化試験；土壌 1 g に 0.01M 塩化カルシウム溶液 22.5 mL を加え 25±2℃ で 12 時間振とうし平衡化した。これに検体 15 μg/mL の調製溶液 2.5 mL を加えて、25±2℃ で 4, 8, 24 時間振とうして水相中の濃度を求め、濃度の変化から平衡化時間を決定した。

吸着等温試験；土壌 1 g に試験溶液 22.5 mL を加え、25±2℃ で 12 時間振とうして平衡化した。これに 50, 5, 1.5, 0.5 μg/mL の調製溶液 2.5 mL を加え、25±2℃ で設定した。

平衡化時間で振とうして吸着平衡化した。水相中の濃度を求め、土壌中の濃度を算出した。

物質収支；吸着平衡化後の水相及び土壌中濃度を測定して求めた。

脱着平衡化試験；土壌 1g に試験溶液 22.5 mL を加え、25±2℃ で 12 時間振とうして平衡化した。これに 15 μg/mL の調製溶液 2.5 mL を加え、25±2℃ で設定した平衡化時間で振とうして吸着平衡化した。水相を分取し、得られた土壌に水相と同量の 0.01M 塩化カルシウム水溶液を加えて、25±2℃ で 4, 8, 24 時間振とうした。水相中の濃度を求めた。脱着量を土壌吸着量で割り脱着率を求め、単位時間当たりの変化率が 2% 以下となった時間を脱着平衡時間とした。

脱着等温試験；土壌 1g に試験溶液 22.5 mL を加え、25±2℃ で 12 時間振とうして平衡化した。これに 50, 5, 1.5, 0.5 μg/mL の調製溶液 2.5 mL を加え、25±2℃ で設定した平衡化時間で振とうして吸着平衡化した。水相を分取し、得られた土壌に水相と同量の 0.01M 塩化カルシウム水溶液を加えて、25±2℃ で設定した脱着平衡化時間で振とうして脱着平衡化させ、水相中の濃度を求めた。

分析操作；[水相] 土壌と上澄液を遠心分離後、ディスポーザブルフィルターを用いてろ過し、希塩酸、飽和塩化ナトリウム水溶液及びヘキサンを加えて水層を振とう精製した。この水層をアルカリ (NaOH) 条件下で酢酸エチルに転溶し、濃縮後、アセトニトリルに溶解し高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

[土壌] 土壌と上澄液を遠心分離後、メタノール-0.5M-NaOH 水溶液の混合液 (3/1, v/v) を加えて振とう抽出し、濃縮した。この濃縮液に 5% NaCl 水溶液を加えて酢酸エチルに転溶し、濃縮後、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。検出限界は、水で 0.0025 μg/ml、土壌で 0.05 μg/g であった。

試験結果：

1) 吸着平衡化試験；結果を以下に示した。各土壌吸着率での変化率が 2% 以下となる振とう時間は 24 時間であり、24 時間を吸着平衡時間とした。変化率を次式から求めた。

$$\text{8時間後の変化率(\%)} = \frac{(\text{8時間後の吸着率} - \text{4時間後の吸着率})}{\text{4時間後の吸着率} \times (8 - 4)} \times 100$$

$$\text{24時間後の変化率(\%)} = \frac{(\text{24時間後の吸着率} - \text{8時間後の吸着率})}{\text{8時間後の吸着率} \times (24 - 8)} \times 100$$

土壌 No.	振とう時間及び土壌吸着率 (%、n=2 の平均) ()内は変化率(%)		
	4 時間	8 時間	24 時間
8	37.7	41.6 (2.6)	46.2 (0.7)
11	38.0	37.4 (3.3)	48.8 (1.1)
16	54.8	55.8 (0.5)	64.6 (1.0)
20	24.8	28.9 (4.7)	38.7 (1.7)

2) 物質収支；平均回収率は以下のとおりであった。

(n=2の平均値、申請者が算出)

平均回収率%	土壌 No. 6	土壌 No. 8	土壌 No. 14	土壌 No. 20
初期添加量(μg)	98.45	97.98	97.98	98.45
回収量(μg)	94.868	96.694	93.540	96.200
土壌吸着量(μg)	15.84	17.41	21.88	13.83
水相中含有量(μg)	19.094	19.284	12.164	22.970
回収率(%)	90.7	98.3	89.8	94.2

