

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

(2) D2341 のラットにおける吸収、分布、代謝及び排泄

(資料 No. M-2)

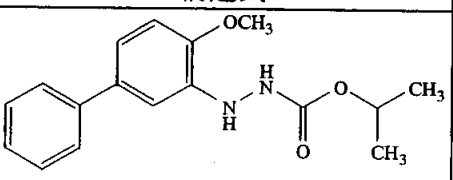
試験機関 : 日産化学工業 (株)

報告書作成年 : 1999 年

目的) 本試験実施の目的は、以下の 2 点である。

- 1) 資料 No. M-1 の補足試験。組織 (血漿、肝臓及び脾臓) 中代謝物の分析を実施した。
- 2) D2341 と の比較代謝試験。その残留毒性に係る安全性評価試験として実施した。

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名 : D2341 ; Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試動物 : Sprague-Dawley 系雄ラット、6~7.5 週令、体重 156~232g

試験方法 :

投与量及び投与方法

D2341 をそれぞれの非標識体にて希釈後ジオールに溶解或いは懸濁させて投与液とし、ラットに 1 回強制経口投与した。

試験投与量は 10mg/kg、投与放射能は 1~2MBq/kg とした。

試験項目

D2341 投与後、1) 尿糞中排泄、2) ファーマコキネクス、3) 組織内濃度、4) 胆汁中排泄及び 5) 代謝物の 5 項目の試験を実施した。

各試験項目の試料採取時間及び使用ラット数を下表に示した。

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

投与群	試験項目	試料及び採取時間	ラット数
D2341 10mg/kg 1回経口	尿糞中排泄	・0-24、24-48、48-72時間の尿及び糞	2匹
	ファーマコキネティクス	・1、2、4、6、8、10、12、24、48及び72時間後の血漿中濃度（尾静脈採血）	2匹
	組織内濃度	・6及び72時間後の組織内濃度 ¹	2匹
	胆汁中排泄	・0-3、3-6、6-24時間の胆汁 ・0-24時間の尿及び糞 ・24時間後の消化管、肝臓及び屍体	2匹 (胆管カニ -ラット)
	代謝物	・0-48時間尿中代謝物（酵素処理） ・0-72時間糞中代謝物 （尿糞中排泄の試料を分析） ・0-24時間胆汁中代謝物（酵素処理） （胆汁中排泄の試料を分析） ・1、4時間 ³ 血漿、肝臓及び脾臓中代謝物	各時間2匹

¹ 摘出組織：血液、脾臓、膵臓、脂肪、精巣、副腎、肺、心臓、胸腺、眼球、大脳、小脳、腎臓及び肝臓

放射能の測定

試料中放射能は、液体シンチレーションカウンター（LSC）を用いて測定した。放射能測定のための試料調製は、乳化系シンチレーターを直接加えるか、もしくは燃焼処理により行った。

燃焼処理は全自動試料燃焼装置を用いて行った。

代謝物の分析

尿、糞、胆汁、血漿、肝臓及び脾臓は、次頁に示した70-に従い分析した。各試料の抽出液は以下の条件によるTLC 或いはHPLC 分析に供した。代謝物は標準品とのコマトグラフィーにより同定した。

薄層コマトグラフィー（TLC）条件：

高速液体コマトグラフィー（HPLC）条件：

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

試料中放射能の抽出及び代謝物分析

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

試験結果：

1) D2341 投与後の動態

1-1) 尿糞中排泄

D2341 を 10mg/kg の割合で雄ラットに 1 回経口投与した後の尿糞中への放射能の排泄率を表 1 に示した。

72 時間までの排泄率は 92.3% であり、尿及び糞中にそれぞれ 28.8% 及び 62.8% 排泄された。

表 1 D2341 投与尿糞中累積排泄率 (原報告書 表 2 より平均値を抜粋)

数値は投与放射能に対する%、2 匹平均

時間 (hr)	尿	糞	ケージ洗液	合計
0~24	22.1	43.2	-	65.3
~48	27.7	60.5	-	88.2
~72	28.8	62.8	0.7	92.3

-: ケージ洗淨せず

1-2) ファーマコキネクス

D2341 を 10mg/kg の割合で雄ラットに 1 回経口投与した後の血漿中濃度を図 1 に示した。各血漿中濃度を 1-コンパートメントモデルに回帰して求めたファーマコキネクスパラメータを表 2 に示した。最高血漿中濃度 (Cmax) 6.96 μ g/g、最高血漿中濃度到達時間 (Tmax) 5.77 時間を経たのち、半減期 (T_{1/2}) 6.52 時間で消失した。濃度曲線下面積 (AUC) は 121.6 μ g \cdot hr/g であった。

図 1 D2341 投与後血漿中濃度 (原報告書 図 2)

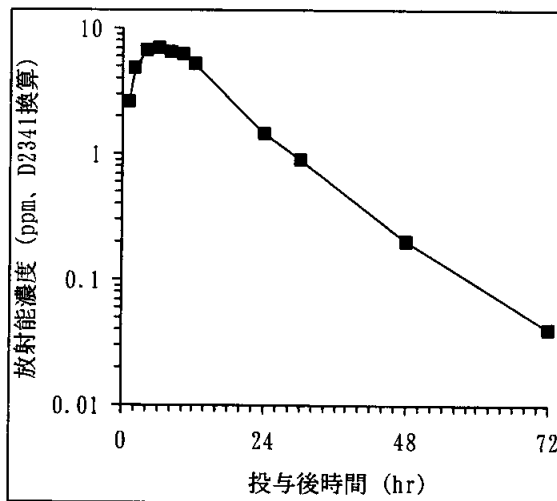


表 2 ファーマコキネクスパラメータ (原報告書 表 3)

Cmax (μ g/g)	6.96
Tmax (hr)	5.77
T _{1/2} (hr)	6.52
AUC (μ g \cdot hr/g)	121.6

1-3) 組織内濃度

D2341 を 10mg/kg の割合で雄ラットに 1 回経口投与した後、6 時間及び 72 時間の組織内濃度を表 3 に示した。

投与後 6 時間では血漿が最も高く、次いで肝臓、血液、副腎、腎臓、脂肪、肺の順であった。投与後 72 時間では肝臓で最も高かったが、その濃度は 0.72 μ g 相当量/g でしかなかった。

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

特定の組織への放射能残留は認められなかった。

表 3 D2341 投与組織内濃度 (原報告書 表 4 より平均値を抜粋)

数値は μg 相当量/g、カッコ内は投与放射能に対する%、2 匹平均

組織	6 時間		72 時間	
血液	6.23		0.17	
血漿	8.32		0.04	
肝臓	6.55	(2.70)	0.72	(0.52)
腎臓	3.51	(0.37)	0.34	(0.04)
脾臓	1.15	(0.04)	0.06	(< 0.01)
膵臓	1.45	(0.02)	0.04	(< 0.01)
脂肪	2.75		< 0.06	
精巣	1.21	(0.13)	0.02	(< 0.01)
副腎	3.61	(0.01)	0.09	(< 0.01)
肺	2.59	(0.14)	0.18	(0.01)
心臓	1.68	(0.08)	0.07	(< 0.01)
胸腺	0.58	(0.02)	0.01	(< 0.01)
眼球	0.58	(0.01)	< 0.01	(< 0.01)
大脳	0.30	(0.02)	0.04	(< 0.01)
小脳	0.32	(0.01)	0.04	(< 0.01)

1-4) 胆汁中排泄

D2341 を 10mg/kg の割合で雄ラットに 1 回経口投与した後の胆汁中排泄率を表 4 に示した。

投与後 24 時間までの胆汁中への排泄は投与放射能の 55.4%であり、主要な排泄経路は胆汁であった。胆汁中排泄の結果から、吸収率(胆汁+尿+肝臓+残りの屍体)は約 79%と推定された。

$$\text{吸収率} = 55.4 + 17.8 + 1.0 + 4.7 = 78.9(\%)$$

表 4 D2341 投与胆汁中排泄 (原報告書 表 5 より平均値を抜粋)

数値は投与放射能に対する%、2 匹平均

試料	時間(hr)	% dose
胆汁	0- 3	18.1
	0- 6	35.6
	0-24	55.4
尿	0-24	17.8
糞	0-24	6.8
消化管 (含内容物)	24	9.5
肝臓	24	1.0
残りの屍体	24	4.7
合計	0-24	95.2

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

2)

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

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

3) D2341 のラット体内動態の比較

尿糞中排泄

D2341 投与共に 48 時間後の総排泄率は 90%であり、いずれも速やかに体外排泄された。

D2341 投与では尿中排泄に比べ糞中排泄が多かったが、
では尿中と糞中でほぼ同等の排泄率であり、排泄経路に若干の差がみられた。

ファーマコキネクス

血漿最高濃度到達時間 (Tmax) 及び消失半減期 ($t_{1/2}$) は、D2341 投与で共に類似した。血漿最高濃度 (Cmax) 及び時間-濃度曲線下面積 (AUC) は、
で D2341 投与の約 2 倍であった。

組織内濃度

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

D2341 投与 ともに放射能の組織残留性(投与後 72 時間)は認められなかった。

胆汁中排泄

胆汁中への排泄は のほうが少なく、尿中への排泄が多い傾向がみられた。この結果は、尿糞中排泄の結果に反映していた。胆汁中排泄の結果から計算した吸収率は D2341 投与でやや高かったが、いずれの投与においても 10mg/kg の投与量では高い割合で消化管から吸収されるものと考えられた。

代謝物

D2341 をラットに経口投与した後の推定代謝分解経路を図 3 に示した。

D2341 投与の場合、血漿、肝臓及び脾臓から D2341 が検出されたこと

とより、D2341 として吸収されと考えられた。D2341 は

続く 形成後、胆汁を介し糞中に排泄された。また、

も糞中に排泄された。

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

図 3 D2341 のラットにおける推定代謝分解経路 (原報告書 図 15)

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

(3) ラットにおける血漿、赤血球及び脾臓中代謝物 (200 及び 10mg/kg)

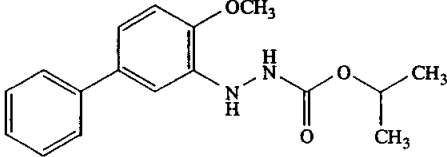
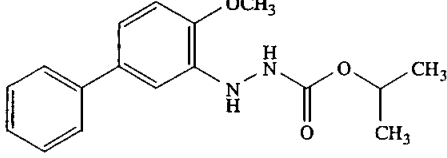
(資料 No. M-3)

試験機関 : 日産化学工業 (株)

報告書作成年 : 2000 年

目的 : D2341 の高用量 200mg/kg 及び低用量 10mg/kg 投与におけるラットでの血漿、赤血球及び脾臓中代謝物を調べる。

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	
D2341		7.1MBq/mg	

化学名 : Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試動物 : Sprague-Dawley 系雌雄ラット、6 週令、体重 雄 ; 149.7-177.2g、雌 ; 123.0-137.5g

試験方法 :

投与量及び投与方法

D2341 あるいは D2341 を非標識 D2341 にて希釈後コソールに溶解あるいは懸濁させて投与液とし、ラットに 1 回強制経口投与した。投与量は 200mg/kg あるいは 10mg/kg、投与放射能は 624-962kBq/匹とした。

試験項目

1) ファーマコキネクス (PK) 試験 (200mg/kg 投与のみ) 及び 2) 血漿、赤血球及び脾臓中代謝物分析試験の 2 試験を実施した。尚、PK 試験は、200mg/kg 代謝物分析試験の屠殺時間を決定するために実施した。試験設計を下表に示した。

試験項目	標識体	動物	投与量	内容
1) PK 試験		雌雄ラット	200mg/kg	投与後 72 時間まで経時的に血漿中濃度測定
2) 代謝物分析試験		雌雄ラット	200 及び 10mg/kg	200mg/kg は 6 時間後、10mg/kg は 4 時間後の血漿、赤血球及び脾臓中代謝物分析
		雄ラット	200mg/kg	6 時間後の赤血球中代謝物分析

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

1) PK 試験

2) 代謝物分析試験

試料の採取

代謝物の分析

血漿中代謝物の分析法を以下に示した（原報告書 Figure 1）。

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

血漿の中性水画分については以下の方法で別途酵素分解を行った(原報告書 Figure 2)。

赤血球中代謝物の分析法を以下に示した(原報告書 Figure 3)。

(1) 赤血球の遠心分離後の水画分については以下の方法で別途酵素分解及びメタノール抽出を行った(原報告書 Figure 4)。

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

(2) 赤血球の遠心分離後の残渣については以下の方法で酸性/アルカリ性下加熱分解を行った (原報告書 Figure 5)。

脾臓中代謝物の分析法を以下に示した (原報告書 Figure 6)。

放射能の測定

試料中放射能は、液体シンチレーションカウンター (LSC) を用いて測定した。放射能測定のための試料調製は、乳化系シンチレーターを直接加えるか、あるいは燃焼処理により行った。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 条件

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

試験結果：

1) PK 試験

D2341 を 200mg/kg の割合で雌雄ラットに 1 回経口投与した後の血漿中濃度推移を表 1 に示した。

雄では投与後 10 時間 (Tmax) に最高濃度 85.2 µg eq/g (Cmax) に達した。雌では 6 時間後の 55.7 µg eq/g であった。代謝物分析のための屠殺時間を 6 時間とした。

