

(8) 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

ラットを用いた繁殖試験

(資料 追4)

試験機関：ヘーベルトドイツ研究所
(西独)[GLP 対応]
報告書作成年：1988年

検体の純度 :

試験動物 : SD系ラット、1群雄30匹、雌30匹、投与開始時 雄 165～210g、雌 140～185g(6週令)

投与期間 : P世代；投与開始からF_{1a}児離乳時までの17週間
F₁世代；離乳時からF_{2a}児離乳時までの18週間
F₂世代；離乳後ただちに剖検
(1987年5月8日～1988年1月18日)

投与方法 : 検体を1000、3000および10000ppm含有した飼料を自由に摂食させた。
投与量は既存の慢性毒性試験(ダイムロンのラットにおける慢性毒性試験(資料No.7))を参考に決定した。

方法及び試験項目 : 概要を下記の表にまとめた。

一般状態及び死亡率 ; 全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認 ; 交配時は同一群内の雌雄を1:1で同居させ、膣栓及び精子により交尾を確認した。妊娠の確認は触診及び出産をもって行った。

繁殖性に関する指標 ; 交配、妊娠等各時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

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

$$\text{平均交尾必要日数} = \frac{\text{交尾までの必要日数の和}}{\text{交尾動物数}}$$

$$\text{妊娠率(\%)} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交尾動物数}} \times 100$$

$$\text{交尾率(\%)} = \frac{\text{交尾動物数}}{\text{交配動物数}} \times 100$$

$$\text{繁殖係数(\%)} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交配動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠係数(\%)} = \frac{\text{生産仔を有する動物数}}{\text{妊娠動物数}} \times 100$$

$$\text{生産率(\%)} = \frac{\text{生存仔数(生後1日)}}{\text{出生仔数}} \times 100$$

$$\text{生存率(\%)} = \frac{\text{生後4/7/14/21日の生存仔数}}{\text{生後1/4*/7/14日の生存仔数}} \times 100$$

(*間引き後の匹数)

$$\text{離乳率(\%)} = \frac{\text{生後21日の生存仔数}}{\text{生後4日*の生存仔数}} \times 100$$

(*間引き後の匹数)

$$\text{性比(\%)}_{\text{雄}} = \frac{\text{雄哺育仔数}}{\text{哺育仔数}} \times 100$$

$$\text{雌} = \frac{\text{雌哺育仔数}}{\text{哺育仔数}} \times 100$$

病理組織学的検査；頸部、精巣上体、卵巣、脳下垂体、前立腺、精のう腺、精巣、子宮、膣及び肉眼的病変に病理標本を作製し検鏡した。

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
P	生育 (9 週)	雌雄 1 対 1 で交配、交尾は精子、膣栓で確認 (妊娠 0 日)	体重、餌を週 1 回測定
	交配 (3 週)		交配状況の観察 交配終了時雄を病理組織学的検査
	妊娠 (3 週)		妊娠 0、6、10、15 および 20 日に体重測定、餌を 5 日毎に測定
	出産	出産状況の観察 新生児数・死産児数、外表奇形、性別及び同腹生存児体重測定	
F1	哺乳 (3 週)	出産後 4 日目各同腹児数を雄 4 匹、雌 4 匹に調整 (不可能な場合、雌雄 計 8 匹)	母動物の出産後 1、4、7、14、21 日目体重、餌測定および生存児数観察。なお、途中死亡および 4 日目屠殺の新生児について異常の検査
	離乳	継代用の各群雌雄 25 匹ずつ無作為に選抜	母動物の対照群と最高投与群について病理組織学的検査。また、継代用以外の児動物を屠殺し、肉眼病理検査
	生育 (10 週)	} (P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	交配 (3 週)		(P 世代に準ずる)
	妊娠 (4 週)		(P 世代に準ずる)
出産	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)	
哺乳 (3 週)	(P 世代に準ずる)	(F1 世代に準ずる)	
F2	離乳	(F1 世代に準ずる)	(F1 世代に準ずる)
	生育		離乳後直ちに剖検

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

結果:

世代		親 : P		児 : F1a		親 : F1		児 : F2a		
投与量 (ppm)		対照群	1000	3000	10000	対照群	1000	3000	10000	
動物数	雄	30	30	30	30	25	25	25	25	
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25	
親	一般状態									
	死亡率	0	0	0	0	0	0	0	0	
	体重変化(g) 雄								やや減少	
	雌									
動物	摂餌量(g) 雄									
	雌									
動物	肉眼的病理検査									
	病理組織学的検査									
	平均交尾必要日数	2.3	2.7	3.1	2.0	3.0	2.3	2.7	2.3	
	交尾率 (%)	100.0	100.0	100.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
	妊娠率 (%)	96.7	93.3	96.7	96.3	100.0	88.0	80.0	96.0	
	繁殖係数 (%)	96.7	93.3	96.7	86.7	100.0	88.0	80.0	96.0	
	妊娠係数 (%)	96.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.8	
	動物	肉眼的病理検査								
動物	新生児数	386	367	381	345	327	291	255	287	
	死産児数	5	4	9	8	5	12	8	3	
	外表異常									
	性比(雄/雌)	49.9/50.1	47.7/52.3	49.2/50.8	49.0/51.0	52.5/47.5	52.7/47.3	48.2/51.8	47.5/52.5	
	同腹生存児体重(g)	81.0	79.1	78.0	79.7	72.7	72.1	72.1	70.7	
	生産率(%)	98.4	98.9	97.8	97.6	98.7	95.9	96.8	99.0	
	動物	4日目生存率 (%)	95.4	95.8	97.3	95.2	78.8	77.7	78.4	82.6
	動物	7日目生存率 (%)	92.6	94.2	92.2	91.0	72.4	72.6	81.9	78.3
	動物	14日目生存率 (%)	81.0	81.4	83.8	87.0	73.2	75.4	86.6	85.1
	動物	21日目生存率 (%)	96.2	94.9	95.5	95.9	99.2	97.6	98.0	99.2
動物	離乳率(%)	73.1	74.6	74.0	78.7	55.7	57.7	70.6	69.6	
	21日目生存児 体重(g)	43.6	46.3	45.7	44.1	41.0	41.7	40.0	38.6	
	肉眼的病理検査									

空欄は検体によって異常が認められなかったことを示す。

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

10000ppm では F1 雄動物の交配前平均体重増加量に軽度の減少が認められた。
その他、体重変化、肉眼的病理検査、病理組織学的検査および外表異常について、いくつかの異常が認められたが、いずれも自然発生的、検体とは関連のない変化とみられた。
親動物の交配能力および繁殖能力では両世代、両交配で一定した変化はみられず、検体による影響はないと考えられる。

以上の結果より、2 世代にわたって本剤を飼料に混入して投与した場合、10000 ppm 投与群の第 2 世代雄動物の体重増加量に軽度の減少が認められたが、繁殖能に対しては何ら影響がみられなかった。

ゆえに繁殖性に係る最大無作用量は 10000 ppm (500mg/kg/日^註) 以上と判断される。
また、データから申請者として、児動物および親動物に係る最大無作用量は、それぞれ 10000ppm (500mg/kg/日^註) 以上および 3000ppm (150mg/kg/日^註) と判断する。

^註：WHO の換算率にて算出した。換算率は 1ppm が 0.05mg/kg/日である。

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

ラットにおける催奇形性試験

(資料 追2)