3) 分配係数の算出；ここまでの試験結果から、分配係数及び有機炭素吸着係数を算出した。

土 壤 No.	8	11	16	20
分配係数 (土壌中濃度÷水相濃度)	21.45	19.47	45.68	14.53
有機炭素含有率(%)	1.24	2.45	2.17	0.96
有機炭素吸着係数(ml/g, 分配係数÷有機炭素含有率×100)	1730	795	2109	1514

4) 吸着等温試験の結果 (水相中濃度と土壌中濃度、n=2の平均；申請者が計算)

いずれの土壌とも水相中濃度と土壌中濃度は直線関係を示した。

初期 添加量 μg	土 壤 No. 及び土壌中濃度 μg/g または水相中濃度 μg/ml							
	8		11		16		20	
	水相中 濃度	土壌中 濃度	水相中 濃度	土壌中 濃度	水相中 濃度	土壌中 濃度	水相中 濃度	土壌中 濃度
1.25	0.0123	0.0943	0.0159	0.852	2.2512	1.074	0.0189	0.752
3.78	0.0462	2.626	0.0564	2.368	0.5284	3.107	0.0673	2.096
12.58	0.2132	7.196	0.2322	6.712	0.1242	9.422	0.2772	5.596
97.98	—	—	0.8884	16.324	0.0269	24.107	—	—
38.45	0.8276	17.751	—	—	—	—	0.9726	14.122
123.70	3.1759	44.281	3.1200	45.535	0.0070	67.970	3.6256	33.010

5) 吸着係数；Freundlichの吸着等温式により求めた吸着係数は以下のとおりであった。

土壌 No.	吸着係数 $K_{F^{ad}}$	吸着指数 $1/n$	相関係数 r	有機炭素含有率 OC%	有機炭素吸着係数 $K_{F^{ad}OC}$
8	20.39	0.687	0.99957	1.24	1644
11	19.38	0.746	0.99966	2.45	791
16	38.84	0.711	0.99935	2.17	1790
20	13.80	0.723	0.99885	0.96	1488

吸着係数 $K_{F^{ad}}$ と各項目とを一次関数に当てはめた場合、つぎの結果が得られた。

土壌の性質項目	吸着係数との相関係数
有機炭素含有率	0.54395
粘土含量	0.88006
陽イオン交換容量	0.85836
リン酸吸着係数	-0.12919
pH	-0.04818

- 6) 脱着平衡化試験；結果を以下に示した。各土壤吸着率での変化率が 2%以下となる振とう時間は 24 時間であり、24 時間を脱着平衡時間とした。変化率を次式から求めた。

$$\text{8 時間後の変化率(\%)} = \frac{(\text{8 時間後の脱着率} - \text{4 時間後の脱着率})}{\text{4 時間後の脱着率} \times (8 - 4)} \times 100$$

$$\text{24 時間後の変化率(\%)} = \frac{(\text{24 時間後の脱着率} - \text{8 時間後の脱着率})}{\text{8 時間後の脱着率} \times (24 - 8)} \times 100$$

土壤 No.	振とう時間及び土壤脱着率 (%、n=2 の平均) ()内は変化率(%)		
	4 時間	8 時間	24 時間
8	28.4	32.4 (2.6)	29.2 (-0.6)
11	28.5	31.4 (2.5)	27.9 (-0.7)
16	20.4	21.6 (1.5)	18.4 (-0.9)
20	30.9	35.6 (9.8)	31.4 (-0.7)

- 7) 脱着等温試験の結果 (水相中濃度と土壤中濃度、n=2 の平均(申請者計算))