表 1 D2341、200mg/kg 経口投与後のラット血漿中放射能濃度推移
(原報告書 Table 3、雌雄各 3 匹の平均値を抜粋)

投与後時間 (hr)	濃度 (µg eq. D2341/g)	
	雄	雌
1	23.8	31.3
3	54.2	42.8
6	80.9	55.7
10	85.2	42.9
24	58.0	32.2
32	35.6	18.7
48	5.9	2.7
72	0.9	0.6

2) 代謝物分析試験

試料中放射能濃度

D2341 を 200mg/kg あるいは 10mg/kg の割合で雌雄ラットに 1 回経口投与した後の血漿、赤血球及び脾臓中濃度を表 2 に示した。

200mg/kg 投与後の各組織中濃度は、10mg/kg 投与後濃度の約 10 倍であった。

表 2 D2341 を 200mg/kg あるいは 10mg/kg の割合で雌雄ラットに 1 回経口投与した後の血漿、赤血球及び脾臓中濃度 (ppm、µg eq. D2341/g) (原報告書 Table 5)

標識化合物	投与量	血漿		赤血球		脾臓	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
	200mg/kg	67.7ppm	45.3ppm	11.7ppm	10.2ppm	12.2ppm	5.8ppm
	10mg/kg	8.9ppm	5.7ppm	1.3ppm	0.70ppm	1.2ppm	0.60ppm

— : 測定せず。

D2341/高用量 200mg/kg 投与後の組織中代謝物

高用量 200mg/kg 投与後 6 時間の雌雄ラット組織における代謝物比率を表 3 に示した。

血漿では、酸性下酢酸エステル画分に 47.3-49.0% と主要に検出された。中性水画分 (血漿中放射能の 96.6%) について酵素分解した結果、91.3% が遊離したことから、血漿中代謝物の殆どは として遊離した であると考えられた

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

(表5)。このことは表3における酸性下抽出

であることを示唆した。

赤血球では、D2341(記号A)が35-36%と主要に検出された。が見られ、この他の酢酸エステル可溶代謝物は殆ど検出されなかった。水画分に25-32%が、残渣に27-33%の放射能が認められた。水画分はpH7-9分解及び凍結乾燥/メタノール抽出を、残渣は酸性/アルカリ性下加熱加水分解を試みたが、いずれの処理においても放射性化合物は殆ど遊離しなかった(原報告書 Table 10 及び 11)。

脾臓では、D2341(記号A)が44-48%(中性及び酸性抽出合計)、と主要であった。は酸性抽出画分でのみ検出されたことから血漿中同様と考えられた。が、が検出された。TLC原点部の極性代謝物として7-8%(中性及び酸性抽出合計)、抽出残渣に11%が認められた。

表3 D2341、高用量 200mg/kg 投与 6 時間後の組織中代謝物比率 (原報告書 Table 7) (試料中放射能に対する%)

	血漿		赤血球		脾臓	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
80%アセトニトリル抽出	-	-	-	-	89.3	88.7
酢酸エステル画分(中性抽出)	N.D.	N.D.	40.7	41.9	54.0	51.7
D2341(記号A)	-	-	36.2	35.4	46.3	42.2
酢酸エステル画分(酸性抽出)	51.6	56.2	N.D.	N.D.	35.3	37.0
D2341(記号A)	N.D.	N.D.	-	-	2.2	2.3
水画分	48.4	43.8	31.9	25.2	N.D.	N.D.
抽出残渣	-	-	27.4	32.9	10.7	11.3

ND: 検出されず、-: 該当なし

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

D2341/低用量 10mg/kg 投与後の組織中代謝物

低用量 10mg/kg 投与後 4 時間の雌雄マウス組織における代謝物比率を表 4 に示した。

血漿では、 が 検出された。D2341 (記号 A) や が検出されたが、未満と微量であった。水溶性代謝物は 34-37%であった。中性水画分の酵素処理により、血漿中成分の 84.2%は であることが判明した(表 5)。よって酸性下抽出の であることが示唆された。

赤血球では、D2341 (記号 A) が 48-50%と主要に検出された。 は 、水溶性代謝物や抽出残渣は 9-13%であった。

脾臓では、 が と主要であり、次いで D2341 (記号 A) が 17-27%、 検出された。その他の代謝物や TLC 原点部代謝物に約 10-14%が認められ、抽出残渣は 6-8%であった。

表 4 D2341、低用量 10mg/kg 投与 4 時間後の組織中代謝物比率
(原報告書 Table 8) (試料中放射能に対する%)

	血漿		赤血球		脾臓	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
80%アセトニトリル抽出	-	-	-	-	92.3	94.3
酢酸エチル画分(中性抽出)	3.1	2.7	74.1	80.5	45.8	34.8
D2341 (記号 A)	0.8	0.4	47.5	49.6	26.8	16.6
酢酸エチル画分(酸性抽出)	59.7	63.8	N.D.	N.D.	42.4	59.4
D2341 (記号 A)	N.D.	N.D.	-	-	N.D.	N.D.
水画分	37.2	33.5	12.7	8.5	4.1	N.D.
抽出残渣	-	-	13.2	11.0	7.7	5.7

ND: 検出されず、-: 該当なし

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

表 5 D2341、高用量 200mg/kg 及び低用量 10mg/kg 投与後雄ラット血漿の中性水画分酵素処理後の代謝物比率
(原報告書 Table 9) (試料中放射能に対する%)

	200mg/kg		10mg/kg	
	酵素ブランク	酵素処理	酵素ブランク	酵素処理
酢酸エステル画分(中性)	3.4	3.4	2.2	2.2
酢酸エステル画分(インキュベ-ト後)	7.4	93.9	6.7	88.9
水画分(インキュベ-ト後)	89.2	2.6	91.1	8.9

D2341/高用量 200mg/kg 投与後の赤血球中代謝物

を高用量 200mg/kg 投与後 6 時間の雄ラット赤血球における代謝物比率を表 6 に示した。

投与の場合は、D2341(記号 A)が 85.4%と赤血球中代謝物の大部分を占めた。

が 検出された他、水画分及び残渣の比率はそれぞれ 4.8%及び 4.1%と小さかった。

表 6 D2341、高用量 200mg/kg 投与 6 時間後の赤血球中代謝物比率
(原報告書 Table 12) (試料中放射能に対する%)

	ラット No. 022	ラット No. 023	平均*
酢酸エステル画分	90.0	92.3	91.2
D2341(記号 A)	87.8	83.1	85.4
水画分	6.0	3.6	4.8
残渣	4.0	4.1	4.1

*: 平均値は申請者が算出して記載した。

血漿、赤血球及び脾臓中代謝物の種類には高用量及び低用量の投与量間で顕著な差は認められなかった。また、性差についても殆ど認められなかった。

血漿では が主要代謝物であった。
赤血球では D2341(記号 A)が主要であり、 が認められた。

また、酵素分解や酸/アルカリ分解によっても遊離しないことから、これは赤血球成分に強固に結合していると考えられた。
脾臓中の代謝物は血漿及び赤血球両方の代謝物を反映した。

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

(4) D2341 のラットにおける吸収、分布、代謝及び排泄

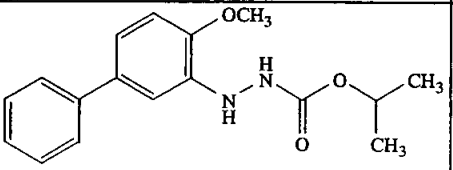
(資料 No. M-4)

試験機関 : 日産化学工業 (株)

報告書作成年 : 1999 年

目的)

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		7.1MBq/mg	

化学名 : D2341 ; Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試動物 : Sprague-Dawley 系雄ラット、6 週令、体重 172~176g

試験方法 :

投与量及び投与方法

D2341 を非標識体にて希釈後コンオイルに溶解或いは懸濁させて投与液とし、ラットに 1 回強制経口投与した。

試験投与量は低用量 10mg/kg 或いは高用量 1000mg/kg とし、投与放射能は 1MBq/kg とした。

尿糞及び呼気中排泄

2 匹ずつの雄ラットに D2341 を 10 或いは 1000mg/kg の割合で 1 回経口投与し、呼気捕集系を接続した閉鎖系のガラス代謝ケージに収容した。呼気はモイタルミンにて捕集し、投与後 2、4、6、24 及び 48 時間後に一部を採取し、放射能を測定した。尿及び糞は 24 時間毎に 72 時間まで分別採取し、放射能を測定した。

組織残留

投与後 72 時間にラットをと殺し、以下の組織を摘出、燃焼処理後放射能を測定した。

血液、脾臓、膵臓、脂肪、精巣、副腎、肺、心臓、胸腺、眼球、大脳、小脳、腎臓及び肝臓

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

尿糞中代謝物の分析

尿糞中放射能の抽出及び代謝物の分析⁷⁰⁻を以下に示した。

放射能の測定

試料中放射能は、液体シンプレクソンカウンター（LSC）を用いて測定した。放射能測定のための試料調製は、乳化系シンプレクソンカウンターを直接加えるか、もしくは全自動試料燃焼装置による燃焼処理により行った。

試験結果：

1) 尿糞及び呼気中排泄

D2341 投与後の尿糞及び呼気中への放射能の排泄率を表1に示した。

低用量：48時間までに呼気中に37%が排泄された。72時間までの尿及び糞中に5%及び49%が排泄され、主要な排泄経路は糞及び呼気中であった。

高用量：48時間までに呼気中に5%が排泄された。72時間までの尿及び糞中に1%及び87%が排泄され、主要な排泄経路は糞中であった。

部分は代謝分解により炭酸ガスとなり、呼気中に排泄されることが示唆された。

表1 D2341 投与後尿、糞及び呼気中累積放射能排泄率(原報告書 表2より抜粋)

数値は投与放射能に対する%、2匹平均

時間(hr)	低用量(10mg/kg)				高用量(1000mg/kg)			
	尿	糞	呼気	合計	尿	糞	呼気	合計
0~2	—	—	7.8	7.8	—	—	0.4	0.4
~4	—	—	16.4	16.4	—	—	0.6	0.6
~6	—	—	19.3	19.3	—	—	0.7	0.7
~24	3.8	41.1	32.0	76.9	0.3	76.5	2.6	79.4
~48	4.5	48.2	36.8	89.5	0.6	85.8	4.9	91.3
~72	4.7	49.3	36.8*	90.8	0.7	86.9	4.9*	92.5
ケージ洗液	—	—	—	0.1	—	—	—	0.3
合計	—	—	—	90.9	—	—	—	92.8

—：試料採取なし或いは該当なし、*：48~72時間の呼気測定は実施していない

2) 組織残留

D2341 投与後72時間の組織内濃度を表2に示した。

低用量及び高用量投与ともに組織内濃度及び分布率は小さく組織残留性は認められなかった。

表2 D2341 投与72時間後の組織内濃度(原報告書 表3より抜粋)

数値は μg 相当量/g、カッコ内は投与放射能に対する%、2匹平均

組織	低用量(10mg/kg)		高用量(1000mg/kg)	
血液	0.02		<1.9	
血漿	0.02		<1.9	
肝臓	0.27	(0.17)	4.2	(0.03)
腎臓	0.07	(0.01)	1.2	(< 0.01)
脾臓	0.04	(<0.01)	<0.9	(< 0.01)
膵臓	0.04	(<0.01)	<1.4	(< 0.01)
脂肪	<0.08		<7.4	
精巣	0.03	(<0.01)	0.5	(< 0.01)
副腎	<0.10	(<0.01)	<8.6	(< 0.01)
肺	0.03	(<0.01)	0.6	(< 0.01)
心臓	0.02	(<0.01)	<0.6	(< 0.01)
胸腺	0.06	(<0.01)	<0.9	(< 0.01)
眼球	<0.02	(<0.01)	<2.0	(< 0.01)
大脳	0.02	(<0.01)	<0.7	(< 0.01)
小脳	<0.02	(<0.01)	<1.9	(< 0.01)

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

3) 尿及び糞中代謝物

D2341 投与後の尿及び糞中代謝物比率を表 3 に示した。

低用量：糞中に D2341 (記号 A)、が 5~7%検出された。

高用量：糞中では、未吸収と考えられる D2341 (記号 A) が殆どを占めた。

表 3 D2341 投与後尿及び糞中代謝物比率 (原報告書 表 4~5 より抜粋)

数値は投与放射能に対する%、2 匹平均

画分	低用量(10mg/kg)		高用量(1000mg/kg)		
	尿 (0-24 時間)		糞** (0-48 時間)	尿** (0-24 時間)	糞** (0-48 時間)
	酵素 処理前	酵素 処理後			
ジクロロタン可溶画分	0.3	1.4	35.9	0.1	83.8
D2341 (記号 A)	< 0.1	< 0.1	7.1	0.1	77.0
水可溶画分	3.5	2.4	8.1	0.3	1.2
抽出残渣	NA	NA	4.2	NA	0.8
合計	3.8	3.8	48.2	0.4	85.8

NA：適用なし、

**酵素処理は実施していない

D2341 をラットに経口投与した後の推定代謝経路を図に示した。

図 D2341 のラットにおける推定主要代謝分解経路 (原報告書 図 4)

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

(5) 雌ラットにおける組織内濃度

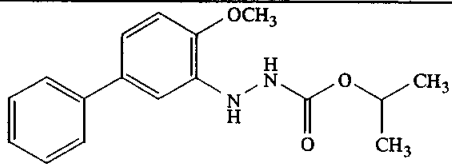
(資料 No. M-5)