試験機関：ヘーベルントイツ研究所
(西独国) [GLP 対応]
報告書作成年：1988年

- 検体純度 :
試験動物 : CD (SD) BR 系妊娠雌ラット(8~12 週令) 1群 25~31 匹
試験期間 : 10 日間投与(1987年5月5日~7月22日)
方 法 : 検体を 1%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、40、200 および 1000mg/kg の投与レベルで妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間、毎日 1 回経口投与した。
投与量の設定に当って、

これらの結果より、本試験での投与量を上記のごとく設定した。
なお、対照群には 1%カルボキシメチルセルロースのみを同様に投与した。

- 試験項目 :
親動物 : 一般状態および生死を毎日 2 回観察し、妊娠 0、6、10、15 および 20 日目に体重を測定した。妊娠 20 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存および死亡・吸収胚数を検査した。
生存胎児 : 性別、体重および外表異常の観察を行った。各胎児の骨格異常の有無および内臓異常の有無を検査した。

結 果 : 次頁の通り。

表記の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体における最大無作用量は 1000mg/kg/day であった。また、最高投与量の 1000mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

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

投与群 (mg/kg/day)	賦形剤対照	40	200	1000		
一群当り動物数	31	25	31	31		
親動物	一般状態					
	死亡数(率)					
	体重変化					
	妊娠数(率)	23 (74.2)	20 (80.0)	23 (74.2)	23 (74.2)	
	妊娠20日目に剖検した母体数	31	25	31	31	
	着床所見	検査親動物数	23	20	23	23
		黄体数	339	312	330	341
		着床数	280	253	263	289
		生存胎児数	254	245	251	273
		吸収胚数	26	8	12	16
死亡胎児数		0	0	0	0	
胎児動物		体重(g)	3.54	3.37	3.52	3.54
	性比(雄/雌)	0.88	1.09	0.87	0.98	
	検査胎児数	254	245	251	273	
	外表異常		短尾/1例			
	検査胎児数	130	124	128	138	
	内臓異常	一方あるいは両方の肺葉の縮小/4例		大脳の半球が縮小/1例 一方あるいは両方の肺葉の縮小/1例	大脳の半球が縮小/1例 一方あるいは両方の肺葉の縮小/1例	
	検査胎児数	124	121	123	135	
	骨格異常	側彎症/1例	側彎症/1例			

空欄は検体による異常が認められなかったことを示す。

ウサギにおける催奇形性試験

(資料 追3)

試験機関 : ヘルムントツ研究所
(西独国) [GLP 対応]
報告書作成年 : 1988 年

- 検体純度 :
試験動物 : ニュージーランド白色雌ウサギ(約 14~17 週令)
1 群 18 匹
試験期間 : 13 日間投与(1987 年 5 月 5 日~1987 年 6 月 19 日)
方法 : 検体を 1%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、40、200 および 1000mg/kg の投与レベルで妊娠 6 日目から 18 日目までの 13 日間、毎日 1 回経口投与した。
投与量の設定に当って、

これらの結果より、本試験での投与量を上記のごとく設定した。
なお、対照群には 1%カルボキシメチルセルロースのみを同様に投与した。

- 試験項目 :
親動物 : 一般状態および生死を毎日 2 回以上観察し、妊娠 0、6、12、18、24 および 28 日目に体重を測定した。妊娠 28 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存および死亡・吸収胎児数を検査した。
生存胎児 : 性別、体重および外表異常の観察を行った。各胎児の骨格異常の有無および内臓異常の有無を検査した。
胎児動物の胎児重量は、1000mg/kg 投与群で対照群と比べわずかに減少した。対照群との差は統計学的に有意ではなかったものの、検体投与との関連性も考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ニュージーランド白色ウサギに投与したときの母体における最大無作用量は 1000mg/kg/day であった。また、最高投与量の 1000mg/ kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

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

投与群 (mg/kg/day)	賦形剤対照	40	200	1000		
一群当り動物数	18	18	18	18		
親動物	一般状態					
	死亡数(率)	2 (11.1)	2 (11.1)	2 (11.1)		
	体重変化					
	妊娠数(率)	16 (88.9)	16 (88.9)	17 (94.4)	17 (94.4)	
	妊娠28日目に剖検した母体数	16	16	16	16	
	着床所見	検査親動物数	13	14	14	15
		黄体数	146	135	147	162
		着床数	103	99	110	123
		生存胎児数	89	88	104	109
		吸収胚数	12	10	4	13
死亡胎児数	2	1	2	1		
胎児動物	体重 (g)	37.7	38.5	38.4	34.6	
	性比 (雄/雌)	1.02	0.96	0.76	1.14	
	検査胎児数	89	88	104	109	
	外表異常	尾の形成不全と前肢の関節彎曲/1例		無頭症、無肢症、臍ヘルニア/1例		
	内臓異常	水頭症/1例 大脳や小脳の中心部や辺縁部の空洞化/3例 脳室の肥大/1例	小脳の空洞化/1例		大脳や小脳の中心部や辺縁部の空洞化/1例 脳室の肥大/1例	
骨格異常	肋骨癒着/1例	肋骨分岐/1例 側彎症/1例	側彎症/1例			

空欄は検体による異常が認められなかったことを示す。

(9) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

復帰変異試験

(資料 10)

試験機関: 残留農薬研究所
報告書作成年: 1978年6月

検体の純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 (WP 2her 株) を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。試験実施当時の当該試験機関における経験的判断から、最高用量は 5,000 μ g/プレートとした。

試験結果 : ダイムロンの存在下において、表-1 に示すように、S-9 Mix の非存在下において TA1535 および TA100 株に用いた濃度全般にわたって復帰変異コロニー数の弱い増加を示した。そこでこの 2 株を用いて実験を繰返したが、表-2 のように、いずれの株においても結果は陰性であった。またそれ以外の株においても結果は、S-9 Mix の存在の有無にかかわらず陰性であった。
陽性対照として用いた AF-2、 β -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene では S-9 Mix の非存在下で、2-aminoanthracene では S-9 Mix の存在下で対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。

以上の結果からダイムロンの復帰変異誘発性は認められなかった。

表-1 復帰変異試験成績

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	復帰変異 colony 数/plate					
			base-change 型			frameshift 型		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対照 (DMSO)		-	24	13	110	2	10	27
			20	17	138	4	15	24
ダイムロン	10	-	23	39	234	8	10	27
			22	39	238	6	11	25
	50	-	20	39	244	6	8	16
			30	35	202	10	13	27
	100	-	19	55	172	10	25	22
			31	43	201	12	11	22
	500	-	24	32	225	7	16	20
			23	43	221	9	9	19
	1000	-	24	27	223	8	14	19
			31	29	263	4	9	30
	5000	-	21	9	150	9	9	22
			20	13	168	9	8	21
対照 (DMSO)		+	20	5	100	8	13	26
			20	4	107	7	15	16
ダイムロン	10	+	20	6	115	8	17	28
			31	12	90	2	22	24
	50	+	30	7	114	3	20	15
			17	12	104	6	19	14
	100	+	26	9	108	6	15	11
			28	8	117	5	10	15
	500	+	19	6	100	3	12	18
			26	11	107	2	14	10
	1000	+	24	4	105	5	18	14
			27	4	86	7	9	15
	5000	+	16	11	101	3	13	15
			20	14	112	10	8	16
2-amino- anthracene	10	-	29	24	199	15	16	50
			27	11	166	13	24	44
	10	+	115	514	> 3000	223	> 3000	> 3000
			130	450	> 3000	229	> 3000	> 3000
陽性対照		-	1512 ^{a)}	334 ^{b)}	684 ^{c)}	>10000 ^{d)}	>3000 ^{e)}	224 ^{f)}
			1776	418	632	>10000	>3000	243