いずれの土壤とも脱着後水相濃度と脱着後土壤中濃度は直線関係を示した。

初期 添加量 μg	土壤 No. 及び土壤中濃度 μg/g または水相中濃度 μg/ml							
	8		11		16		20	
	水相中 濃度	土壤中 濃度	水相中 濃度	土壤中 濃度	水相中 濃度	土壤中 濃度	水相中 濃度	土壤中 濃度
1.25	0.0062	0.811	0.0082	0.696	0.0040	0.986	0.0078	0.598
3.78	0.0218	2.172	0.0252	1.910	0.0144	2.800	0.0248	1.618
12.53	0.0824	5.568	0.0917	5.124	0.0582	8.218	0.0824	4.091
37.25	0.2642	12.052	0.2881	12.306	0.2200	19.818	0.2396	8.774
128.05	0.8782	32.102	1.0086	28.846	0.8410	50.879	0.7875	25.004

- 8) 脱着係数；Freundlich の脱着等温式により求めた脱着係数は以下のとおりであった。

土壤 No.	脱着係数 $K_{F^{des}}$	脱着指数 $1/n$	相関係数 r
8	34.17	0.732	0.99944
11	30.82	0.771	0.99887
16	60.67	0.735	0.99901
20	29.28	0.795	0.99905

9) 回収試験の結果

試料	添加量 μg	平均回収率%	試料	添加量 μg	平均回収率%
水相 (吸着)	123.70	96.8	水相 (脱着)	123.05	85.0
	87.88	100.6		37.25	85.4
	12.53	98.8		12.53	86.4
	3.78	98.2		3.78	91.6
	1.25	99.5		1.25	96.6
土壌	添加量 μg	土壌 No. 及び平均回収率%			
	40.00	8 97.8	11 96.6	16 96.2	20 98.0

(申請者註;本試験では土壌/水混合比率を 1/25 とした。理由は、予備試験の結果から混合比率を 1/5 にすると、①物質収支が低くなる傾向にあること、②水相中の濃度が低くなり、分析誤差が大きくなる可能性が考えられたこと、によるためである。)

代謝分解のまとめ

ベンジルアミノプリンの動物、植物及び土壌等における代謝分解の概要はつぎのとおりである。

1. 動物体内における代謝

1-1. ラットにおける代謝 (資料 13)

ラットに [プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリンを7日間、または単回経口投与して吸収・排泄・分布を検討し、代謝物を検索した。

単回投与の場合、血漿中放射能レベルは、投与後20分及び24時間にピークを示す二相性の曲線となり、ベンジルアミノプリンはよく吸収され血漿中への蓄積がないことを示した。繰返し投与の場合は、血漿中濃度は投与中ほぼ一定となり、投与終了後20~40分に最大となった。以後、徐々に減少したが、投与終了後6時間及び48時間にピークを示す二相性曲線となり、10日まで漸減した。以下に単回投与による半減期及びAUCを示した。

性	C _{max} (μ g)	T _{max} (分)	半減期(時間)	AUC _{0-t} (μ g·h/g)
雄	0.71	20	4.1	18.3
雌	0.75	20	4.1	28.5

繰返し投与における排泄量は、投与終了後6日までに尿中に52~54%AR、糞中に13~14%AR、呼吸中に1.4%ARであった。また、消化管に0.2%及びカーカス中に12.4%が残存した。0~48時間の胆汁排泄は約24%ARであり、そのときの糞中排泄は3%ARで腸肝循環が活発になされているものと考えられた。

組織内濃度では、脳を除くすべての組織中に血漿中濃度を上回っており、ベンジルアミノプリンが組織中によく吸収されるものと考えられる。放射能レベルの順位は、肝臓>肺>腎臓>脾臓、副腎、心臓、脾臓>生殖腺、眼、筋肉>脂肪(腸管膜周辺)>脳、血漿、であった。

投与後6時間以降に放射能レベルは緩やかに減少したが、10日後においても多くの組織中で検出された。

一方、妊娠及び非妊娠動物への繰返し投与による全身オートラジオグラフィーでは、両動物ともに、肝臓、腎臓、肺、副腎、脾臓及び甲状腺に高濃度の放射能が認められ、脳を除いて全身に分布した。この結果は、組織内濃度の測定結果と一致した。また、妊娠ラットでは、乳腺組織で比較的高い放射能が検出され、胎盤にも検出されたが、胎児ではごくわずかな放射能しか検出されなかった。

TLCによる代謝物の検討では、尿中から約9成分、胆汁中から11成分が認められ、尿中成分の一つは

であった。

1-2. ラットにおける代謝 (資料 17)