試験機関 : 日産化学工業 (株)

報告書作成年 : 1999 年

目的) 資料 No. M-1 の経時組織分布試験において高用量 1000mg/kg 投与後 168 時間まで脾臓中放射能濃度は増加傾向にあった。特に雌ラットではこの傾向が大きかった。脾臓での放射能濃度の減衰を調べることを目的として本試験を実施した。血液、血漿、血球及び肝臓濃度も併せて調べた。

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名 : D2341 ; Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試動物 : Sprague-Dawley 系雌ラット、6 週令、体重 124~143g

試験方法 :

投与量及び投与方法

D2341 を非標識体にて希釈後コンバイに溶解或いは懸濁させて投与液とし、ラットに 1 回強制経口投与した。

試験投与量は 1000mg/kg とし、投与放射能は 2MBq/kg とした。

組織内濃度

ラットに投与後 1、7、14、21 及び 30 日目に各日 2 匹ずつと殺し、血液 (血漿、血球)、脾臓及び肝臓を摘出し、燃焼処理後放射能を測定した。

放射能の測定

全自動試料燃焼装置で燃焼処理後、液体シンプレ-ンカウンター (LSC) にて放射能を測定した。

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

試験結果：

組織内濃度

D2341 を 1000mg/kg の割合で雌マウスに 1 回経口投与した後の組織内濃度推移を表及び図に示した。

脾臓中濃度は経時的に増加したが、14 日後で最高濃度 (46.7 μ g 相当量/g) となり、以降減少傾向が認められた。30 日後の濃度は 13.1 μ g 相当量/g であった。

血液、血漿及び血球中濃度は投与後 1 日が最高濃度であり、以後減衰して 14 日後には検出限界以下となった。

肝臓中濃度は投与後 1 日で最高濃度 (75.8 μ g 相当量/g) となり、30 日後には 1.3 μ g 相当量/g となった。

表 D2341 投与後の組織内濃度推移 (原報告書 表より平均値抜粋)

数値は μ g 相当量/g、カッコ内は投与放射能に対する%、2 匹平均

投与後日数	脾臓	肝臓	血液	血漿	血球
1 日	22.2 (0.01)	75.8 (0.41)	71.8	69.6	48.8
7 日	26.7 (0.02)	9.5 (0.06)	14.0	1.4	26.9
14 日	46.7 (0.02)	7.4 (0.05)	<1.2	<1.2	<1.5
21 日	35.9 (0.02)	2.0 (0.02)	<1.2	<1.2	<1.5
30 日	13.1 (0.01)	1.3 (0.01)	<1.2	<1.2	<1.5

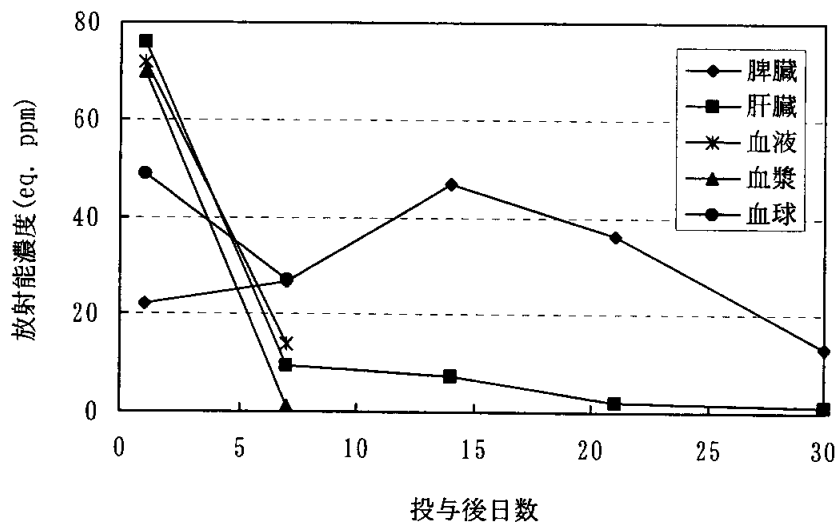


図 D2341 投与後組織内濃度推移 (原報告書の図を合わせて記載した)

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

(6) ラット門脈血漿中 D2341 及び の分析

(資料 No. M-6)

試験機関 : 日産化学工業 (株)

報告書作成年 : 1999 年

目的) は、D2341 の植物代謝試験 (資料 No. M-6、M-7 及び M-8) において検出される主要な代謝物である。D2341 投与後のラットにおける の生成を確認するため本試験を実施した。また、 投与後の検出についても実施し、比較検討した。

供試化合物 : 以下の化合物を供試した。

名称	構造式	ロット番号	化学的純度*
D2341 (記号 A)		2228-008-CAV	

* : LC/MS/MS (MRM) 分析値

化学名 : D2341 ; Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試動物 : Sprague-Dawley 系雄ラット、6~8 週令

試験方法 :

投与量及び投与方法

D2341 或いは をコーン油に溶解させて投与液とし、10mg/kg の割合でラットに 1 回強制経口投与した。

門脈血漿の採取

D2341 及び は、肝臓において速やかに代謝分解されることが示唆された (資料 No. M-2)。よって分析試料は、肝臓に至る前の門脈血漿とした。

D2341 投与 0.5、1 及び 2 時間後 1 時間後に、エーテル麻酔下ラットより、門脈血を採取した。遠心により血漿を分離し分析に供した。なお、操作は氷冷下で行った。

試料分析

試料中の D2341 及び の分析プロ-を以下に示した (原報告書 図 1)。

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

検量線

0.5、0.01 及び 0.0005ppm の D2341 或いは アセトリル溶液 (DPH 40ug を含む) を調製し、検量線を作成した。検量線の相関係数は 1.000 であった (原報告書 図 2 及び 3)。

回収試験

コン油のみを投与したラット門脈血漿を用いて回収試験を行った。添加時期は血漿直接添加及び酢酸エチル画分添加の 2 時点、添加率は各成分 1ppm (血漿比重 1 として計算) とした。

・直接添加

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

・酢酸フェル画面分添加

計算

回収率及び変換率は、以下により算出した。

$$\text{回収率}\% = 100 \times \text{D2341 検出濃度} / \text{D2341 添加濃度}$$

$$\text{変換率}\% = 100 \times \text{検出濃度} / \text{D2341 添加濃度}$$

各化合物の存在を評価するため、以下のように存在率を計算した。

$$\text{存在率}\% = 100 \times \text{D2341 検出濃度} / (\text{D2341 検出濃度} + 100 \times \text{検出濃度} / (\text{D2341 検出濃度} + \dots))$$

試験結果：

1) 回収試験

回収試験の結果を表 1 に示した。

無添加血漿では、D2341 及び の濃度は、ともに検出限界である 0.004ppm 以下であった。血漿に直接添加した場合、D2341 の回収率は 99.6%と良好であり、 と低かった。

酢酸フェル画面分添加では、D2341 及び の回収率はそれぞれ 103.4%及び 87.6%であり、についても分析操作中での変換は少ないと考えられた。

表 1 回収試験結果 (2 連平均値、原報告書 表 1 より平均値を抜粋)

	無添加	直接添加		酢酸フェル画面分添加	
		D2341 添加	添加	D2341 添加	添加
D2341 検出	<0.004ppm	99.6% ¹⁾ (98.3%) ³⁾	7.7% ²⁾	103.4% ¹⁾	13.7% ²⁾
合計	—	101.3%	15.4%	105.3%	101.3%

¹⁾ : 回収率、²⁾ : 変換率、³⁾ : 存在率 (原報告書 表 2 より平均値を抜粋)

2) D2341 投与後試料分析

D2341 投与後、0.5、1 及び 2 時間における門脈血漿中の D2341 及び の濃度及び存在率をそれぞれ表 2 及び表 3 に示した。

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

投与後 0.5 時間の D2341 濃度は 0.123~0.266ppm であり、
あった。

投与後 1 時間の D2341 及び はそれぞれ 0.045~0.478ppm
あった

投与後 2 時間の D2341 濃度はそれぞれ 0.027~0.741ppm
あった。

で
で
で

表 2 D2341 投与後門脈血漿中 D2341 及び 濃度 (原報告書 表 3)

・投与 0.5 時間

ラット番号	1	2	3	4	5
D2341 (ppm)	0.266	0.178	0.219	0.123	0.208
合計 (ppm)	0.270	0.178	0.223	0.123	0.208

・投与 1 時間

ラット番号	6	7	8	9	10	11	12
D2341 (ppm)	0.478	0.169	0.045	0.162	0.088	0.090	0.058
合計 (ppm)	0.654	0.169	0.055	0.172	0.088	0.090	0.058

・投与 2 時間

ラット番号	13	14	15	16	17	18
D2341 (ppm)	0.143	0.741	0.027	0.104	0.181	0.060
合計 (ppm)	0.194	0.777	0.027	0.104	0.188	0.060

表 3 D2341 投与後門脈血漿中 D2341 及び の存在率 (原報告書 表 4)

・投与 0.5 時間

ラット番号	1	2	3	4	5
D2341 (%)	98.5	100	98.2	100	100

・投与 1 時間

ラット番号	6	7	8	9	10	11	12
D2341 (%)	73.1	100	81.8	94.2	100	100	100

・投与 2 時間

ラット番号	13	14	15	16	17	18
D2341 (%)	73.7	95.4	100	100	96.3	100

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

ラット代謝試験のまとめ（資料 No. M-1～M-5）

（1）D2341 のラット代謝

D2341 或いは D2341 を雌雄ラットに低用量（10mg/kg）或いは高用量（1000mg/kg）で1回経口投与した後の吸収、分布、代謝及び排泄試験を実施した。また、10及び200mg/kg投与後の組織内代謝物についても検討した。試験結果の概要について以下にまとめた。

吸収（血漿中薬物動態）（資料 No. M-1）

D2341 を低用量投与したとき、投与5～6時間後に最高血漿中濃度（C_{max}）に達し、血漿中からの放射能消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は、12～13時間であった。高用量投与したときは、C_{max}が18～24時間、半減期 $t_{1/2}$ が12～16時間であった。C_{max}及び血漿中濃度曲線下面積（AUC）は投与量の増加に伴い増大した。

尿中及び胆汁中排泄率より計算された吸収率は、低用量投与で79～85%、高用量投与で22～29%であった。性差は認められなかった。

分布（資料 No. M-1、M-4）

D2341 を低用量投与したとき、各組織とも投与6時間後が最高濃度となり、特に肝臓、血液、腎臓で高い値を示した。以後経時的に減少し、168時間後の組織残留性は認められなかった。

高用量投与したとき、雄ラットでは多くの組織で投与18時間後が最高値であったが、雌ラットでは、42時間後に最高値に達した。以後、大部分の組織内濃度は経時的に減少したが、脾臓では168時間後まで経時的に増加した。特に雌ラットでこの傾向が大きかったため、別途168時間（7日）以降の濃度を調べた。その結果、14日後を最高値として21日及び30日後では減少した。

を投与したとき、組織残留性は認められなかった。

代謝（資料 No. M-1、M-2、M-2-2、M-3 及び M-5）

親化合物 D2341（記号 A）はラット体内において速やかに代謝されることが示唆された。

排泄（資料 No. M-1、M-2 及び M-3）

D2341 を低用量投与したとき、48 時間以内の総排泄量は 90%に達し、主たる排泄経路は糞中であつた。胆汁への排泄は、約 70%であつた。高用量経口投与では、96 時間以内の総排泄量は 92~94%であり、その殆どが糞中に排泄された。胆汁への排泄は約 25%であつた。低用量では胆汁を経由する糞中排泄が主であり、高用量では一部胆汁を経由するが多くは未吸収による糞中排泄が主であると考えられた。

D2341 を低用量投与したとき、呼気中に 37%が排泄された。

（2） のラット代謝（資料 No. M-2 及び M-5）

D2341 の作物残留成分として、 が検出された。 の安全性評価のため、 を雄ラットに低用量 (10mg/kg) 1 回経口投与した後の吸収、分布、代謝及び排泄試験を実施した。試験結果の概要について以下にまとめ、D2341 投与後の動態と比較した。

吸収（血漿中薬物動態）

代謝

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

排泄

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

2. 植物体内運命に関する試験

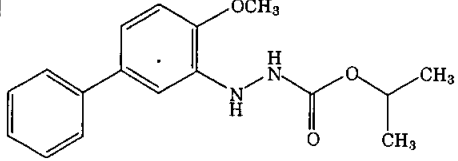
(1) 温州みかんにおける代謝試験

(資料 No. M-7)

試験機関 : (財)残留農薬研究所 (GLP 対応)

報告書作成年 : 1998 年

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名 : Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物 : 温州みかん (*C. unshiu Marcovitch*)、5年生、果実肥大期・後期～着色期・初期。
みかん樹は馴化栽培後、野外ファイトトン内で栽培した。光源は自然太陽光とした。

試験方法 :

D2341 の処理

1) 施用液の調製及び施用量

200ppm の水和剤施用液を調製し、420g a. i./ha*を目標施用量として処理を行った (1996年9月25日)。施用量は、散布予定果樹4個体の平均樹形面積 (1661cm²) を基準として計算した。実際の施用量は 7.34±0.93mg/果樹 (目標量達成率 105%) であった。