^{a)} 0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AF-2

^{b)} 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ β -propiolactone

^{b)} 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AF-2

^{d)} 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 9-aminoacridine

^{c)} 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2-nitrofluorene

^{f)} 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AF-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株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表-2 復帰変異試験成績

薬物	S-9 濃度 Mix ($\mu\text{g}/$ plate)	復帰変異 colony数/plate					
		Exp. 1				Exp. 2	
		TA1535		TA100		TA100	
		-	+	-	+	-	+
対 照		18	18	149	130	134	99
		23	15	133	149	163	107
ダイムロン	0.001	20	19	156	119		
		16	19	110	150		
	0.005	20	13	145	119		
		-	15	121	125		
	0.01	30	12	136	125	115	145
		15	21	140	118	123	136
	0.05	18	18	146	119	141	113
		26	29	136	130	135	142
	0.1	17	19	159	112	144	135
		11	11	137	134	143	118
	0.5	32	15	133	128	137	130
		26	17	129	129	148	108
	1	27	17	150	152	159	131
		19	16	136	147	156	109
	5	28	16	128	125	146	99
		19	18	166	132	156	117
	10	21	17	224	131	173	128
		28	23	136	150	157	131
	50	20	18	203	174	165	137
		39	15	166	130	153	121
100					158	149	
					165	129	
500					158	136	
					150	120	
1000					129	119	
					136	137	
5000					98	124	
					110	109	
2-amino- anthracene	10	17	577	198	> 3000	167	> 3000
		24	506	199	> 3000	197	> 3000
陽性対照		730 ^{a)}		964 ^{b)}		1156 ^{b)}	
		715		1032		1156	

^{a)} 50 $\mu\text{g}/$ plate β -propiolactone

^{b)} 0.05 $\mu\text{g}/$ plate AF-2

宿主経由試験

(資料 10)

試験機関：残留農薬研究所
報告書作成年：1978年6月

検体の純度 :

試験動物 : ICR系雄マウス(7週令、体重 31.5 ± 0.7 g)
1群6匹

使用細菌 : ヒスチジン要求株(*S. typhimurium* G46)
ダイムロンを24時間間隔で500mg/Kg、2,000mg/Kgをそれぞれ2回、強制経口投与した。
検体投与直後に菌浮遊液2mlを腹腔内に注入し、3時間後屠殺し、2mlの1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を腹腔内に注入し、被検液を採取し、ヒスチジンを含む軟寒天液に添加後最小寒天培地に拡げ、37°Cで2日間培養後、復帰変異コロニー及び生存菌数を計数した。

試験結果 : 表1に示す様に、G46株を用いた *in vitro* における復帰変異試験の結果は陰性であった。また、表2に示す様に宿主経由試験においても検体投与群は対照群と比較して復帰変異菌数の有意の増加は認められなかった。一方陽性対照群として用いた Dimethylnitrosamine 投与群では対照群と比較して著明な復帰変異菌数の増加が認められた。

以上の結果よりダイムロンは宿主経由により突然変異誘起作用はないと考えられる。

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

表-1 復帰変異試験成績 (S. typhimurium G46)

ダイムロン μg/plate	0	10	50	100	500	1000	5000	β-propiolactone 1000
復帰変異 colony数/plate	1	3	4	3	6	1	3	38
	2	5	1	4	4	3	5	42

表-2 宿主経路試験成績

群	総投与量 mg/Kg	復帰変異 菌数/ml	生存菌数 ×10 ⁻⁸ /ml	復帰変異 / 10 ⁸ 菌数 / 生存菌数
対 照 (5%アラビアゴム)		42.5	32.0	1.33
		5.8	34.6	0.17
		26.7	46.8	0.57
		13.3	35.7	0.37
		20.0	52.1	0.38
		14.2	31.8	0.45
ダイムロン	500×2	13.3	48.1	0.28
	500×2	11.7	32.7	0.36
	500×2	11.7	53.2	0.22
	500×2	11.7	54.4	0.21
	500×2	21.7	26.9	0.81
	500×2	15.8	66.2	0.24
ダイムロン	2000×2	15.0	42.4	0.35
	2000×2	9.2	43.7	0.21
	2000×2	22.5	39.7	0.57
	2000×2	17.5	51.1	0.34
	2000×2	2.5	58.7	0.04
	2000×2	10.0	50.1	0.20
陽性対照 (D M N)	50	3397	48.6	70
	50	4153	27.6	150
	50	4197	28.5	147
	50	4057	24.0	169
	50	5743	27.9	206
	50	4007	28.5	141

a) 平均値±S. D.

*** P < 0.001

2) 染色体異常誘発性

チャイニーズ ハムスター肺細胞を用いた
in vitro 細胞遺伝学的試験

(資料 追7)

試験機関 :セーフファーム・ラボラトリーズ社
(英国) [GLP 対応]
報告書作成年:1989年

検体の純度 :

方 法 : チャイニーズ ハムスター肺細胞(CHL 細胞)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9mix)の存在下及び非存在下で染色体異常検定を行った。

検体を溶解するため、DMSOを用いた。

濃度設定のための予備試験の結果より、本試験ではS-9mixの存在下及び非存在下とも25、50、100、200 µg/mlの濃度で検定を実施した。

検定は各濃度で100個ずつ2連で中期分裂像を観察した。

陽性対照としてS-9mix非存在下ではマイトマイシンC(MMC)、存在下ではシクロホスファミド(CP)を、陰性対照としてDMSOを用いた。

結 果 : 表記の通り。

ダイムロン原体は染色体異常の頻度をやや増加させたが、有意ではなかった。

しかし、S-9mix非存在下でダイムロン原体に48時間処理した場合、倍数体細胞数を有意に、且つ用量相関性をもって増加させた。この増加は、核の紡錘体に対する影響を示唆するものである。

一方、陽性対照として用いたMMC及びCPは顕著な染色体異常を誘発した。

以上の結果により、ダイムロン原体は本試験条件下において、染色体異常誘発性はないが、代謝活性化法によらない場合には数的異常のみを誘発させる可能性があると考えられる。

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

染色体異常試験結果 (代謝活性化法による場合)

薬物	代謝活性化の有無	処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	観察細胞数	細胞数		染色体構造異常細胞の出現数と出現頻度 (%)*										判定		
				倍数体数	1 ^a	2 ^b	ギヤップ			染色分体型			染色体型		その他	合計		
							g	ctb	cte	ctb	cte	csb	cse	-g		+g		
陰性対照 [DMSO]	-	0	200	7 (3.5)	-	-	6 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	3 (1.5)	9 (4.5)	1 ^a	2 ^b
	+	0	200	6 (3)	-	-	2 (1)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	3 (1.5)	5 (2.5)	-	-
ダイム ロン	-	25	200	8 (4)	-	-	5 (2.5)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	3 (1.5)	8 (4)	-	-
	-	50	200	15 (7.5)	-	-	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	3 (1.5)	6 (3)	-	-
	-	100	200	14 (7)	-	-	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (2.5)	7 (3.5)	-	-
	+	200	200	17 (8.5)	-	-	3 (1.5)	6 (3)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	7 (3.5)	9 (4.5)	-	-
陽性対照 [CP]	-	25	200	10 (5)	-	-	3 (1.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	5 (2.5)	8 (4)	-	-
	-	50	200	4 (2)	-	-	2 (1)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2)	6 (3)	-	-
	+	100	200	5 (2.5)	-	-	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1.5)	4 (2)	-	-
陽性対照 [CP]	-	200	200	7 (3.5)	-	-	9 (4.5)	2 (1)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	4 (2)	13 (6.5)	±	-
	+	10	200	6 (3)	-	-	5 (2.5)	2 (1)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	3 (1.5)	7 (3.5)	-	-
	+	10	50	2 (4)	-	-	10 (20)	19 (38)	22 (44)	11 (22)	1 (2)	1 (2)	2 (4)	37 (74)	40 (80)	+	***	+