ラットに [プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリンを10または200 mg/kg 単回経口投与して吸収・排泄・分布・代謝を調べた。

全血及び血漿中濃度変化では、ベンジルアミノプリンは速やかに吸収され、比較的緩やかに減少した。全血中濃度の減少では二相性がみられ、 α 相のピークは10 mg/kg 群で1時間、200 mg/kg 群で12~24時間を示し、半減期は10 mg/kg 群で3.4~12.0時間、200 mg/kg 群では37~59時間であった。 β 相の半減期は雌雄、両投与群を通じて78~119時間であった。血漿中の減少

では複数の極大値がみられ、 α 相のピークは雌雄とも 10 mg/kg 群で 0.5 時間、200 mg/kg 群では 6 時間であり、半減期は雌雄、両投与群を通じて 34~59 時間であった。全体的に雌雄差はなかった。

排泄量は、投与後 14 日までに尿中に 57~63%AR、糞中に 9~14%AR、呼気中に 11~18%AR であり、14 日後のカーカス中残留は 6~7%AR であった。0~48 時間の胆汁排泄は両投与群で雌雄差はなく 22~23%AR を示し、同時に糞中排泄は両群とも 4%AR となり腸肝循環を示唆した。168 時間までの経時的組織内濃度では、肝臓>肺>腎臓>副腎>脾臓>甲状腺、心臓、脾臓の順となり、多くの組織で血漿中濃度より高値を示した。

尿中の主代謝物として 及び が、少量代謝物として が、それぞれ同定された。糞、胆汁及び組織中では のみが確認された。

1-8. イヌにおける代謝 (資料 18)

ビーグル犬に [プリン環- 8 - 14 C] 6-ベンジルアミノプリンを 5 または 100 mg/kg 単回経口投与して吸収・排泄・分布・代謝を調べた。

全血及び血漿中濃度の減少はともに二相性を示した。両試料、両投与群とも 1.5~2 時間後に最高値に達したのち、第二相での減衰速度は緩やかであった。全血中濃度は投与後 12 時間には血漿中と同じであったが、その後の減衰速度は血漿よりもさらに緩やかであった。

以下に雌雄あわせた半減期を示した。

試料	全血		血漿	
	5	100	5	100
投与量 (mg/kg)	5	100	5	100
T _{max} (時間)	1.5	1.5	1.5	2
C _{max} (μ g)	5.89	34.1	10.4	49.6
C _{max} からの α 相半減期 (時間)	7.6	11.2	8.8	6.9
β 相半減期 (時間)	630	770	83	119

排泄量は、投与後 14 日までに尿中に 5 mg/kg 群で 52%AR、100 mg/kg 群で 25%AR、糞中には両群 21~28%AR、呼気中に 2~5%AR であった。

14 日後の 100 mg/kg 群における組織内濃度では、肝臓>肺、副腎、腎臓>心臓>脾臓、脾臓、甲状腺の順となり、これらの組織では血漿中濃度より高値を示した。

尿中の主要代謝物として が、ほかに 及び が、それぞれ同定された。糞中でも同じ代謝物が確認され、イヌ体内の代謝物とその経路はラットと同様であった。

以上の結果、ベンジルアミノプリンの動物体内での主要代謝物はプリン環への水酸化体であった。排泄は長期にわたり、血中濃度の減少もゆるやかで、肝臓、腎臓、肺、副腎、甲状腺を中心に放射能が分布し、肝臓中が最も高濃度であった。呼気中には最大 \cdot %AR が として排泄された。代謝経路としては、、続いて 、その後 から の生成が考えられた。

2. 植物体内における代謝

2-1. ブドウにおける代謝 (資料 13-2)

〔プリン環-8-14C〕 6-ベンジルアミノプリンをブドウ葉面及び成熟ブドウの房に処理して、吸収・移行及び代謝について検討した。

ブドウ葉面処理では、処理直後の放射能回収率 92%が処理後 177 日では 47%に減少した。その大部分の放射能は、処理葉を 洗淨することにより、洗淨液中に回収された。次いで、