*申請者注) 日本でのかんきつへの申請散布量は、267~1400g ai/ha である。

2) 施用法

D2341 の処理回数は1回とした。施用方法は、みかん樹全面への手動散布とした。スチール製の枠をビニールシートで覆った直径70cmの散布容器内にみかん樹を1個体ずつ収容した。ポットは散布液で汚染されないように防護したが、土壌表面は露出させて散布液が落下するようにした。鉢はターンテーブル上に置き、散布中ターンテーブルを回転させてみかん樹への均一散布を行った。

試験設計及び試料の採取

下記3種類の実験区を設定した。実験目的を右に記した (原報告書26頁)。

実験区 FA	果実表面、果皮及び果肉における放射能の分布 各部位の主要放射性残留物の測定
実験区 FB	果実全体に残る放射性残留物の測定
実験区 L	葉表面と葉組織における放射能の分布 各部位の主要放射性残留物の測定

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

処理後の4個体のみかん樹及び非処理対照みかん樹から、下表中に示した点数の果実及び葉試料を各時点で採取し、放射性総残留物 (TRR) 濃度と代謝物比率 (%TRR) を測定した。

(原報告書 33 頁)

果樹番号	0 時点	28 日	56 日	84 日 (成熟期)
果実試料				
1 (非処理対照区)	0	1 ^a + 1 ^b	0	1 ^a + 1 ^b
2 (処理区)	2 ^{a, c} + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	3 ^{a, c} + 1 ^b
3 (処理区)	2 ^{a, c} + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	3 ^{a, c} + 1 ^b
4 (処理区)	2 ^{a, c} + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	1 ^a + 1 ^b	3 ^{a, c} + 1 ^b
5 (処理区/予備) ^d				2 ^e
葉試料				
1 (非処理対照区)	0	1 ^f	0	1 ^f
2 (処理区)	} A : 1 ^{f, g}	1 ^{f, g}	1 ^{f, g}	1 ^{f, g}
3 (処理区)				
4 (処理区)	} B : 1 ^{f, g}	1 ^{f, g}	1 ^{f, g}	1 ^{f, g}
5 (処理区/予備) ^d				

^a 実験区 FA (表面洗浄後に果皮と果肉に分離し、それぞれを分析)

^b 実験区 FB (表面洗浄を行わず全果実を分析)

^c 各果樹の果実をまとめ、1 点の混成試料を調製。

^d 果樹番号 2~4 で収穫試料に不足が生じた場合の予備果樹。

^e 予備果樹の一部の果実と葉は、散布処理時にビニール袋で覆って保護。最終収穫時に 2 点の果実及び葉試料をそれぞれ採取し、処理部位から未処理部位への放射能のシフト移行を測定。

^f 実験区 L (表面洗浄を行い、表面洗浄液と葉組織それぞれを分析)

^g 果樹 2 個体から無作為に 5 枚の葉を採り、これらを合わせて 1 点の混成試料を調製。

A、B : 葉試料の識別コード

試料の分析

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

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

試験結果：

1) 添加回収実験

非処理のみかん植物体試料（全果実、果皮、果肉及び葉）に既知量の D2341 アセトリル 溶液を添加し、試料分析の方法で回収率を測定した結果、 D2341 の回収率は 99.8～106.4%の範囲であり、分析法の妥当性が確認された（原報告書 Table 3～5）。

2) 実験区 FA（果実の表面洗浄、果皮及び果肉分析）

2-1) 放射能の分布

表面洗浄、果皮及び果肉における放射能の分布を表 1 に示した。

散布直後（0 日）におけるみかん果実の総放射性残留物濃度（TRR）は 0.67ppm であった。さらに、28 日後、56 日後及び 84 日後にはそれぞれ 0.30、0.15、0.28ppm となった。

表面洗浄液中に回収された放射能は散布直後で 85%であり、以後減少したが 84 日後でも 55%を占めていた。果皮には散布直後で 15%が認められ、84 日後には 41%に増加したのみであった。

果肉中の TRR 濃度は 84 日後でも 0.0109ppm、5%TRR 未満であった。

みかん果実表面に処理された D2341 の果実組織中への浸透移行速度は遅かった。浸透した放射能の大部分は果皮に存在し、果肉に移行した比率は低かった。

表 1 実験区 FA の果実表面洗浄液、果皮及び果肉における放射能の分布

（原報告書 Table 6 より抜粋）

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR（3 連の平均）

	散布直後(0 日)	28 日後	56 日後	84 日後
表面洗浄液	0.5856(85.00)	0.2247(72.44)	0.0945(59.58)	0.1551(54.90)
果皮(抽出液+抽出残渣)	0.0825(14.70)	0.0694(25.45)	0.0536(35.65)	0.1135(41.01)
果肉(抽出液+抽出残渣)	0.0020(0.30)	0.0041(2.11)	0.0061(4.77)	0.0109(4.09)
合計	0.6701(100.00)	0.2982(100.00)	0.1543(100.00)	0.2795(100.00)

2-2) 放射性成分の分析

実験区 FA の果実中に認められた主要な放射性成分の濃度及び%TRR を表 2 に示した。

表面洗浄液：いずれの時点でも、未変化の D2341（記号 A）が主成分として検出された。その比率は散布直後で 83%TRR、84 日後で 38%TRR であった。

果皮抽出液：ヘキサノール・酢酸エチル抽出液画分（低極性成分）においても未変化の D2341（記号 A）が主成分として検出された（10%TRR 程度）。

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

果皮抽出残渣：ソックス抽出及び酵素処理と化学的抽出により特徴付けを行った結果、ペクチン、リグニン及びセルロース画分に分布していることがわかった。

果肉抽出液：84日後のヘキサン・酢酸エチル溶出液画分に、未変化のD2341（記号A）が0.4%TRR検出された。水溶出液画分中の放射性成分は本質的に果皮と同様であった。

果実全体で見ると、主成分は未変化のD2341（記号A）であった（>50%TRR）。

表2 実験区FAの果実中放射性成分濃度及び比率（原報告書Table15～16）

数値はppm eq.、カッコ内は%TRR（3連の平均）

	散布直後(0日)			28日後			56日後			84日後			
	表面 洗浄液	果皮： ヘキサン/酢酸 エチル溶出液	合計	表面 洗浄液	果皮： ヘキサン/酢酸 エチル溶出液	合計	表面 洗浄液	果皮： ヘキサン/酢酸 エチル溶出液	合計	表面 洗浄液	果皮： ヘキサン/酢酸 エチル溶出液	果肉： ヘキサン/酢酸 エチル溶出液	合計
D2341 (記号A)	0.5704 (82.62)	0.0619 (11.36)	0.6323 (93.98)	0.1890 (61.38)	0.0293 (11.13)	0.2183 (72.51)	0.0753 (47.98)	0.0162 (10.73)	0.0914 (58.72)	0.1098 (38.19)	0.0337 (11.66)	0.0012 (0.42)	0.1447 (50.27)
合計			0.6627 (98.79)			0.2991 (100.37)			0.1546 (100.19)				0.2796 (99.84)

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

3) 実験区 FB (全果実分析)

3-1) 果実中 TRR

みかん全果実中の TRR は実験区 FA 果実のそれと類似しており、散布直後 (0 日)、28 日後、56 日後及び 84 日後でそれぞれ 0.45ppm、0.48ppm、0.20ppm 及び 0.32ppm であった (原報告書 Table 17)。

3-2) 放射性成分の分析

実験区 FB の果実中に認められた主要な放射性成分の濃度及び比率を表 3 に示した。

主成分である未変化の D2341 (記号 A)

の定量結果は、実験区 FA 果実の結果とほぼ同様であった。

表 3 実験区 FB の果実中主要放射性成分の濃度及び比率 (原報告書 Table 23)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR (3 連の平均)

	散布直後 (0 日)	28 日後	56 日後	84 日後
ヘキサン/酢酸エチル溶出液				
D2341 (記号 A)	0.4164 (89.92)	0.3372 (67.66)	0.1089 (54.22)	0.1450 (44.33)
水溶出液	0.0021 (0.45)	0.0084 (2.53)	0.0087 (4.81)	0.0164 (5.37)
アセトニトリル/メタノール溶出液**	0.0023 (0.54)	0.0169 (3.83)	0.0272 (13.20)	0.0486 (15.54)
抽出残渣	0.0063 (1.46)	0.0276 (5.88)	0.0215 (11.12)	0.0358 (10.97)
合計	0.4526 (98.31)	0.4683 (97.51)	0.1943 (98.82)	0.3122 (97.56)

*20 画分の合計値

**56 日後及び 84 日後のアセトニトリル/メタノール溶出液画分から 0.0097ppm (3.86%TRR) 及び 0.0046ppm (1.40%TRR) の D2341 が検出された。

4) 実験区 L (葉の表面洗浄及び葉組織分析)

4-1) 放射能の分布

葉の表面洗浄液と葉組織から検出された放射能の分布を表 4 に示した。

散布直後 (0 日)、28 日後、56 日後及び 84 日後の TRR は、それぞれ 34ppm、24ppm、21ppm 及び 16ppm となった。表面洗浄液中に回収された放射能比率は散布直後で 98%、84 日後で 71%であった。みかん葉に処理された D2341 の浸透移行速度は、果実より遅かった。

表 4 実験区 L の葉における放射能の分布 (原報告書 Table 24 より抜粋)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR (2 連の平均)

	散布直後 (0 日)	28 日後	56 日後	84 日後
表面洗浄液	33.2806 (97.74)	20.1367 (85.65)	15.6716 (75.43)	11.6939 (71.08)
葉組織 (抽出液+抽出残渣)	0.7844 (2.26)	3.3724 (14.35)	5.1055 (24.57)	4.7974 (28.92)
合計	34.0650 (100.00)	23.5091 (100.00)	20.7771 (100.00)	16.4913 (100.00)

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

4-2) 放射性成分の分析

実験区 L の葉中に認められた主要な放射性成分のレベルを表 5 に示した。

葉における代謝運命は、果実中と同様であった。主放射性成分はいずれの時点でも未変化の D2341 (記号 A) であり、施用 84 日後でも約 55%TRR を占めた。

表 5 実験区 L の葉中主要放射性成分の濃度及び比率 (原報告書 Table31~32)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR (3 連の平均)

	散布直後 (0 日)			28 日後			56 日後			84 日後		
	表面 洗浄液	ヘキサン/酢 酸エチル溶 出液	合計	表面 洗浄液	ヘキサン/酢 酸エチル溶 出液	合計	表面 洗浄液	ヘキサン/酢 酸エチル溶 出液	合計	表面 洗浄液	ヘキサン/酢 酸エチル溶 出液	合計
D2341 (記号 A)	31.2956 (91.78)	0.5336 (1.51)	31.8292 (93.30)	15.7240 (66.89)	0.9382 (3.99)	16.6623 (70.88)	10.7284 (51.62)	1.3675 (6.58)	12.0959 (58.20)	8.0651 (48.78)	1.0831 (6.39)	9.1482 (55.17)
水溶出液			0.0142 (0.04)			0.1581 (0.67)			0.3471 (1.67)			0.4038 (2.44)
アセトニトリル/メタノール溶 出液			0.0234 (0.07)			0.4012 (1.71)			0.8978 (4.32)			0.9582 (5.87)
抽出残渣			0.0551 (0.16)			0.9088 (3.87)			1.2273 (5.91)			1.1368 (6.91)
合計			34.0947 (100.08)			23.3309 (99.24)			20.7631 (99.93)			16.3318 (99.02)

5) 温州みかん代謝のまとめ

みかん樹に施用した D2341 の大部分は表面に留まり、果実及び葉内部に移行する比率は低かった。果実において 10%TRR 及び 0.01ppm を越える代謝物は検出されなかった。最も主要な代謝物は、最高比率で TRR (84 日後)、最高濃度で (0 日後) のであった。

D2341 のみかん果実及び葉における想定代謝経路を図に示した。

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

図 D2341 のみかん果実及び葉における想定代謝経路 (原報告書 Figure38)

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

(2) 温州みかんにおける代謝試験 (及び D2341 の比較代謝)

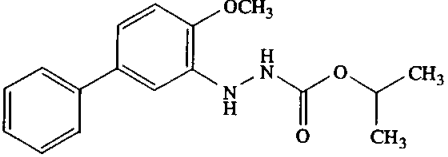
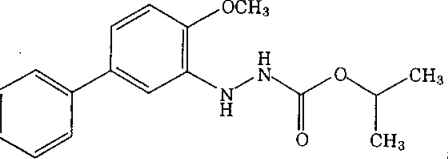
(資料 No. M-8)

試験機関 : 日産化学工業(株)

報告書作成年 : 2000 年

目的 : 及び D2341 を用いて比較代謝試験を行い、植物における D2341 の運命を明らかにする。

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		7.07MBq/mg	
D2341		4.1MBq/mg	

化学名 : Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物 : 温州みかん (果実を有する市販のポット植えみかん樹 2 鉢)

みかん樹は馴化栽培後、RI 用温室内で栽培した。光源は自然太陽光とした。

試験方法 :

及び D2341 のみかん果実への処理

各標識体のみかん樹各 1 本/鉢を供試し、各樹につき同様の大きさの果実 2 個ずつに処理を行った。

各標識 D2341 のアセトリル溶液を調製し、みかん果実の上部表面にマイクロシジにて処理した。処理量を以下に示した。

; 90.9 μg /約 1,140,000dpm/100 μL アセトリル/10 cm^2 果実表面/個

; 93.2 μg /約 1,160,000dpm/100 μL アセトリル/10 cm^2 果実表面/個

みかん樹の栽培及び試料の採取

温室内の温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50%に設定し、毎日適量灌水してみかん樹を栽培した。