* 処理時間 6 時間

g:ギヤップ、ctb:染色分体型切断、cte:染色分体型交換、csb:染色分体型切断、cse:染色分体型交換、その他:断片化など(細粉化は除く)

左の値は異常細胞の出現数、()内の値は出現頻度(単位:%)を示す。

a: 判定 1 - :5%未満、 ±:5%以上 10%未満、 + :10%以上

b: 判定 2 (カイ二乗検定による統計処理) - : < 95%、 ***: \geq 99.9%

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

染色体異常試験結果 (代謝活性化法によらない場合)

薬物	処理時間 (h)	処理濃度 (µg/ml)	観察細胞数	細胞数		ギヤップ	染色体構造異常細胞の出現数と出現頻度 (%)*						判定	
				判 定			染色分体型		染色体型		合 計		判 定	
				1 ^a	2 ^b		ctb	cte	csb	cse	-g	+g		1 ^a
陰性対照	24	0	200	6 (3)	—	2 (1)	1 (0.5)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	7 (3.5)	8 (4)	—	—
[DMSO]	48	0	200	7 (3.5)	—	8 (4)	1 (0.5)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	7 (3.5)	15 (7.5)	±	±
ダイムロン	24	25	200	10 (5)	—	2 (1)	1 (0.5)	2 (1)	1 (0.5)	0 (0)	4 (2)	6 (3)	—	—
		50	200	9 (4.5)	—	5 (2.5)	0 (0)	2 (1)	1 (0.5)	0 (0)	8 (4)	12 (6)	±	—
		100	200	3 (1.5)	—	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	6 (3)	—	—
	200	200	6 (3)	—	7 (3.5)	0 (0)	5 (2.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	7 (3.5)	13 (6.5)	±	—
	48	25	200	12 (6)	—	9 (4.5)	0 (0)	3 (1.5)	4 (2)	1 (0.5)	0 (0)	8 (4)	16 (8)	±
50		200	16 (8)	—	10 (5)	1 (0.5)	3 (1.5)	4 (2)	1 (0.5)	0 (0)	9 (4.5)	19 (9.5)	±	—
100		200	34 (17)	+	14 (7)	1 (0.5)	1 (0.5)	5 (2.5)	2 (1)	0 (0)	6 (3)	18 (9)	±	—
陽性対照 [MMC]	24	0.075	50	2 (4)	—	6 (12)	14 (28)	9 (18)	0 (0)	0 (0)	29 (58)	30 (60)	+	***
	48	0.075	50	5 (10)	—	7 (14)	25 (50)	23 (46)	5 (10)	5 (10)	47 (94)	47 (94)	+	***

* g:ギヤップ、ctb:染色分体型切断、cte:染色分体型切断、cse:染色体型交換、その他:断片化など(細粉化は除く)

左の値は異常細胞の出現数、()内の値は出現頻度(単位:%)を示す。

a: 判定 1 - :5%未満、 ±:5%以上10%未満、 + :10%以上

b: 判定 2 (カイ二乗検定による統計処理) - : < 95%、 ***: ≥ 99.9%

3) マウスを用いた小核試験

(資料 追 18)

試験機関 : セーフファーム・ラボラトリーズ社
(英国) [GLP 対応]

報告書作成年 : 2004 年

検体の純度 :

試験動物 : Cr1:CD-1(ICR)BR 系雄マウス、5~8 週齢、体重 25~30 g、一群 7 匹

試験方法 : 検体は落花生油に懸濁し、0、500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した。投与後 24 及び 48 時間に全てのマウスから大腿骨を摘出して、牛胎児血清を用いて骨髓細胞を採取し、常法により骨髓標本を作製した。観察は 2000 個の多染性赤血球数について小核を有する多染性赤血球数を計数し、染色体異常誘発性を検定した。また、骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1000 個の全赤血球(多染性赤血球数+正染性赤血球)を観察し正染性赤血球数を計数した。

予備試験において、最大推奨用量 2000 mg/kg で毒性影響が認められるかの確認および毒性影響に雌雄差があるかどうかを確認することを目的として 2000 mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後 48 時間動物を観察した。その結果、死亡や毒性徴候は認められず雌雄差も求められなかったことから、最大推奨用量 2000 mg/kg を本試験の最高用量とし、以下 1000 及び 500 mg/kg の用量を設定した。また、本試験は雄のみで実施することとした。骨髓採取時期は投与後 24 および 48 時間とした。陽性対照としてシクロフォスファミド(50 mg/kg)を単回経口投与し、投与後 24 時間に骨髓標本を作製した。

試験結果 : 結果を次頁に示した。

すべての検体投与群においていずれの観察時間においても小核を有する多染性赤血球の増加は認められなかった。

溶媒対照群と比較して検体投与群には多染性赤血球/正染性赤血球比または赤血球 1000 個中の多染性赤血球の百分率に統計学的に有意な低下は認められなかったが、溶媒対照群に比して明らかに低下していた。

なお、一般状態の異常や死亡は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたシクロフォスファミドでは、投与後 24 時間の観察で小核を有する多染性赤血球が顕著に増加した。

以上の結果、検体投与による小核を有する多染性赤血球の出現頻度は、最大推奨用量 2000 mg/kg においても溶媒対照群と同程度であることから、本試験条件下で、検体は骨髓多染性赤血球に対する染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

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

小核試験成績

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観 察 動物数	MNPCE %	PEC/(PEC+NCE) %
					平均±標準偏差	平均±標準偏差
24	溶媒対照 (DMSO)	—	♂	7	0.08±0.05	55.50± 7.57
	検体 (ダブロン)	500	♂	7	0.11±0.15	49.76± 8.69
	検体 (ダブロン)	1000	♂	6 ^a	0.08±0.08	48.07±13.14
	検体 (ダブロン)	2000	♂	7	0.02±0.04	45.33±12.43
	陽性対照 (シクロfosファミト ^b)	50	♂	5	1.68±0.83***	54.84± 3.39
48	溶媒対照 (DMSO)	—	♂	7	0.04±0.03	61.33± 8.68
	検体 (ダブロン)	2000	♂	7	0.04±0.05	49.94±11.44

PCE : 多染性赤血球数、 NCE : 正染性赤血球数
MNPCE : 小核を有する多染性赤血球数

^a : 骨髄標本作製 (遠心分離) 時に 1 例の骨髄細胞を失った

*** : Student の t 検定で溶媒対照群と有意差あり (P<0.001)

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

4) DNA 損傷誘発性

Rec-assay

(資料 10)

試験機関 : 残留農薬研究所
報告書作成年 : 1978 年 6 月

検体の純度 :

試験方法 : 枯草菌の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、賀田らの Rec-assay 法で DNA の損傷の誘起性を検定した。