抽出により抽出液には処理直後で約 %が回収され、その後時間の経過に伴ない増加する傾向がみられた。また、抽出残渣中の放射能も抽出液中のそれとほぼ同様な傾向を示した。本実験では、ベンジルアミノプリンの葉面吸収は明確でなかったが、回収される放射能が徐々に減少すること、及び抽出残渣中の放射能が増加することなどから、ベンジルアミノプリンは緩慢ではあるが一定の速度で植物体内へ吸収されるものと推測された。

処理葉から未処理葉及び茎部への移行は、対照群のそれらとほぼ同じ放射能濃度であることから、ほとんどないものと考えられた。

葉中でのベンジルアミノプリンの代謝は、回収される放射能の減少が へ代謝されるということにより説明された。そして、葉洗淨液及び抽出液のコクロマトグラフィーによって大部分は未変化体と同定され、その他の微量な代謝物として 2 成分を検出した。ひとつは と同定されたが、他方は親化合物より低極性の物質と考えられたものの、同定に至らなかった。一方、成熟ブドウの房にベンジルアミノプリンを散布した場合、付着量はかなりバラツキがみられ (89-139 μg)、その経時的推移についてあまり明確な結果は得られなかった。

房を 洗淨液、同抽出液及び抽出残渣に分けて放射能を回収し、その分布割合及び推移を検討したところ、処理直後で回収される全放射能に対する割合は、それぞれ 84.1%、14.6%及び 1.4%であったが、処理後 21 日ではそれぞれ 40.7%、82.0%及び 27.8%であった。このことは、ブドウ中にベンジルアミノプリンがかなり吸収されることを示した。葉面処理と異なり、房への処理では の生成は認められなかった。

次いで、 洗淨液及び抽出液中に回収される大部分の放射能は、未変化体であり他に微量の 2 成分が検出された。ひとつは と同定されたが、他方はベンジルアミノプリンより低極性の物質で、葉面処理での検出成分と同一と考えられたが、同定できなかった。そして、葉面処理の場合と異なり、後者の未同定物質の方が、前者よりもやや多量検出された。

2-2. 文献からの知見

サイトカイニンは、その生理活性発現機構の解明を目的として、多くの植物種を起源とする組織培養、実生及び器官切片による *in vitro* 研究がなされてきた。

McCalla¹⁰⁾らは、オナモミの成熟葉にベンジルアミノプリンを処理したところ、代謝は速やかに進行し生成した主な代謝物は、

であった。これは、さらに、

となつた。その他の代謝物は、少量の

であつた。ここで生成する

のうち、

及び

は、RNA にとり込まれたが、

が同様にとり込まれていると確証するには至らなかった。しかし、大豆の組織培養による研究¹¹⁾では、放射能は RNA にとり込まれていることが判明した。その組織の核酸標品をさらに分離したところ、ほとんどすべての放射能が、可溶性 RNA に分布することが示され、その形態は

と推定された。また、

での研究¹²⁾では、そのまま transfer RNA にとり込まれていることが報告され、その量は transfer RNA^{10⁴}分子当り 6-ベンジルア

デノシン 1 分子と推定された。さらに、

¹⁰⁾らは、リンゴの組織培養によって放射能の

RNA 中へのとり込みについて電子顕微鏡で検討した結果、RNA 画分、とりわけ sRNA 及び rRNA に放射能が検出された。しかし、放射性物質の構造については言及されていない。

ベンジルアミノプリンの代謝物として、トウモロコシ⁹⁾及び大根子葉¹⁰⁾による研究で、
及び
の生成が認められ、また、ジャガイモ、タバコなどの実生、器官切片
及び組織培養の研究¹¹⁾では、同様に
の生成が認められている。
これらの代謝物、
及び
などのベンジルアミノプリンの構造を有する代謝物は、前述のとおりその生理活性発現に関連しているであろうことが推定されているものの、その本体であるとの証拠は明らかではない。しかしながら、つぎのような結果が報告されている。すなわち、生成した
は長時間存在するが、同時に生成した
及び
は速やかに代謝され、数時間内に消失することがジャガイモ、タバコなどの植物で報告¹²⁾され、
もサイトカニン活性を持つ物質の一つであることが示唆された。
一方、大豆の組織培養における研究¹³⁾では、培養後 2 時間以内に全放射能の約 % がベンジルアミノプリン構造を有する安定で長時間存在し続ける物質に代謝され、これは
と推定された。以後、それは徐々に消失し、それに伴い未同定の生理活性物質が生成され、全放射能の % に達し、少なくとも 60 日間そのレベルは保たれた。この間に、ベンジルアミノプリンをはじめ、
及び
はほぼ完全に消失することが報告された。