処理 14 日後に、各標識体を処理した果実 2 個ずつを採取し、分析に供した。

果実の分析

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

放射能の測定

抽出液は、乳化ソレナ-を加えて液体シンチレーションカウンター(LSC)にて放射能を測定した。抽出残渣は、燃焼法により処理後LSC測定した。TLCプレート上の放射能は、イメージングプレート法により検出した。

試験結果：

果実中放射能の分布

各標識 D2341 処理後 14 日目の果実における放射能分布を表 1 に示した。

表 1 及び 標識 D2341 処理 14 日後のみかん果実中放射能の分布
(原報告書 Table 2 より平均値を抜粋) (処理放射能に対する%)

表面洗浄(SR)		81.3	75.8
果皮	有機可溶画分(Org)	5.3	10.0
	水面分(Aq)	0.4	1.2
	小計(Ext)	5.7	11.2
	抽出残渣(Res)	3.8	6.7
	合計	9.5	17.9
果肉	80%アセトニリル(Ext)	<0.1	<0.1
	抽出残渣(Res)	<0.1	<0.1
	合計	<0.1	<0.1
回収		90.8	93.7

表面洗浄液中には、 で 81.3%、 で 75.8%が検出された。果皮中には、それぞれ 9.5%及び 17.9%が認められた。果肉から放射能は検出されなかった。

果実からの処理放射能に対する回収率は、 で 90.8%、 で 93.7%であった。

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

表面洗淨液及び果皮有機可溶画分中の代謝分解物比率を表 2 に示した。

表 2 及び D2341 処理 14 日後のみかん果実中代謝分解物比率
(原報告書 Table 3) (処理放射能に対する%)

代謝分解物	表面洗淨		果皮		合計	
D2341 (記号 A)	63.1	61.4	3.0	6.2	66.1	67.6
合計	81.3	75.8	5.3	10.0	86.6	85.8
水画分	-	-	0.4	1.2	0.4	1.2
抽出残渣	-	-	3.8	6.7	3.8	6.7
回収	81.3	75.8	9.5	17.9	90.8	93.7

* : TLC 上のその他の分解物

表面洗淨液及び果皮有機可溶画分中の主要化合物は親化合物 D2341 (A) であり、果実中放射能の 66-68% を占めた。代謝分解物として が検出されたがその比率は 以下であった。及び は、 以下であった。他の分解物も、 の分解物は検出されなかった。

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

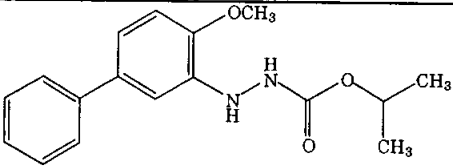
(3) オレンジにおける代謝試験

(資料 No. M-9)

試験機関 : Ricerca, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1998 年

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.2MBq/mg	

化学名 : Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物 : 4 回目の結実期を迎えるパレンシアオレンジ樹 (高さ約 3.5 フィート、樹冠直径約 3 フィート)

試験方法 :

被験物質の施用

被験物質は水和剤 (50WP) の剤型で製剤化し、茎葉散布によりオレンジ樹に散布した。ダニの活動期である早春 (1995 年 5 月 8 日) に 1 回処理を実施した。

2 本の果樹には予定圃場施用量である 0.375 ポンド/エーカー、1 本の果樹には過剰施用量である 2.0 ポンド/エーカー (5.3 倍) で施用した。1 本の樹は未処理 (対照区) とした。

各果樹への被験物質施用量を以下に示した。

	果樹 1 (0.375 ポンド/エーカー)	果樹 2 (0.375 ポンド/エーカー)	果樹 3 (2.0 ポンド/エーカー)
施用 mg 数	55.58	55.58	303.36
施用 MBq 数	63.42	63.42	346.06

申請者注) 0.375 ポンド/エーカーは 420 g ai/ha、2.0 ポンド/エーカーは 2240 g ai/ha に相当する。

日本でのかんきつへの申請散布量は、267~1400g ai/ha である。

施用 MBq 数は、原報告書の施用 mCi 数より申請者が換算した。

試料の採取

成熟果実 : 収穫日を以下に示した。加工処理しない果実は分析まで -5°C 以下で保存した。

処理 43 日後、184 日後、274 日後、442 日後

葉 : 葉試料は、0 時点及び成熟果実を収穫した時点 (274 日後を除く) に採取した。

0 時点の葉試料は、被験物質の施用を立証することを目的として採取した。

成熟果実の加工処理

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

成熟レジの分析

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

葉の分析

代謝物の同定あるいは特徴付け

試料の保存条件及び安定性

被験物質の溶液と葉及び果実試料は全て-5℃以下の冷凍庫中で保存した。試料は全て収穫後 30 日以内に抽出し、分析した。

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

試験結果：

1) 成熟レヅジ 中の総放射性残留物 (TRR)

成熟レヅジ 果実の表面洗浄液、ジュース、果肉及び果皮画分の TRR 値とそれらの総計で求めた全果実の TRR 値を表 1 に示した。

通常施用量である 0.375 ポンド/エーカーで処理後 43 日に収穫した成熟果実中 TRR は 0.353ppm であった。処理 184、274 及び 442 日後にはそれぞれ 0.096ppm、0.095ppm 及び 0.013ppm に減少した。2.0 ポンド/エーカー (5.3 倍) 処理の場合も TRR の同様な減衰が認められた。

表 1 成熟レヅジ 果実の放射性残留物

0.375 ポンド/エーカー (原報告書 Table I 及び II より抜粋)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR、2 本の果樹の平均

	43 日後	184 日後	274 日後	442 日後
表面洗浄液	0.275 (77.8)	0.042 (43.0)	0.021 (22.1)	0.001 (7.6)
果皮(抽出液+抽出残渣)	0.070 (20.2)	0.050 (52.0)	0.068 (71.0)	0.009 (66.8)
果肉(抽出液+抽出残渣)	0.003 (0.9)	0.002 (2.0)	0.004 (3.7)	0.002 (14.8)
ジュース(抽出液+抽出残渣)	0.005 (1.2)	0.003 (3.1)	0.003 (3.2)	0.001 (10.8)
全果実	0.353 (100)	0.096 (100)	0.095 (100)	0.013 (100)

2.0 ポンド/エーカー (原報告書 Table III より抜粋)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR

	43 日後	274 日後	442 日後
表面洗浄液	1.182 (80.6)	0.020 (24.5)	0.004 (12.2)
果皮(抽出液+抽出残渣)	0.259 (17.7)	0.045 (55.9)	0.020 (61.9)
果肉(抽出液+抽出残渣)	0.013 (0.9)	0.010 (12.8)	0.005 (15.5)
ジュース(抽出液+抽出残渣)	0.012 (0.8)	0.005 (6.8)	0.003 (10.4)
全果実	1.466 (100)	0.081 (100)	0.032 (100)

表面洗浄を行わずにホゲナイスした全レヅジ 果実中の総放射性残留物も測定し、代表的試料 (1995 年 6 月収穫、処理 43 日後) について得られたデータを表 2 に示した。

全果実の平均の TRR 値は、表 1 に示した結果 (各画分の合計で算出した TRR 値) とよく一致した。残留レベルの変動は、サンプルサイズや果実に到達した散布量が様々であったことに起因すると考えられる。

表 2 成熟レヅジ 果実の放射性残留物、全果実分析 (原報告書 47 頁)

数値は ppm eq.

	果樹 1 0.375 ポンド/エーカー	果樹 3 2.0 ポンド/エーカー
反復 1 ^a	0.284	1.045
反復 2 ^a	0.400	1.887
平均	0.342	1.466

^aそれぞれの反復試料について 2 個のレヅジ を 1 セットとしてホゲナイス

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

2) 葉試料中の総放射性残留物 (TRR)

処理後 0、43 及び 184 日収穫の葉試料中の総放射性残留物 (TRR) レベルを測定し、データを表 3 に示した。

表 3 葉試料中の放射性残留物 (原報告書 47 頁)

数値は ppm eq.

収穫日(処理後日数)	0.375 ポイント/エーカー ^a	2.0 ポイント/エーカー
1995/ 5/ 8 (0)	27.6 ^a	110.3
1995/ 6/20 (43)	20.6 ^b	89.5
1995/11/ 8 (184)	5.4 ^b	23.9

^a2 本の果樹のフル試料

^b2 本の果樹についての平均値

3) 成熟オレンジ中の放射性残留物の分布

成熟オレンジ中の D2341 の濃度及び%TRR を表 4 に示した。

成熟オレンジ中の D2341 の比率は、通常施用量では処理 43 日後試料における 75.1% (0.266ppm) から、処理 442 日後収穫試料では 9.2% (0.001ppm) に減少した。

極性画分は、通常施用量処理 43 日後に収穫した成熟オレンジ中の TRR の約 8% (5.3 倍施用量処理の成熟果実では約 6%) から処理 274 日後試料の 40%までを占めていた。極性画分中の各成分は TRR の 1% (0.005ppm; 通常施用量) 未満であり、酸、塩基又は酵素加水分解後において単一の主要残留物は認められなかった。

表 4 成熟オレンジ中の D2341、及び極性画分 (原報告書 Table II 及び III より抜粋)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR

処理量	0.375 ポイント/エーカー				2.0 ポイント/エーカー			
	処理後日数	43 日後	184 日後	274 日後	442 日後	43 日後	274 日後	442 日後
D2341 (記号 A)	0.266(75.1)	0.035(36.7)	0.015(15.3)	0.001(9.2)	1.161(79.2)	NA	NA	
極性画分 ^a	0.028(7.9)	0.024(25.7)	0.038(39.5)	0.005(39.5)	0.086(5.9)	NA	NA	

NA: 分析せず

^a 溶媒先端近く (Rt は 2~5 分) の幅広い区域に溶出した HPLC 領域

いずれの施用量でも、処理 43 日後試料は最も高濃度の放射性残留物を含有しており、成熟オレンジ中の残留物分布を代表するものとして分析し、それらの HPLC 分析結果を表 5 に示した。

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

表 5 処理 43 日後成熟レヅ¹中の放射性残留物 (原報告書 Table IV 及び V)

0.375 ポンド / エカ-

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR、2本の果樹の平均

	表面洗浄	果皮	果肉	ジュース	全果実
アセトリル抽出画分	0.275(77.8)	0.040(11.5)	0.002(0.5)	0.004(1.0)	0.321(90.8)
50%アセトリル抽出画分	NA	0.008(2.4)	0.001(0.2)	NA	0.009(2.6)
抽出画分合計	0.275(77.8)	0.048(13.9)	0.003(0.7)	0.004(1.0)	0.330(93.3)
D2341 (記号 A)	0.259(73.2)	0.004(1.0)	0.001(0.2)	0.003(0.7)	0.266(75.1)
残留物合計	0.275(77.8)	0.070(20.2)	0.003(0.9)	0.005(1.2)	0.353(100)

2.0 ポンド / エカ-

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR

	表面洗浄	果皮	果肉	ジュース	全果実
アセトリル抽出画分	1.182(80.6)	0.147(10.0)	0.006(0.4)	0.009(0.6)	1.343(91.6)
50%アセトリル抽出画分	NA	0.038(2.6)	0.003(0.2)	NA	0.041(2.8)
抽出画分合計	1.182(80.6)	0.185(12.6)	0.009(0.6)	0.009(0.6)	1.384(94.4)
D2341 (記号 A)	1.121(76.5)	0.037(2.5)	0.001(0.1)	0.001(0.1)	1.161(79.2)
残留物合計	1.182(80.6)	0.259(17.7)	0.013(0.9)	0.012(0.8)	1.466(100)

NA : 該当なし、BD : 検出限界 (0.001ppm) 以下

¹ 溶媒先端近く (Rt は 2~5 分) の幅広い区域に溶出した HPLC 領域

6) 保存中試料の安定性

-5℃以下で保存した試料の安定性を評価するために、約 14 ヶ月間保存していた 6 月収穫の代表的なジュース、果肉及び果皮試料を抽出し、試料分析の方法に従って分析した。それらの HPLC パターンから、凍結保存条件下では D2341 残留物がレヅ¹中で安定であることが示された。

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

7) レンジ 試料からの抽出効率

対照区のジュース、果肉及び果皮試料に D2341 を添加して抽出手順中における安定性を証明した。ジュースと果肉試料には 0.9ppm で添加し、果皮には 0.8ppm で添加した。試料分析の方法により、ジュース、果肉及び果皮試料中の放射能の 99%以上が抽出され、91%以上が D2341 であった。すなわち、これらの抽出条件下では、D2341 の分解は少ないことが示された。

8) 想定代謝経路

図 D2341 のレンジ における想定代謝経路 (原報告書 Figure28)

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

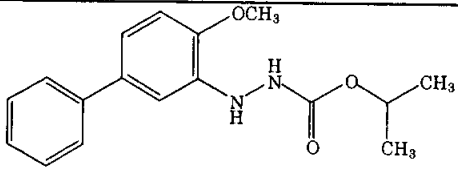
(4) りんごにおける代謝試験

(資料 No. M-10)