試験結果 :

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M45	H17	
対照 (DMSO)		0	0	0
ダイムロン	20	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
	2,000	0	0	0
Kanamycin	10	7	5	2
Mitomycin C	0.1	10	2	8

ダイムロン存在下において、両株に生育阻止を認めなかった。
一方、陽性対照として用いた Mitomycin C では H-17 に比べ M-45 に著明な生育阻止帯を生じ、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果よりダイムロンの DNA 損傷性は認められなかった。

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

(10) 生体の機能に及ぼす影響

マウスの中樞神経系に対する作用(マウスの一般症状)

(資料 追11)

試験機関 : ハンティントン リサーチセンター
(英国)

報告書作成年 : 1990年

検体の純度 :

供試動物 : ICR系マウス 体重 21~26g (約6週令) 1群 雄4匹

方法 : 検体を'Tween 80' 0.1 mlで完全に混合し、その後 0.5 %w/vCMC溶液に懸濁し、150、500、1500及び5000 mg/kgの投与レベルで経口投与した(投与容量20 ml/kg)。

投与直後、30、90、150及び300分後にIrwin法に従い、一般症状を観察した(観察期間7日)。

結果 : ダイムロンの投与により軽度から中等度の中樞神経系の興奮を示す変化がみられ、最も頻繁に見られたのは、呼吸増加、触反応増強、躯幹筋緊張度の増大であった。それは投与後約90分でピークとなった。
ダイムロンの投与により、7日間の調査期間中に動物の死亡はなかった。
ダイムロンを投与したマウスと賦形剤投与動物との比較において直腸温には顕著な変化はなかった。

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

ラットの呼吸、循環器系に対する作用

(資料 追12)

試験機関 : ハンティントン リサーチセンター
(英国)

報告書作成年 : 1990年

検体の純度 :

供試動物 : ラット (体重 284、289 g) 2匹

方法 : 検体を20%ポリエチレングリコール400 (0.9 %食塩水) 溶液に懸濁し、0.3、1.0、3.0、10.0 mg/kgをラットの静脈内に投与し、血圧、心拍数、呼吸数、呼吸の深さを測定した。また、各投与前及び投与後2、5、10、15分に心電図をとった。投与間隔は20分とした。

結果 :

血 圧 ; 溶媒対照では収縮血圧の上昇が認められたが、その後正常レベルに戻った。最小血圧にもわずかに影響がみられた。

投与群では、0.3と1.0 mg/kgで一定の上昇に続き低下があらわれた。3.0 mg/kgでは1例では上下し、他の1例では一定上昇後急激な低下を示したが、次の投与までには正常に復した。10 mg/kgでは急激な循環器及び呼吸の衰弱を引き起し投与直後に死亡した。

心 拍 数 ; 10 mg/kg用量を除きほとんど影響なかった。

呼 吸 数 ; 10 mg/kg用量を除きほんのわずかな一時的影響がみられた。

呼吸の深さ ; 10 mg/kg用量を除きほとんど影響なかった。

心 電 図 ; 10 mg/kg用量を除き重要な変化はみられなかった。

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

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /1群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般症状観察 (マウス)	経口 (0.5%CMC)	150	♂ 4	—	150	軽度から中等度の中樞神経系の興奮を示す症状が投与後約90分でピークとなった。
		500			500	
		1500			1500	
		5000			5000	
呼吸、循環器系 (ラット)	静脈内 (20%ポリエチレン グリコール /0.9%食塩水)	0.3	♂ 2	—	0.3	血圧が一定の上昇後低下した。心拍数、呼吸数、呼吸の深さ、心電図では死亡を引き起こした10mg/kgを除きほとんど影響はなかった。
		1.0			1.0	
		3.0			3.0	
		10.0			10.0	

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

2. 原体混在物及び代謝物を用いた試験成績

(1) 急性毒性

及び 急性毒性 (資料6)

出典: RTECS^{a)} (1981~82)

: ラットにおける急性経口毒性	LD ₅₀	1,200mg/kg. BW
: ラットにおける急性吸入毒性	LCLo ^{b)}	3,000ppm
モルモットにおける急性吸入毒性	LCLo	3,000ppm
ヒトにおける急性吸入毒性	TCLo ^{c)}	600ppm

米国においては通常作業時間における恕限度は 50ppm とされている。

以上より、申請者は 急性毒性は強くなく、 のそれは中等度
と考える。

a): Registry of Toxic Effects of Chemical Substances

b): 最小致死濃度

c): 最小中毒発現濃度

(2) 変異原性

細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 追5)

試験機関：相互生物医学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体の純度 :

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*⁻株)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9)の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。

検体を溶解させるため DMSO を用いた。濃度設定は濃度設定試験の結果に基づいた。濃度設定試験は 5000µg/プレート を最高用量、10µg/プレートを最低用量とする 6 濃度で実施した。その結果、本検体は 5000µg/プレートで代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての使用菌株に対して抗菌性を示したが、いずれの菌株についても復帰変異コロニーの増加は認められなかった。よって本試験の用量段階は 5000µg/プレートを最高濃度に公比 2 で計 6 あるいは 7 用量とした。

結 果 : 試験結果を表に示した。

代謝活性化しない場合、*S. typhimurium* TA1537 に対し復帰変異コロニーを対照の 2 倍以上に増加させたが、再現性が認められないこと及び背景データと比較して低値であったことから、偶発的なものと考えた。

一方、陽性対照はそれぞれ陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを出現させ、試験の適正さを示した。

以上の結果から、本検体は復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

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

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復 帰 変 異 数 (コロニー数/プレート)										
		塩 基 対 置 換 型								フ レ ーム シ フ ト 型		
		TA100		TA1535		TA102		WP2uvrA		TA98		TA1537
S9 Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105	15	224	30	25	4					
		100 103	20 18	239 232	25 28	26 26	0 2					
	78						5					
							4 5					
	156	118	22	264	23	27	7					
		138 128	26 24	244 254	21 22	28 28	6 7					
	313	106	20	246	28	25	6					
		119 113	19 20	245 246	22 25	29 27	2 4					
	625	107	29	235	28	35	1					
	109 108	25 27	222 229	15 22	22 29	4 3						
1250	104	18	242	29	31	2						
	103 104	25 22	241 242	23 26	22 27	5 4						
2500	94	34	195	27	17	5						
	97 96	15 25	171 183	19 23	25 21	2 4						
5000	87	12	196	20	20	4*						
	71 79	15 14	176 186	16 18	17 19	2* 3						
S9 Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	104	18	219	31	41	10					
		92 98	17 18	240 230	37 34	43 42	15 13					
	78	114	22	255	35	42	16					
		120 117	16 19	278 267	31 33	49 46	9 13					
	156	121	28	226	37	42	9					
		97 109	16 22	242 234	25 31	43 43	12 11					
	313	115	12	234	36	34	10					
		112 114	20 16	257 246	37 37	36 35	5 8					
	625	107	14	176	33	49	9					
	129 118	20 17	225 201	29 31	57 53	7 8						
1250	104	14	163	30	25	3						
	101 103	16 15	135 149	28 29	34 30	2 3						
2500	86*	9*	57*	19*	26*	0*						
	69* 78	10* 10	69* 63	13* 16	24* 25	2* 1						
5000	77*	13*	69*	19*	22*	1*						
	54* 66	10* 12	60* 65	17* 18	24* 23	2* 2						
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名 称	AF-2 ^{#1}	NaN ₃ ^{#2}	MMC ^{#3}	AF-2	2NF ^{#4}	9AA ^{#5}				
		濃 度 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.5	0.01	1.0	80.0				
		コロニー数 /プレート	429 415 422	177 165 171	616 608 612	139 167 153	142 163 153	1140 1277 1209				
S9Mixを必要とするもの	名 称	B[a]P ^{#6}	2AA ^{#7}	B[a]P	2AA	B[a]P	B[a]P					
	濃 度 (µg/プレート)	5.0	2.0	5.0	20.0	5.0	5.0					
	コロニー数 /プレート	1099 1118 1109	87 65 76	606 580 593	556 581 569	594 517 556	82 73 78					