ベンジルアミノプリンの植物による代謝パターンは、
及び
でも知られている。
の場合、
をはじめ、そのまま
及び
あるいは
を生成することが知られている。^{4,7,8)}
また、
の場合、レタス発芽時にそれを処理すると主として、
が生成した。その他の生成物として、
をはじめ、
及び
の生成も認められた。

以上のことから、
の一般的な代謝は、1)
して
を經由して、
を生成する経路、2)
が酸化分解され、
などの低分子物質に分解する経路、3) そのままの形で
を、また 4)
を生成する経路が推定された。

このように、多くの植物起源による組織培養などの実験があるにもかかわらず、ベンジルアミノプリンの代謝に関する多くの報告は、生理活性発現機構の解明が目的であること、そしてベンジルアミノプリンが代謝され生体内成分になり得るという基本的性格を有するために不明な点も多い。

3. 土壌中における代謝分解 (資料 13-7)

シルト質壤土及び石灰質砂壤土に [プリン環-8-¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリンを 10 ppm 添加して、分解性及び代謝物を検討した。

抽出放射能は、シルト質壤土で0日後の87%から128日後で18%に、砂壤土では96%から24%に減少した。土壤中でベンジルアミノプリンは速やかに代謝され、シルト質壤土及び砂壤土中の放射能は、32日後にはそれぞれ38%AR及び12%ARに、128日後にはそれぞれ28%AR及び11%ARにまで減少した。

一方、揮散性放射能はシルト質壤土及び砂壤土で処理後70日にそれぞれ55%AR及び67%ARに達した。この揮散性物質は であろうと推測された。

土壌抽出液のTLC分析では両土壌とも同一パターンを示し、11成分が検出されたが、未変化体を除きいずれも未同定であった。

未変化体の存在割合は、シルト質壤土及び砂壤土で処理直後にそれぞれ82%AR及び87%AR、32日後でそれぞれ2.0%AR及び1.2%AR、128日後ではそれぞれ0.5%AR及び0.4%ARを示した。以上のことから、ベンジルアミノプリンは土壤中で速やかに代謝分解され、最終的には として揮散すると考えられた。

4. 加水分解性 (資料 物化-12)

pH 4, 7, 9の緩衝液における50℃、5日間の分解率は、それぞれ0.3%、0%、及び0%であった。即ち、ベンジルアミノプリンは加水分解性がなく、25℃における半減期は1年以上と推定された。

5. 水中光分解運命 (資料 25)

[プリン環-8-¹⁴C] 及び [ベンゼン環-U¹⁴C] 6-ベンジルアミノプリンを用いて、キセノン照射による蒸留水及び自然水中の光分解運命試験を行った。半減期は、蒸留水中で22-26日、自然水中で5-6日(太陽光換算で、それぞれ146-173日、及び30-40日)であった。

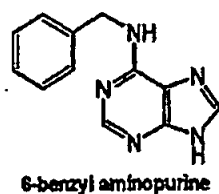
分解物として、
を同定した。最大生成量は で、自然水、120時間後で
%ARを示したことから、ベンジルアミノプリンは、 及び に分解
され、一方で親化合物のベンゼン環が水酸化を受ける経路が想定された。

6. 土壌吸着 (資料 物化-12)

沖積粘質土、淡色黒ボク土、灰色低地土、及び砂丘未熟土による土壌吸着等温、及び脱着等温試験を行った。吸着係数 $K_{r^{25\text{oc}}}$ は791-1790、吸着係数と粘土含量及び陽イオン交換容量は高い相関性を示した。脱着係数 $K_{r^{25\text{oc}}}$ は29-61であった。ベンジルアミノプリンは、比較的高い土壌吸着性を有すると考えられた。