試験機関 : Ricerca, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1998 年

供試標識化合物 : 以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.2MBq/mg	

化学名 : Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物 : Granny Smith 種りんご樹、1987 年に移植され果樹園で栽培された樹

試験方法 :

被験物質の施用

被験物質は水和剤 (50WP) の剤型で製剤化し、茎葉散布によりりんご樹に散布した。ダコこの活動期である晩春 (1996 年 6 月 21 日) に 1 回処理を実施した。

2 本のりんご樹には予定圃場施用量である 0.375 ポンド / エーカー、1 本の果樹には過剰施用量である 2.0 ポンド / エーカー (5.3 倍) で施用した。1 本の樹は未処理 (対照区) とした。

製剤化した被験物質の実際の施用量を以下に示した。

	果樹 2 (0.375 ポンド / エーカー)	果樹 3 (0.375 ポンド / エーカー)	果樹 4 (2.0 ポンド / エーカー)
施用 mg 数	41.8	42.6	210.7
施用 MBq 数	60.53	61.64	304.92

申請者注) 0.375 ポンド / エーカーは 420 g ai/ha、2.0 ポンド / エーカーは 2240 g ai/ha に相当する。

日本でのりんごへの申請散布量は、267~1400g ai/ha である。

施用放射能は原報告書には mCi で表記されている。申請者が MBq に換算した。

試料の採取

自然の成熟期 (処理 101 日後、1996 年 9 月 30 日) にりんごを採取した。

未成熟果実試料を処理 31 日後に採取した。0 時点と収穫期には葉も採取した。

りんごの加工処理 (成熟果実)

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

果樹3 (0.375ポンド/エーカー) と果樹4 (2.0ポンド/エーカー) の2個の成熟果実2セットを、それぞれ表面洗浄せずに分析した。凍結したりんごを小片に切断し、ブレンダーを用いて磨砕し、セルゲイナイズした。

成熟りんご (画分) の分析

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

代謝物の同定あるいは特徴付け

試料の保存条件及び安定性

被験物質の溶液と葉及び果実試料は全て-5℃以下の冷凍庫中で保存した。試料は全て収穫後 30 日以内に抽出し、分析した。

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

試験結果：

1) 成熟りんご中の総放射性残留物 (TRR)

成熟果実の表面洗浄液、ジュース及び絞るかす画分の TRR 値とそれらの総計で求めた全果実の TRR 値を表 1 に示した。

全果実の TRR は 0.375 ポント/エカ-処理で、0.08~0.09ppm、2.0 ポント/エカ-処理で 0.37ppm であった。

表 1 処理 101 日後成熟りんご果実の放射性残留物 (原報告書 Table I より抜粋)

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR

	0.375 ポント/エカ-		2.0 ポント/エカ-
	果樹 2	果樹 3	果樹 4
表面洗浄液	0.042 (49.7)	0.054 (59.9)	0.244 (65.5)
絞るかす(抽出液+抽出残渣)	0.034 (40.2)	0.027 (29.6)	0.096 (25.7)
ジュース	0.008 (10.1)	0.010 (10.6)	0.033 (8.9)
全果実	0.084 (100)	0.091 (100)	0.373 (100)

表面洗浄を行わずにトゲナイスした全果実中の総放射性残留物濃度を表 2 に示した。

トゲナイスした全果実の平均の TRR 値は、表 1 の結果 (各画分の合計で算出した TRR 値) とよく一致した。

表 2 成熟りんご果実の放射性残留物、全果実分析 (原報告書 52 頁)

数値は ppm eq.

	果樹 3 0.375 ポント/エカ-	果樹 4 2.0 ポント/エカ-
反復 1 ^a	0.072	0.305
反復 2 ^a	0.084	0.331
平均	0.078	0.318

^aそれぞれの反復試料について 2 個のりんごを 1 セットとしてトゲナイス

2) 葉試料中の総放射性残留物 (TRR)

処理後 0 及び 101 日収穫の葉試料中の総放射性残留物 (TRR) レベルを測定し、データを表 3 に示した。

表 3 葉試料中の放射性残留物 (原報告書 52 頁)

数値は ppm eq.

収穫日(処理後日数)	0.375 ポント/エカ- ^a	2.0 ポント/エカ-
1996/ 6/21 (0)	60.0	310.5
1996/ 9/30 (101)	9.3	70.8

^a2 本の果樹についての平均値

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

3) 成熟りんご中の放射性残留物の分布

成熟りんご中の放射性残留物の濃度及び%TRRを表4に示した。

成熟りんご中のD2341(記号A)の比率は、通常施用ではTRRの33.6%(0.030ppm)、5.3倍施用ではTRRの46.9%(0.175ppm)であった。成熟果実中5%TRRを超えた代謝物はのみであった。

可溶化画分中には多数の微量成分が存在していた。

10%TRRを越えた2~8.5分の極性画分領域は改良HPLC法により多数の微量成分に分離され、各成分は0.008ppm以下であると推定された。酸、塩基及び酵素加水分解によっても変化は認められなかった。

表4 成熟りんご中の放射性残留物濃度(原報告書Table II及びIII)

0.375ポンド/エーカー 数値はppm eq.、カッコ内は%TRR、2本の果樹の平均

	表面洗浄	絞るかす	ジュース	全果実
アセトリル抽出画分	0.049(54.8)	0.008(9.2)	0.009(10.4)	0.065(74.3)
50%アセトリル抽出画分	NA	0.006(6.8)	NA	0.006(6.8)
抽出画分合計	0.049(54.8)	0.014(16.0)	0.009(10.4)	0.071(81.1)
D2341(記号A) ^a	0.029(33.0)	0.001(0.6)	<0.001(0.1)	0.030(33.6)
残留物合計	0.049(54.8)	0.031(34.9)	0.009(10.4)	0.088(100)

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

2.0 ポンド/エ-カ-

数値は ppm eq.、カッコ内は%TRR

	表面洗浄	絞るかす	ジュース	全果実
アセトリル抽出画分	0.244(65.5)	0.025(6.7)	0.033(8.9)	0.303(81.1)
50%アセトリル抽出画分	NA	0.013(3.6)	NA	0.013(3.6)
抽出画分合計	0.244(65.5)	0.038(10.3)	0.033(8.9)	0.316(84.7)
D2341 (記号 A) ^e	0.173(46.5)	0.001(0.4)	< 0.001(<0.1)	0.175(46.9)
残留物合計	0.244(65.5)	0.096(25.7)	0.033(8.9)	0.373(100)

NA : 該当なし

^eMS 及び HPLC データより確認 (過量処理試料より分離)

^eMS 及び HPLC データより確認、 は 19.5~25 分領域に溶出

抽出不能残渣の特徴付け :

塩基処理により 5.3 倍施用の成熟果実の絞るかす (PES) 中放射能の大部分 (約 71%、10.0% TRR) が遊離された。塩基で遊離された放射能の約 83% (8.4% TRR) が酢酸エチルに分配された。この HPLC クロマトグラムから、残留濃度が 0.005ppm を超える単一の放射能領域はなかった。

この分析により、りんご中の抽出不能残留物は、D2341 の広範な代謝及び植物体構成成分との結合の結果によるものであることが示唆された。

4) 保存中試料の安定性

-5℃以下で保存した試料の安定性を評価するために、約 6 ヶ月間保存していた成熟りんごの代表的なジュース及び絞るかす試料を抽出し、試料分析の方法にしたがって分析した。それらの HPLC パターンから、凍結保存条件下では D2341 残留物がりんご媒体中で安定であることが示された。

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

5) りんご試料からの抽出効率

対照区のジュース及び絞るかす試料に D2341 を添加し (0.1ppm)、抽出手順中における安定性を証明した。

絞るかす試料中の放射能の 99%以上が抽出され、添加放射能の 95%以上が D2341 であった。

ジュース試料は、添加放射能の 98%以上が D2341 として回収されたが、ジュース中に施用した D2341 の約 72%が に変換されていた。

6) 想定代謝経路

図 D2341 のりんごにおける想定代謝経路 (原報告書 Figure31)

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

(5) なす幼植物における代謝試験

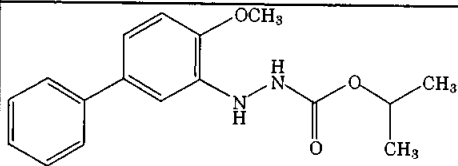
(資料 No. M-11)

試験機関：日産化学工業(株)

報告書作成年：2004 年

目的) 本試験は、なす幼植物の葉における D2341 の代謝及び代謝経路を確認することを目的として実施した。

供試標識化合物：以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名：Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物：なす (*Solanum melongena* L.、千両 2 号)

a/5000 ㏍^o ㏍^o に播種し、6 葉期 (高さ 16~19cm) まで栽培した (3 植物体)。光源は太陽光とメラライト^o ランプ^o を併用した。

試験方法：

D2341 処理液の調製及び処理

D2341 濃度 200ppm のアセトリル溶液を調製し、100 μL をマイクロシリンジにて第 4 葉の表側に処理した。200ppm は 20%水和剤を 1000 倍希釈した時の濃度として設定した。

試料の採取

D2341 処理 3、7 及び 14 日後に、それぞれの土壌を除去し、植物体を処理葉、処理葉より上部、処理葉より下部及び根部の 4 つに分け、生重量を測定した後、分析に供した。

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

試料の分析

試験結果：

D2341 処理 3、7 及び 14 日後の処理葉、処理葉より上部、処理葉より下部及び根部の放射能 (%TRR) と D2341 換算濃度を表 1 に示した。

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

表1 D2341 を葉面処理した植物体中放射能分布と濃度 (原報告書 表3より)

植物体	画分/代謝物	処理後の経過日数						
		3		7		14		
		%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	
処理葉	表面洗浄画分 D2341	90.06	6.201	80.34	3.687	71.71	3.000	
		35.71	2.459	17.69	0.812	11.73	0.491	
	80%アセトニトリル抽出液 酢酸エチル画分 D2341	5.46	0.376	10.18	0.467	15.53	0.650	
		3.83	0.263	7.36	0.338	9.58	0.401	
		0.29	0.020	0.49	0.023	0.30	0.013	
	水面分 残渣	1.63	0.112	2.82	0.129	5.95	0.249	
		4.19	0.288	8.73	0.401	11.73	0.491	
	処理葉合計		99.71	6.865	99.25	4.555	98.97	4.141
	処理葉 上 部	抽出液	<0.14	<0.006	0.26	0.004	0.59	0.003
		残渣	0.03	0.001	0.14	0.002	0.22	0.001
処理葉 下 部	抽出液	<0.14	<0.004	0.19	0.004	<0.17	<0.003	
	残渣	0.12	0.003	0.06	0.001	0.09	0.002	
根 部	抽出液	<0.14	<0.003	<0.15	<0.002	<0.17	<0.002	
	残渣	0.14	0.003	0.11	0.001	0.14	0.001	
処理葉以外の合計		0.29	0.007	0.76	0.012	1.04	0.007	
合計		100.00	0.813	100.00	0.430	100.00	0.270	

その他は多くの10%TRR未満のマイナ-代謝物よりなる。

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

表 2 D2341 を処理した処理葉中代謝物のまとめ (原報告書 表 4 より)

代謝物	処理後の経過日数					
	3		7		14	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm
D2341 (記号A)	36.00	2.479	18.18	0.835	12.03	0.504

1) なす植物体中放射能分布

D2341 を葉に処理した場合、処理 14 日までに放射能はその葉の表面洗浄画分から 70%TRR 以上検出され、抽出画分は 16%TRR 未満であった。水画分及び残渣中の放射能は、処理 14 日後でそれぞれ 5.95%TRR 及び 11.73%TRR であった。

処理葉以外へ移行した放射能は 1.04%TRR 以下であり、処理葉からそれ以外の植物体へ移行する D2341 及びその代謝物の量は極めて少ないと考えられた。

2) 代謝物

処理葉の表面洗浄画分及び酢酸¹⁴C画分で検出された主な化合物は未変化体の D2341 (記号 A) であり、処理 14 日後で 12.03%TRR (0.504ppm) であった。代謝物として

少なくとも 8 種類の未知代謝物が検出されたが、D2341 以外は全て 1%TRR 未満であった (表 4)。

以下に推定代謝経路を示した。

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

⌒

(-

D2341 のなす幼植物における推定代謝経路

(6) 土壌処理後のなすへの吸収、移行及び代謝

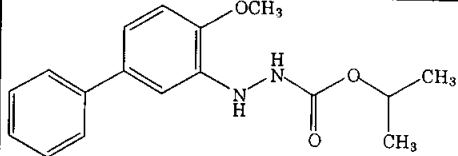
(資料 No. M-12)

試験機関：日産化学工業(株)

報告書作成年：1999年

目的) 本試験は、散布後土壌表面に落下した D2341 の植物への吸収、移行及び代謝を調査することを目的として実施した。温室において比較的簡便に栽培可能な植物として選択した。

供試標識化合物：以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名：Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試植物：なす (*Solanum melongena* L.、千両2号)

a/5000 ヲツ 鉢に苗1本を移植し、果実、つぼみ及び花着生期まで栽培した。地上部高71~75cmの植物体2本(2鉢)を供試した。

灌水は毎日土壌に0.3Lずつ行い、光源は太陽光とメタハラランプを併用した。

供試土壌：日産化学工業(株)生物科学研究所内試験用土壌(埼玉県南埼玉郡白岡町)を用いた。

下表に土性を示した(原報告書12ページ)