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

#3: Mitomycin C

#5: 9-Aminoacridine

#7: 2-Aminoanthracene

(備考) 数値の右の*印は、菌の生育阻害の認められたもの。

#2: Sodium azide

#4: 2-Nitrofluorene

#6: Benzo[a]pyrene

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

3. 製剤を用いた試験成績

(1) 急性毒性

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 追 8)

試験機関 : セーフファーム ラボラトリーズ 社
(英国) [GLP 対応]

報告書作成年 : 1988 年

検体の純度 : 7%粒剤

試験動物 : SD系ラット(5~8週令、体重雄126~143、雌120~137g)
1群雌雄各5匹

試験期間 : 14日間観察

方法 : 検体を蒸留水に溶解し、5000mg/kgの用量で単回経口投与した。(動物は検体投与前一晚及び投与後2時間絶食した。)

試験項目 : 中毒症状及び生死を14日間観察した。試験終了時に全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	経口
LD ₅₀ (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時期	中毒症状を認めず
最大無作用量	> 5000

死亡動物及び中毒症状の発現は見られず、剖検においても異常は認められなかった。

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

マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 追9)

試験機関：セーフファーム ラボラトリーズ 社
(英国) [GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

検体の純度：7%粒剤

試験動物：アルビノ CFLP 系マウス(6~8 週令、体重 雄 29~30、雌 27~30g)
1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を蒸留水に溶解し、5000mg/kg の用量で単回経口投与した。(動物は検体投与前 3~4 時間及び投与後 2 時間絶食した。)

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時に全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
LD ₅₀ (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時期	中毒症状を認めず
最大無作用量	> 5000

死亡動物及び中毒症状の発現は見られず、剖検においても異常は認められなかった。

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 追10)

試験機関：セーフファーム ラボラトリーズ社
(英国) [GLP 対応]
報告書作成年：1988年

- 検体の純度：7%粒剤
- 試験動物：SD系ラット(14週令、体重雄275~290、雌232~269g)
1群雌雄各5匹
- 試験期間：14日間観察
- 方法：蒸留水で湿らせた検体を、ラットの刈毛した背部皮膚(無傷皮膚)に2000mg/kgの用量で24時間、半閉塞塗布した。
- 試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験終了時に全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。
- 結果：

投与方法	経皮
LD ₅₀ (mg/kg)	> 2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時期	中毒症状を認めず
最大無作用量	> 2000

死亡動物、中毒症状及び皮膚刺激性の徴候は認められず、剖検においても異常は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 追 15)

試験機関 : セーフファーム ラボラトリーズ 社
(英国) [GLP 対応]
報告書作成年 : 1992 年

検体の純度 : 7%粒剤
組成 ; ダイムロン … 7.0%
鋳物質微粉 等 … 93.0%

試験動物 : New Zealand White 系ウサギ(約 12~16 週令、体重 2.55~2.72kg)
1 群 6 匹(雄 4 匹、雌 2 匹)

試験期間 : 3 日間観察

方法 : 検体 0.5g を 0.5ml 蒸留水で湿らせて 2.5cm 四方のガーゼパッドに塗布し、各動物の背腰部の刈毛した部位に貼付した。
処理時間 4 時間とし、処置部位を蒸留水を浸した脱脂綿で洗浄し、皮膚に残った検体を除去した。

観察項目 : パッチ除去約 1 時間後及び 24、48、72 時間後に皮膚の検体処置部位を検査し、刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無等を観察した。
判定は Draize(1959)の基準に従った。

結果 : 観察した刺激性変化の評点は以下の表のとおりである。

変化	処 理 後 時 間			
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑・痂皮	0.0	0.3	0.0	0.0
浮 腫	0.0	0.0	0.0	0.0
合 計	0.0	0.3	0.0	0.0

注) 点数は 6 匹の平均値である。

パッチを除去して 24 時間後の観察で、2 例の処置部位に極めて軽度の紅斑が認められた。48 時間後の観察時にはすべての処置部位は正常であった。

以上の結果から、本剤はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があるものと思われる。

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

ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験

(資料 追 14)

試験機関：セーフファーム ラボラトリーズ社
(英国) [GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

- 検体の純度：7%粒剤
組成；ダイムロン … 7.0%
鉍物質微粉 等 … 93.0%
- 試験動物：New Zealand White 系ウサギ(約 12~16 週令、体重 2.72~2.98kg)
1 群 6 匹(雄 3 匹、雌 3 匹)
- 試験期間：3 日間観察
- 方法：検体を粉末状にして各動物の一方の眼の下瞼の裏側に処理し、1 秒間静かに眼を閉じた。もう一方の眼は何も処理せず対照とした。
- 観察項目：投与 1 時間後、及び 24、48、72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。判定は Draize(1959)の基準に従った。
- 結果：観察した刺激性変化の評点は以下の表のとおりである。

観察項目	投与後の時間			
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
角 膜	0.0/80	0.8/80	0.0/80	0.0/80
虹 彩	5.0/10	0.8/10	0.0/10	0.0/10
結 膜	8.0/20	2.7/20	0.3/20	0.0/20
合 計	13/110	4.3/110	0.3/110	0.0/110

注) 数字は 6 匹の平均値である。

24 時間後の観察時で、1 例の処理眼に広汎性の角膜混濁が認められた。その他の角膜に及ぼす悪影響は認められなかった。

処理 1 時間後は全例の処理眼に、処理 24 時間後の観察では 1 例の処理眼に虹彩の炎症が認められた。その他の虹彩に及ぼす悪影響は認められなかった。

処理 1 時間後は全例で微弱から中等度の結膜の刺激が、また 24 時間後の観察では微弱の結膜刺激が認められた。48 時間後の観察で、1 例の処理眼に微弱の結膜発赤が持続していた。

処理 48 時間後あるいは 72 時間後には、全例とも正常であった。

処理 1 時間後に、5 例の処理眼のまわりに検体の残物が認められた。

以上の結果から本剤のウサギの眼に対する刺激性は軽度であると判定された。

(3) 皮膚感作性

モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 追b)

試験機関：野村生物科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体の純度 : 7%粒剤

[組成] ダイムロン ; 7%
鉍物質微粉等 ; 93%

試験動物 : ハートレー系モルモット(306~426g)
1群20匹(検体区)または10匹(陽性対照区)