植物代謝に関する文献

- (1)
- (2)
- (3)
- (4)
- (5)
- (6)
- (7)
- (8)
- (9)
- (10)
- (11)
- (12)



ベンジルアミノプリンの動植物体及び土壌中における想定代謝分解経路

代謝分解の概要

試験系	代謝分解物				[1]		処理量 (投与量) に対する割合[%TAR]、植物は全残留量に対する割合と濃度	対投与量 回収率%
ラット単回投与	10 mg/kg	尿	0-24, 24-48時間	雄				
				雌				
		糞	0-48時間	雄				
				雌				
		胆汁	0-6時間	雄				
	肝、腎、肺		雄	検出				
	呼気	14日間	雄					
	200 mg/kg	尿	0-24, 24-48時間	雄				
				雌				
		糞	0-48時間	雄				
雌								
胆汁		0-6時間	雄					
呼気	14日間	雄						
イス単回投与	5 mg/kg	尿	0-24時間	雄				
				雌				
		糞	0-48時間	雄				
	呼気	0-24時間	雄					
	100 mg/kg	尿	0-24時間	雄				
				雌				
		糞	0-48時間	雄				
				雌				
		肝、腎		雄雌				
	呼気	0-24時間	雄					
				雌				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

代謝分解の概要

試験系	代謝分解物		処理量（投与量）に対する割合[%TRR]、植物は全残留量に対する割合と濃度		対投与量 回収率%	
				[1]		
ブドウ	葉/ 葉面 散布	1日後	洗浄液	%TRR	98	
				ppm	0.008	
		抽出液	%TRR	97		
			ppm	0.002		
		15日後	洗浄液	%TRR	94	
				ppm	0.005	
	抽出液	%TRR	100			
		ppm	0.001			
	64日後	洗浄液	%TRR	76		
			ppm	0.003		
	抽出液	%TRR	92			
		ppm	0.002			
	128日後	洗浄液	%TRR	87		
			ppm	0.194		
抽出液	%TRR	77				
	ppm	0.011				
果実/ 房へ 散布	1日後	洗浄液	%TRR	97		
			ppm	0.005		
	抽出液	%TRR	97			
		ppm	<0.001			
	7日後	洗浄液	%TRR	92		
			ppm	0.001		
抽出液	%TRR	87				
	ppm	<0.001				

代謝分解の概要

試験系	代謝分解物			処理量（投与量）に対する割合[%TRR]、植物は全残留量に対する割合と濃度										対投与量 回収率%			
				[1]													
ブドウ	果実 房へ 散布	14日 後	洗浄液	%TRR	82												
				ppm	<0.001												
		抽出液	%TRR	91													
			ppm	<0.001													
		21日 後	洗浄液	%TRR	91												
				ppm	0.001												
抽出液	%TRR	85															
	ppm	<0.001															
ダイズ組織培養	核酸分画	20日間															
オナモミ成熟葉の 切り取りディスク	20℃ 暗所	22時間	検出														
ダイコン苗	胚軸を浸漬	8時間															

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

代謝分解の概要

試験系	代謝分解物		処理量（投与量）に対する割合[%TAR]、植物は全残留量に対する割合と濃度			対投与量 回収率%
			[1]			
土壌	好氣的 0.1 ppm 22℃	シルト質 壤土	土壌分析	CO ₂ 捕集		
			0日	1週	86	
			4日	2週	55	
			8日	4週	21	
			16日	6週	7.8	
			32日	8週	2.0	
		128日	10週	0.5		
		石灰質砂 壤土	0日	1週	87	
			4日	2週	47	
			8日	4週	20	
			16日	6週	5.3	
			32日	8週	1.2	
			128日	10週	0.4	
		水中光分解	2 ppm 25℃	リン環- ¹⁴ C- 標識	蒸留水	6時間
48時間	87.4					
120時間	88.6					
自然水	6時間				93.1	
	48時間				72.2	
	120時間				54.4	
ベンゼン環-U- ¹⁴ C- 標識	蒸留水			6時間	91.5	
				48時間	85.4	
				120時間	80.8	
	自然水			6時間	91.1	
				48時間	64.4	
				120時間	45.6	

〔附〕 ベンジルアミノプリンの開発年表