土性(国際法)	重植土
砂含量 (%)	18.8
シルト含量 (%)	32.5
粘土含量 (%)	48.7
有機炭素含量 (%)	1.87
pH (H ₂ O) 25℃	6.1
陽イオン交換容量 (meq./100g)	29.6
リン酸吸収係数 (P ₂ O ₅ mg/100g)	2510

土壌には千代田化成特550(N:P:K=15:15:10)を土壌1kgあたり1g、過燐酸石灰(20%)を土壌1kgあたり20g混和した。

試験方法：

D2341 処理液の調製及び処理

試料の採取

D2341 処理 7、14 及び 21 日後に、それぞれのポットより果実 1 個ずつを採取した。最終試料採取時点である処理 28 日後には、植物体地上部を採取し、果実、花、葉及び茎に分けた。果実はへたと果実に分け、速やかに生重量を測定し、採取当日に分析した。花、葉及び茎は生重量を測定した後、分析まで-20℃の冷凍庫に保存した。

根（処理 28 日後）は、土壌を除去し、分析まで風乾した。土壌は、全重量を測定後均一に混和し、-20℃の冷凍庫に保存した。

試料の分析

試料の分析⁷⁰⁻を以下に示した。

試験結果：

1) なす及び土壌中放射能

D2341 土壌処理 7、14 及び 21 日後の果実、処理 28 日後の果実、へた、花、葉、茎、根及び土壌中放射能と D2341 換算濃度を表 1 に示した。

果実中放射能濃度 (TRR) は、5.3~8.3ppb であり 10ppb 未満の低濃度であった。

処理 28 日後の葉及び茎には、ともに 52ppb 濃度が残留した。

なすにより吸収された放射能 (地上部と根中放射能の合値) は処理放射能の 4.40%、又、地上部へ移行した放射能は 0.47% (7、14、21 日後の果実+28 日後の果実、へた、花、葉及び茎の合計) であり、なす根からの土壌中 D2341 及びその代謝物の吸収は少なく、根から地上部への移行も少ないことが示された。

処理 28 日後での物質収支は、処理放射能の 76.57%であった。これは、土壌中で生成した揮発性代謝物 (二酸化炭素) が試験系外へ揮散したためと考えられた。

表 1 D2341 土壌処理後のなす及び土壌中放射能と濃度 (原報告書 表 2 より抜粋)

数値は 2 ポットの平均

処理後日数	試料部位	D2341 換算濃度 (ppb)	処理放射能に対する%
7	果実	5.6	0.01
14	果実	7.7	0.02
21	果実	8.3	0.02
28	果実	5.3	0.01
	へた	NC	<0.01
	花	12.9	0.01
	葉	52.0	0.23
	茎	52.3	0.17
	根	NC	3.93
	土壌	NC	72.17
	小計	NC	76.52
合計		NC	76.57

NC : 未算出

2) 代謝物

2-1) 果実

果実の各抽出画分及び抽出残渣の放射能比率 (%TRR) とその濃度 (ppb) を表 2 に示した。80%アセトニール抽出画分は果実中放射能の 46.1~55.7%であった。80%アセトニール抽出液及び抽出残渣中放射能濃度は、2.4~4.2ppb と低かった。

80%アセトニール抽出液中放射能の多くが水面分に存在した。有機画分中放射能濃度は 1ppb 以下であったが、TLC 分析を試みた。その結果、原点部にわずかな黒化が認められる程度であり、D2341 (記号 A) や 等の代謝物は検出されなかった (原報告書 図 1 及び 2)。

表2 なす果実中放射能の比率と濃度（原報告書 表3より抜粋）

数値は2ポットの平均

処理後日数	画分	D2341 換算濃度(ppb)	果実中放射能に対する%
7	80%アセトニトリル抽出液	3.1	55.7
	有機画分	0.5	9.9
	水画分	2.6	45.8
	抽出残渣	2.5	44.3
	合計	5.6	100.0
14	80%アセトニトリル抽出液	3.9	51.8
	有機画分	0.7	9.9
	水画分	3.2	41.9
	抽出残渣	3.8	48.2
	合計	7.7	100.0
21	80%アセトニトリル抽出液	4.2	50.2
	有機画分	0.6	7.2
	水画分	3.6	43.0
	抽出残渣	4.1	49.8
	合計	8.3	100.0
28	80%アセトニトリル抽出液	2.4	46.1
	有機画分	0.5	9.0
	水画分	2.0	37.1
	抽出残渣	2.9	53.9
	合計	5.3	100.0

2-2) 葉及び茎

葉及び茎の80%アセトニトリル抽出液有機画分、80%アセトニトリル抽出液水画分及び抽出残渣中放射能は、いずれも50ppb未満であった（原報告書 表4）。有機画分（7.6~18.2ppb）のTLC分析の結果、極性原点部に放射能が見られ、D2341、等の遊離代謝物は検出されなかった。

2-3) 土壌（処理28日後）

アセトニトリル抽出液中放射能は、平均で処理放射能の5.66%（土壌中放射能の7.8%）、アセトニトリル：塩酸抽出液中放射能は1.82%（2.6%）であり、両抽出液を合計しても土壌中放射能の10.4%でしかなかった（原報告書 表5）。アセトニトリル抽出液について2次元TLCによる定性を行った結果、代謝物としてD2341（記号A）、

が検出された（原報告書 図4）。

3) 吸収、移行及び代謝のまとめ

D2341を約100g a. i./10aで土壌に処理した場合、なす果実へ移行した放射能は処理放射能の0.02%以下であり、放射能濃度はD2341換算で8.3ppb以下であった。従って、土壌からなす果実へ吸収、移行されるD2341及びその代謝物の量は極めて少ないと考えられた。

植物代謝試験のまとめ (資料 No. M-7~M-12)

D2341 の適用作物である、かんきつ、果実、茶の作物残留分析成分を決定するため、温州みかん、レヅ (かんきつ)、りんごの3作物の果実と温州みかん及びなすの葉での植物代謝試験を実施した。温州みかんでは 及び D2341 の比較代謝試験を行った。根部吸収を調べるため、なすを用いて土壌処理後の吸収、移行性を調べた。試験方法の概要を表1に示した。

表1 D2341 植物代謝試験方法概要

作物	温州みかん	温州みかん	レヅ	りんご	なす	なす
資料 No.	M-7	M-8	M-9	M-10	M-11	M-12
供試標識体						
処理方法	水和剤果樹 散布	アセトリル溶液 果実塗布	水和剤果樹 散布	水和剤果樹 散布	アセトリル溶液 葉面処理	乳剤土壌 表面処理
処理量	420 g ai/ha	約 90µg/果実	420 g ai/ha 及び 2240 g ai/ha	420 g ai/ha 及び 2240 g ai/ha	20µg/葉	1000 g ai/ha
処理後 試料 採取日	0、28、56、84 日	14日	43、184、274、 442日	101日	3、7、14日	7、14、21、 28日
試料分析 部位	1) 果実表面洗 液、果皮、果 肉、全果実 2) 葉	果実表面洗液、 果皮、果肉	果実表面洗液、 果皮、果肉、ジュ -ス、全果実、 葉(TRRのみ)	果実表面洗液、 絞りかす、ジュ -ス、全果実	処理葉(表面 洗浄、抽出)、 処理葉上部、 処理葉下部、 根部	全果実

申請作物の実用処理量は、267~1400 g ai/ha の範囲であり、植物代謝試験では、420、1000 あるいは過剰量 2240 g ai/ha の処理量で実施された。国内での実用処理時期は、作物によって異なるが概ね収穫前6ヵ月~前日までとなっている。植物代謝試験の結果の概要を以下にまとめた。

(1) 果実及び葉における放射能分布

国内での処理時期を参考にして、420 g ai/ha で散布後の温州みかん 28 日後、レヅ 43 日後、りんご 101 日後の果実あるいは葉 (なす葉は処理濃度 200ppm として処理) における総放射性残留物濃度 (TRR) 及び各分画への分布比率 (%TRR) を表 2 に示した。尚、土壌処理したなすでは、果実分布率が処理放射能の 0.01% 及び TRR が 0.0053~0.0083ppm と低く、土壌からの吸収、移行性が殆ど認められなかったため表には加えなかった。

3 作物の果実に残留する放射能の多くは、表面洗液に分布した。果皮へ少量移行し、果肉あるいはジュースへの移行はさらに少なかった。葉においても同様であった。

温州みかん果実における 及び 処理後の放射能分布を表 3 に比較した。マバランス比較のため濃度ではなく処理放射能に対する%で表記した。

いずれの標識体とも表面洗液に約 80% が認められた。放射能は果肉からは検出されず、果皮にお

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

ける分布もほぼ類似した。回収率は 90.8-93.7%であった。

表 2 D2341 処理後の果実及び葉における放射能分布 (TRR : D2341 換算 ppm)

温州みかん(果実)		オレンジ(果実)		りんご(果実)		温州みかん(葉)		なす(葉)	
420 g ai/ha		420 g ai/ha		420 g ai/ha		420 g ai/ha		20 μ g/葉	
28 日後		43 日後		101 日後		28 日後		14 日後	
TRR=0.2982ppm		TRR=0.353ppm		TRR=0.088ppm		TRR=23.5091ppm		TRR=4.141ppm	
分画	%TRR	分画	%TRR	分画	%TRR	分画	%TRR	分画	%TRR
表面洗液	72.44	表面洗液	77.8	表面洗液	54.8	表面洗液	85.65	表面洗液	71.71
果皮	25.45	果皮	20.2	果実絞り かす	34.9	葉組織	14.35	葉組織	27.26
果肉	2.11	果肉(絞り かす)	0.9	ジューズ	10.4				
		ジューズ	0.2						
全果実	100.0	全果実	100.0	全果実	100.0	全葉	100.0	処理葉	98.97

表 3 及び D2341 処理 14 日後の温州みかん果実における放射能分布 (処理放射能に対する%)

表面洗液		81.3	75.8
果皮	有機可溶可溶画分	5.3	10.0
	水面分	0.4	1.2
	抽出残渣	3.8	6.7
	合計	9.5	17.9
果肉	80%アセトニール画分	<0.1	<0.1
	抽出残渣	<0.1	<0.1
	合計	<0.1	<0.1
回収		90.8	93.7

(2) 果実及び葉における代謝物

3 作物の果実及び 2 作物の葉の主要残留成分は、親化合物 D2341 (記号 A) であった。

温州みかん 28 日後、オレンジ 43 日後、りんご 101 日後、なす 14 日後の果実あるいは葉における各代謝物の比率 (%TRR) 及び濃度 (ppm、D2341 換算) を表 4 に示した。

温州みかん果実における 及び 標識体処理後の表面洗液及び果皮中代謝物比率を表 5 に示した。D2341(記号 A)が 66.1-67.6%を占め主要であった。その他の成分及び分画比率も 標識及び 標識において類似した。

表 4 D2341 処理の果実あるいは葉における代謝物の比率 (%TRR) 及び濃度 (ppm)

代謝物	温州みかん(果実)		オレンジ(果実)		りんご(果実)		温州みかん(葉)		なす(葉)	
	420 g ai/ha		420 g ai/ha		420 g ai/ha		420 g ai/ha		20µg/葉	
	28 日後		43 日後		101 日後		28 日後		14 日後	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm
D2341(記号 A)	72.51	0.2183	75.1	0.266	33.6	0.030	70.88	16.662	12.03	0.504

表 5 及び D2341 処理の温州みかん果実における代謝物の比率 (処理放射能に対する%)

	表面洗液		果皮		合計	
	標識	標識	標識	標識	標識	標識
D2341(記号 A)	63.1	61.4	3.0	6.2	66.1	67.6
合計	81.3	75.8	5.3	10.0	86.6	85.8

以上の結果、3 作物の果実及び 2 作物の葉における代謝は類似しており、主要残留成分は未変化体 D2341(記号 A)であった。共通代謝物については が 検出された以外は、各代謝物の残留は 以下と少なかった。また、 及び 標識体における代謝物の様相は類似した。

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

3. 土壌中運命に関する試験

(1) 好気土壌における代謝 (日本土壌)

(資料 No. M-13)

試験機関：(財)残留農薬研究所 (GLP 対応)

報告書作成年：1998 年

供試標識化合物：以下の ^{14}C 標識化合物を供試した。

名称	構造式	比放射能	放射化学的純度
D2341		4.1MBq/mg	

化学名：Isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

供試土壌：静岡県柑橘試験場（静岡県清水市）の土壌を試験に供した（以降、静岡土壌と称する）。土壌は使用前に 5mm の篩に通し、供試時まで 5℃ の暗所に保存した。供試土壌の物理化学的性質を以下に示した（原報告書 Table3）。

土性	軽埴土
粘土含量* (%)	40.3
主要粘土鉱物	ハ ⁺ -ミクライト、モンモリロナイト
pH(H ₂ O)	5.4
pH(KCl)	4.0
有機炭素 (%)	0.49
陽イオン交換容量 (meq./100g)	23.3
リン酸吸収係数 (P ₂ O ₅ mg/100g)	1050
最大容水量 (%)	63.31

*ISSA 法による分類

試験方法：

試験設計

本試験は、2 種類のグループ（非滅菌土壌実験、滅菌土壌実験）で構成した。その概要を以下に示した。

	試験内容
非滅菌土壌実験	土壌中の放射性残留物の分析 放射性気体の捕集・分析と ^{14}C -バランスの調査
滅菌土壌実験	土壌中の放射性残留物の分析 放射性気体の捕集・分析と ^{14}C -バランスの調査