試験期間 : 48時間観察

方法 : Maximisation法

- 予備試験 :
- 1) 皮内注射による感作時の被験物質量の設定のための予備試験
ショウロン粒剤を生理食塩液で注射可能な濃度 10mg/ml に懸濁したものおよびその希釈液(5、10、50、100倍)各 0.05ml を剪毛した3匹のモルモットに皮内注射した。その結果、全例とも発赤はみられたが壊死、潰瘍がみられなかったため、本試験での被験物質量は最高濃度 10mg/ml の1/2濃度即ち 5mg/ml とした。
 - 2) 貼付による感作時および惹起時の被験物質量の設定のための予備試験
ショウロン粒剤を生理食塩液でペースト状になる濃度 250 mg/ml に懸濁したものおよびその希釈液(5、10倍)各 0.2ml をビニール濾紙上に塗り、濾紙を剃毛した側腹部(各濃度2匹)にあて、24時間閉塞貼付した。その結果、250mg/ml濃度のものではテープ除去時に発赤(評点1~2)がみられたため、本試験での感作時および惹起時の被験物質量は 50mg/ml濃度の溶液を 0.2ml 用いることにした。

- 感作 :
- 1) 皮内注射による第1回感作
剪毛したモルモットの肩甲骨部の上段左右に 0.05ml の FCA を、中段左右に 0.05ml のショウロン粒剤懸濁液または 0.1% DNCB 液、下段左右に 0.1ml のショウロン粒剤懸濁液と FCA のエマルジョンまたは 0.1% DNCB 液と FCA の混合液を皮内注射してモルモットを感作した。なお、無処置群については肩甲骨部の2ヶ所に 0.05ml の FCA を皮内注射した。
 - 2) 貼付による第2回感作
第1回感作から6日後に剪毛後、10%ラウリル硫酸ナトリウム含有白色ワセリンを塗布した。塗布から24時間後にこれを除去し、同一部位に 0.2ml のショウロン粒剤懸濁液または 0.1% DNCB 液を48時間閉塞貼付して感作した。

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

惹起： 貼付による感作から 2 週間後に剃毛した各動物の左側腹部に 0.2ml の惹起用抗原(ショウロン粒剤懸濁液、0.1% DNCB 液)を 24 時間閉塞貼付した。なお、各感作群の無処置群の動物についても同量の惹起用抗原を貼付した。

観察項目： 閉塞貼付終了時から 24、48 時間後に適用部位の紅斑及び浮腫の有無等を肉眼的に観察した。

結果： 検体処理群において 24 および 48 時間後のいずれの観察時においても発赤等の皮膚反応は認められなかった。
一方、陽性対照においては明瞭な紅斑あるいは浮腫がみられた。

以上の結果から、ショウロン粒剤の皮膚感作性は陰性であると判断した。

IX 動植物及び土壌等における代謝分解

〈代謝分解試験一覧表〉

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・投与方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁
13-1, 2	動物体内運命 (吸収・排泄・ 代謝)	ラット	経口・50 mg/kg 腹腔内・50 mg/kg、 200 mg/kg ×2回(代謝物) 静脈内・124 µg/kg 一部は胆管カニューレー ション	経口投与されたダイムロンは 消化管から吸収され代謝され る。代謝物は主に尿中に排泄 される。腸肝循環も活発で糞 中への見かけの排泄率を大に している。ダイムロン及びそ の代謝物の体内残留性はほと んどない。	残留農薬研究 所 (1976) (1978)	143
参考文献 1 (13-1)	動物体内運命 (吸収・排泄)	ラット	経口・5 g/kg	投与したダイムロンの大部分 が糞中に排泄された。但し、 糞と尿が混合されているため 消化管吸収がないとはいえない。	東京女子医科 大学 昭和電工生 化学研究所 (1974)	
13-3	動物体内運命 (代謝物同定)	ラット	腹腔内・100 mg/kg 100 mg/kg×10回	主要代謝物は と同定された。 微量代謝物として が確認され た。	残留農薬研究 所 (1979)	
14-1	植物体内運命 (吸収・移行・ 代謝)	イネ	土壌添加処理・ 4.5 mg/ポット 水耕液浸根・ 0.5 ppm(1~6日)	水耕液、湛水土壌からイネの 根により吸収されたダイムロ ンは求頂的に移行する。玄米 の移行は僅かである。イネ体 中では急速に代謝される。	東京農工大学 (1977)	152
参考文献 2 (14-1)	植物体内運命 (吸収・移行・ 代謝)	イネ エンドウ キュウリ ハマスゲ	水耕液浸根・ 0.5 ppm(1~6日)	ハマスゲとエンドウではイネ と同様に吸収されたダイムロ ンは求頂的に移行した。 ¹⁴ C はイネ、エンドウでは下葉 や茎の細胞間隙に、ハマスゲ の塊茎では表面近くに検出さ れた。またイネの根は外部に ¹⁴ C を漏出するがハマスゲの地 下組織ではこれはみられなか った。 エンドウで のグルコシドが 認められ、ダイムロンをこの 極性物質に代謝する速さはキ ュウリ、エンドウで極めて急 速であった。	東京農工大学 (1977)	
14-2	植物体内運命 (代謝物同定)	イネ	土壌添加処理・ 4.5 mg/ポット	イネでの主代謝物は 及びそ の抱合体であった。	昭和電工・ 薬品研究部 東京農工大学 (1977)	

・網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・投与方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁
14-1	土壌中の運命 (動態・代謝・ 代謝物同定)	火山灰土 三紀系粘 質土 海成砂質 土	土壌添加処理・ 30 ppm (乾土重当り)	ダイムロンは未変化物及び変 化生成物の形で土壌に吸着ま たは結合する。代謝分解の速 さは土壌の種類及び畑状態、 湛水状態の差によって若干異 なるが、代謝物 及び が大部分 を占め、その比率はおよそ1:9 で が大であつ た。その他 が認	東京農工大学 (1977)	161
参考文献 3 (14-1)				東京農工大学 (1977)		
15-1	土壌中の運命 (代謝物同定)	記載なし		められた。	昭和電工・ 薬品研究部	
15-2	土壌中の運命 (無菌処理土 壌/代謝・分 解)	火山灰土 三紀系粘 質土 海成砂質 土	土壌添加処理・ 30 ppm (乾土重当り)	滅菌土壌における代謝物の生 成は極めて少ないので、土壌 中での変化は主として微生物 によると判断された。	東京農工大学 (1977)	
H-1	加水分解	クエン酸緩 衝液 リン酸緩衝 液 酢酸緩衝 液	pH4、7、9 ダイムロン 1 ppm 試験開始直後、1週間 後、2週間後、1ヶ月後、3 ヶ月後、6ヶ月後の分解 度	pH4 では、グラフからの推定半減 期 7.2 ヶ月。 pH7、pH9 では安定。	(株)エス・ディー・ エス バイオテック つくば研究所 (1992)	165
H-2	加水分解 運命	酢酸塩緩 衝液	pH4 [フェニルエチル-U- ¹⁴ C]ダイム ロン 0.6mg/L [トリル-U- ¹⁴ C]ダイムロン 0.6mg/L 被験物質処理直後、1、 3、7、14、21 および 30 日 後の分解度および分解 物を検討	[フェニルエチル-U- ¹⁴ C]ダイムロンの 推定半減期 228 日 [トリル-U- ¹⁴ C]ダイムロンの推定 半減期 239 日 両標識体の平均推定半減期 234 日 分解物として、 が確認され、 ダイムロンは尿素結合部分で 加水分解することが判明し た。	ハンティントン ライフ サイエンス社 (英国) (2006)	167