培養条件及び処理方法

供試土壌 50g（乾土換算）を 100mL 容のガラス製ビーカー-或いは 200mL 容のガラス瓶に秤量し、土壌水分を最大容水量の 40% に調整した。アルミホイルで蓋をし、25±1℃ の暗所条件のインキュベーター

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

中で7日間¹⁴Cインキュベーションした。なお、滅菌土壌実験用の土壌は、¹⁴Cインキュベーション5日目にオートクレーブ滅菌(120℃、+1kg/cm²、20分)を行った。この操作を約24時間毎に2回繰り返した。¹⁴Cインキュベーション後、D2341 7セトトリル溶液(約200ppm)を100μL土壌表面に滴下し、よく混和した。達成施用濃度*は、非滅菌土壌で0.405ppm又は0.419ppm、滅菌土壌で0.401ppm又は0.396ppm(いずれも乾土換算)であった。

* 目標添加濃度は乾土当たり0.4mg/kg(ppm)とした。これは、D2341の予定慣行施用量(42g a. i./10a)を散布した際に、D2341が土壌の表層10cmに均一に分布すると仮定した場合の土壌中濃度に相当する。

申請者注) 原報告書では、予定慣行施用量420g a. i./10aとなっているが、42g a. i./10aの誤りである。尚、その後予定施用量は120g a. i./10aに変更されている。

施用後の土壌容器(施用後短時間で分析した一部の試料は除く)は、発生する放射性気体を捕集するために代謝チャンバ(容量約21L、ねじロケータ)に収納した。代謝チャンバから排出された空気は、下記の捕集管に順次導入した。

1. エチレングリコール/200mL: 揮発性有機物質捕集用
 2. 1M水酸化ナトリウム(0.1%フェノールフタレイン指示薬含有)/50mL: 炭酸ガス捕集用
 3. 1M水酸化ナトリウム(0.1%フェノールフタレイン指示薬含有)/50mL: 炭酸ガス捕集用(バックアップ)
- 土壌容器を入れた代謝チャンバは、25℃の暗所条件下の土壌インキュベーター内に収納した。

試料採取

以下に示す時点で2点の土壌試料を採取した。

実験区	採取時点
非滅菌土壌	0(施用直後)、0.5、2、6時間及び1、3、7、14、28日後 又、1、3、7、14、21、28日後に揮発性物質捕集液の測定を行った。
滅菌土壌	0(施用直後)、0.5時間及び1、7、14日後 又、7、14日後に揮発性物質捕集液の測定を行った。

試料の分析

1) 抽出液中に添加する安定化剤

試料中に存在するD2341を安定的に分析し、回収するため、非放射性D2341を抽出液中に400ppm程度の濃度で添加した。なお、の添加回収実験において、の一部(約20%)は¹⁴C-D2341に変換した。

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

2) 土壌試料の分析

土壌試料の分析⁷⁰⁻を以下に示した（原報告書 Figure3~5）。

代謝物は、HPLCでの標品との保持時間の比較（又は共注入）及びTLCコマトグラフィーにて同定した。又、主要放射性成分について質量スペクトル分析を行った。以下に、HPLC及びTLC条件を示した。

HPLC 条件：

TLC 条件：

3) 揮発性物質捕集液の分析

捕集管中の1M水酸化ナトリウム溶液及びエリク⁷¹⁻リコールはその一部を採取してLSC分析し、放射能を測定した。

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

試験結果：

1) 非滅菌土壌中での代謝分解

¹⁴C-バランスの結果を表1に示した。

土壌中の放射能は、0時点では定量的にアセトニトリル抽出液中に回収された。アセトニトリルに抽出される放射能はその後経時的に減少し、施用28日後には施用量の約10%になった。アセトニトリル：塩酸で抽出される放射エネルギーは全体的に少なかった（最高で6時間後の8.1%）。抽出液中に回収される放射能の減少に伴い、抽出残渣中の放射能が増加し、施用28日後には施用量の72.8%となった。

土壌から発生する放射性気体について、炭酸ガスとして約17%が施用28日後までに検出された。有機性の放射性気体については検出されなかった。

各分析時点における放射能の回収率は、施用量の97.7%~105.3%の範囲であった。

表1 非滅菌土壌中での放射能の回収（原報告書 Table 5）

数値は施用放射能に対する%（2連の平均値）、カッコ内は濃度（mg eq./kg 乾土）

	0 時点	0.5 時間	2 時間	6 時間	1 日	3 日	7 日	14 日	21 日	28 日
放射性気体(累積)	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	1.09	6.30	11.14	14.32	15.94	17.07
1M NaOH トラップ	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	1.09	6.30	11.14	14.32	15.94	17.07
エフレンジー リコ-ルトラップ	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
土壌	99.76 (0.4175)	100.17 (0.4192)	98.62 (0.4127)	97.72 (0.4089)	99.20 (0.4014)	96.55 (0.3907)	88.36 (0.3576)	90.93 (0.3680)	N. A.	86.36 (0.3495)
抽出画分	99.61	97.99	93.06	79.43	63.76	31.26	24.60	18.11	N. A.	13.57
アセトニトリル抽出	98.08	95.79	90.90	71.34	57.42	27.01	20.98	14.95	N. A.	10.36
アセトニトリル：塩酸抽出	1.52	2.20	2.17	8.09	6.34	4.25	3.62	3.16	N. A.	3.21
抽出残渣	0.15	2.18	5.56	18.29	35.44	65.29	63.76	72.82	N. A.	72.79
放射性気体+土壌	99.76	100.17	98.62	97.72	100.29	102.86	99.50	105.25	N. A.	103.42

N. A. ; 分析せず N. D. ; 検出せず

土壌抽出液中の放射性成分の分析

土壌のアセトニトリル抽出液とアセトニトリル：塩酸抽出液（SPE-メタノール溶出液）の分析結果から求めた各分析時点での土壌中の主要放射性成分の残留レベルを表2に示した。

アセトニトリル抽出液の HPLC ラジオクロマトグラムからは、主要放射性成分として D2341（記号 A）、

の7化合物が検出された。アセトニトリル：塩酸抽出液

（SPE-メタノール溶出液）の HPLC ラジオクロマトグラムからは、6時間後ではアセトニトリル抽出液のそれと類似していたが、1日以降では が主放射性成分であった。

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

表 2 非滅菌土壌における抽出液中の代謝物比率 (原報告書 Table9)

施用放射能に対する%、カッコ内は濃度 (mg eq./kg 乾土)

		0 時点	0.5 時間	2 時間	6 時間	1 日	3 日	7 日	14 日	28 日
同定、 特徴付けされた代謝物	D2341 (記号 A)	85.03 (0.3559)	8.37 (0.0350)	4.82 (0.0202)	3.92 (0.0164)	3.08 (0.0125)	1.11 (0.0045)	0.93 (0.0038)	0.92 (0.0037)	0.56 (0.0023)
未 同定代謝物										

N. A. : 分析せず

D2341 (記号 A) の分解速度は極めて速く、0 時点では施用量の 85.0%であったが、0.5 時間後には 8.4%に減少した。分解が急速であるため、その半減期を求めることができなかった。D2341 の分解に伴って が急速に増加し、0 時点の から 0.5 時間後には最高バルの に達した。 はそれ以降速やかに減少し、28 日後には となった。

表 3 に主要放射性成分の見かけ上の DT_{50} と DT_{90} を示した。又、図 1 に D2341 及び主要放射性成分の推移を示した。

表 3 非滅菌土壌中での主要放射性成分の見かけ上の DT_{50} と DT_{90}

	D2341+ (0-24 時間)*		
DT_{50}	8.6 時間		
DT_{90}	28.6 時間		

*1 次減衰式を適合した時間範囲

図1 非滅菌土壌における D2341 及び主要分解物の推移 (原報告書 Figure10)

施用 28 日後の非滅菌土壌の抽出残渣 (施用量の約 73% を含む) について、ソックスレ-抽出 (溶媒はアセトニトリル: 塩酸) を行った結果、施用量の 3.2% が抽出された。その主要成分は
 であった。ソックスレ-抽出後の残渣の腐植抽出法による分画化では、放射能の多くがヒュ-ミン画分に分布し (施用量の 35.6%)、腐植酸とフルボ酸画分からも有意な放射能 (それぞれ施用量の 5.4%、13.6%) が検出された。

2) 滅菌土壌中での代謝分解

乾土当たり 0.4mg/kg の D2341 を施用した滅菌土壌中での放射性残留物の抽出結果、放射性気体の捕集液の分析結果と、それらから求めた ^{14}C -バランスを表 4 に示した。

土壌中の放射能は、0 時点ではほぼ定量的にアセトニトリル抽出液中に回収された。アセトニトリルに抽出される放射能はその後経時的に減少したがその速度は非滅菌土壌に比べて遅く、施用 14 日後には施用量の約 62% が残留した。アセトニトリル: 塩酸で抽出される放射エネルギーは全体的に少なかった (最高で 1 日後の 5.7%)。抽出液中に回収される放射能の減少に伴い、抽出残渣中の放射能が増加したが、施用 14 日後でも施用量の約 34% であり、非滅菌土壌の 1/2 未満であった。

土壌から発生する放射性気体について、1M 水酸化ナトリウムとエフレング リコ-ル捕集液のいずれからも放射能は検出されなかった。

各分析時点における ^{14}C -バランスは、施用量の 96.9%~101.6% の範囲であった。

表 4 滅菌土壌中での放射能の回収 (原報告書 Table 10)

数値は施用放射能に対する % (2 連の平均値)、カッコ内は濃度 (mg eq./kg 乾土)

	0 時点	0.5 時間	1 日	7 日	14 日
放射性気体 (累積)	N. A.	N. A.	N. A.	N. D.	N. D.
1M NaOH トラップ	N. A.	N. A.	N. A.	N. D.	N. D.
エフレング リコ-ルトラップ	N. A.	N. A.	N. A.	N. D.	N. D.
土壌	101.64 (0.4011)	99.24 (0.3916)	96.94 (0.3889)	99.87 (0.4006)	99.76 (0.4002)
抽出画分	101.64	98.74	91.91	76.61	65.68
アセトニトリル抽出	101.64	98.16	86.19	74.19	62.06
アセトニトリル: 塩酸抽出	<0.64	0.58	5.72	2.42	3.61
抽出残渣	<0.23	0.50	5.03	23.26	34.09
放射性気体+土壌	101.64	99.24	96.94	99.87	99.76

N. A. : 分析せず N. D. : 検出せず

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

土壌抽出液中の放射性成分の分析

土壌のアセトリル抽出液とアセトリル：塩酸抽出液（SPE-メタノール溶出液）の分析結果から求めた各分析時点での土壌中の主要放射性成分の残留レベルを表5に示した。

アセトリル抽出液のHPLCラジカマトグラムからは、主要放射性成分としてD2341（記号A）、
 の3化合物が検出された。又、
 も有意に検出された。アセトリル：塩酸抽出液（SPE-メタノール溶出液）のHPLCラジカマトグラムは、アセトリル抽出液のそれとほぼ同様であった。

表5 滅菌土壌における抽出液中の代謝物比率（原報告書 Table12）

数値は施用放射能に対する%、カッコ内は濃度（mg eq./kg 乾土）

		0 時点	0.5 時間	1 日	7 日	14 日
同定、 特徴付けされた代謝物	D2341 (記号 A)	93.81 (0.3702)	20.66 (0.0815)	12.56 (0.0504)	8.18 (0.0328)	9.45 (0.0379)
未同定代謝物						

N. A. ; 分析せず

滅菌土壌においても D2341（記号 A）は半減期 0.5 時間以内で急速に分解した（0 時点で施用量の 93.8%、0.5 時間後で 20.7%）。ただし、全体的な分解速度は非滅菌土壌より遅く、1 日後で 12.6%、14 日後でも 9.5% 残留した。D2341 の分解に伴って

が急速に増加し、0 時点の から 0.5 時間後には最高レベルの に達した。
 はそれ以降速やかに減少したが、非滅菌土壌に比べてその消失は遅く (DT₅₀ は
 14 日後でも が残留した。

図 2 に D2341 及び主要放射性成分の推移を示した。

図2 滅菌土壌における D2341 及び主要放射性成分の推移 (原報告書 Figure13)

施用 14 日後の滅菌土壌の抽出残渣 (施用量の約 34% を含む) について、リックスレ-抽出 (溶媒はアセトリル:塩酸) を行った結果、施用量の 6.2% が抽出された。その主要成分は であった。リックスレ-抽出後の残渣の腐植抽出法による分画化では、非滅菌土壌の場合と同様、放射能の多くがヒュ-ミン画分に分布し (施用量の 16.1%)、腐植酸とフル^ホ酸画分からも有意な放射能 (それぞれ 1.7%、4.2%) が検出された。

3) 未知代謝物

D2341 を非滅菌土壌に 5ppm のレベルで施用した同定用試料 (8 日後) のアセトリル抽出液を LC-MS で分析し、未知代謝物の ESI-MS スペクトル及び ESI-MS/MS スペクトルを測定した。

4) 代謝分解のまとめ

D2341 の畑条件土壌中での想定代謝経路を図 3 に示した。

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

図 3 D2341 の畑条件下での想定代謝経路 (原報告書 Figure28)