・ 網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・投与方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁
L-1	水中光分解	蒸留水 自然水 (荒川秋ヶ瀬取水口)	ダイムロン 1 ppm 光 22 W/m ² 、pH、25 °C 滅菌(蒸留水)、未滅菌(自然水) 試験直後、1日後、2日後、4日後、6または7日後に試料を採取し、分解度を検討。	蒸留水では分解は生じない。 自然水の半減期は人工光で28.3時間、東京春季太陽光換算で3.3日。 蒸留水、自然水ともに暗条件では分解しなかった。	(株)エス・ディー・エス バイオテック つくば研究所 (1992)	170
L-2	水中光分解 運命	自然水 (英国 Huntingdon River Great Ouse)	[フェニルエチル-U- ¹⁴ C]および[トリル-U- ¹⁴ C] ダイムロンをそれぞれ0.6 mg/Lの濃度で試験液に別々に添加し、キセノン光(42.0 W/m ²)を照射した。 pHは7.51~7.82、25 °C、無菌 試料を光照射0、4、8、16、24、36、48時間に採取し、分解度および分解物を検討	いずれの標識体においても、速やかに光分解し、半減期は人工光で11.91時間、東京春季太陽光換算で2.68日であった。主な分解物は であった。	ハントドン ライフサイエンス社 (英国)(2006)	172
K-1	土壌吸着	植調古川 試験地、 新潟第一 試験地、 植調研究 所、 宮崎試験 場の4土 壌	土壌吸着係数 試験濃度 0.50、0.25、 0.125、0.0625 ppm 平衡化時間 16時間。	土壌吸着係数(Koc) (25 °C) 古川水田土壌 951 新潟水田土壌 1213 牛久水田土壌 732 宮崎水田土壌 863	(株)エス・ディー・エス バイオテック 東京研究所 (1990)	178

・網掛けの試験成績は残留農薬安全性評価委員会で評価済みである

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

<代謝分解物一覧表>

記号	由来	名称 (略称)	化学名	構造式
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				
I				
J				
K				

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

供試標識化合物の合成法

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

1. ダイムロンのラットにおける代謝

(資料 13-1、2、3)

試験機関：残留農薬研究所

報告書作成年：1976、1978、1979年

(資料 13-1 と 13-2 は、経口投与による吸収、移行、排泄および代謝物について同一の実験に基づいているが、資料 13-2 ではさらに胆汁排泄の実験及び腸肝循環の実験が加えられている。資料 13-3 では尿中の代謝物の同定実験について述べている。なお参考文献 1 は資料 13-1 の引用からも判る通り動物代謝についての最初の試験報告である。)

供試標識化合物：カルボニル- ^{14}C -ダイムロン

比放射活性

放射化学的純度

供試動物：Wistar 系雄ラット(6 週齢、体重 110~130g)(慢性毒性試験と同じ系統)ただし 5) の試験では Wistar 系雄ラット(9 週齢、体重約 280g)

試験方法：

1) 吸収・排泄試験(資料 13-1、2)

供試化合物を 50 mg/kg(LD₅₀ 値の約 1%以下)で 1 回経口投与し、呼吸代謝ケージ中で飼育し、呼吸は 48 時間後まで、尿、糞は 120 時間後まで採取した。また、3、6、24、72、120 時間後に 2~5 匹のラットを屠殺し、血液、肝臓、腎臓、脂肪、消化管および残部体組織を採取した。

組織を常法により可溶化または燃焼処理したのち、液体シンチレーションカウンターによって放射活性を測定した。

また、供試化合物を 50 mg/kg で 1 回腹腔内投与し、尿、糞中の放射活性を 72 時間後まで調査した。

2) 胆汁排泄試験(資料 13-2)

胆管にカニューレを施したラットに対し、供試化合物を 50 mg/kg で強制経口投与または 124 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で静脈内投与した。ラットはボールマンケージに保持し、胆汁、尿、糞を採取し放射活性を測定した。

3) 腸肝循環試験(資料 13-2)

ラット A に胆管カニューレを施し、そのカニューレを胆管カニューレを施した別のラット B の十二指腸に挿入した。A ラットに供試化合物を 124 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で静脈注射後、A ラットの胆汁は 30 分毎に 2 分間、B ラットの胆汁は連続的に採取して放射活性を測定した。

4) 代謝物の調査(資料 13-1、2)

①：上記 1) の試験の経口投与でえられた尿、糞における放射性物質を酸性、塩基性、中性のフラクションに分離し、主として薄層クロマトグラフィー(tlc)によって代謝物を検索した。

②：上記 2) の試験で、胆汁中の代謝物について、有機溶媒で抽出後 β -グルクロニダーゼ処理し、凍結乾燥後再抽出して tlc により調査した。

③：非標識ダイムロンを 200 mg/kg ずつ 2 日腹腔内投与した 5 匹のラットから 4 日間採取した尿の中の塩基性物質をモノクロルアセチル化したのち、ECD-GC で分析した。

5) 尿中の主要代謝物の同定 (資料 13-3)

供試化合物を 100 mg/kg で 1 回腹腔内投与したラット 4 匹の尿を 2 日間採取し、エーテルで分別抽出して放射活性を測定し、主として tlc により代謝物を検索した。また、非標識ダイムロンを 1 日 100 mg/kg ずつ 10 日間腹腔内投与したラットから採取した尿を用いて主代謝物を単離精製し、tlc、NMR、IR および MS によりその構造を決定した。

試験結果 :

1) 吸収および排泄

胃ゾンデにより投与された供試化合物は消化管から半減期 6 時間の一時速度論的に減少し、血中濃度は投与後 3~6 時間の間で最大となった(図 1-1)。

ラット主要臓器中の放射活性は投与後 3 時間で最高に達し、以後急速に減少して 120 時間後には痕跡程度となった。投与 3 時間後の臓器中濃度は肝臓が最高で 15 ppm(ダイムロン換算)を示し、腎臓、脂肪がこれに次いだ(図 1-2)。

糞、尿への排泄は速やかで、投与後 48 時間までに投与量の 66%が糞中へ、34%が尿中に排泄された(図 1-3)。呼気への排泄は微量で、48 時間までに 0.05%程度であった。

腹腔内投与においても糞、尿への排泄は速やかで、投与後 24 時間までに投与量の 37%及び 47%がそれぞれ糞及び尿中に排泄され、投与後 72 時間までには糞中に 47%、尿中に 53%とほとんど全量が排泄された(表 1-1)。

表 1-1 単回腹腔内投与(50mg/kg)後の糞、尿への放射活性物質の排泄
(資料 13-2 の Table 1 より)

投与後の時間	糞	尿	尿及び糞
0~24	37.0 %	46.9 %	83.9 %
24~48	9.5	5.5	15.1
48~72	0.8	0.4	1.3
0~72	47.4	52.9	100.3

2) 胆汁排泄

放射活性物質は胆汁を通じても排泄され、投与 48 時間までに、経口投与では 39%(表 1-2)、静脈内投与では 42%が排泄された(図 1-4)。

表 1-2 胆管カニューレションを施したラットにおける単回経口投与後の放射活性物質の排泄 (資料 13-2 の Table 2 より)

排泄物	投与後 48 時間までの排泄量
胆汁	38.6 %
尿	30.2 %
糞	27.4 %
合計	96.2 %

3) 腸肝循環

ラット A の静脈内に投与された供試化合物の 53%に相当する放射活性が投与後 12 時間内で胆汁中に排泄され、これを十二指腸内に摂取した B ラットは受けた放射活性物質の 22%を尿に、24%を胆汁に排泄した(表 1-3)。ラット A における胆汁排泄は速やかに行われ、投与後 30~60 分にそのピークがあり、漸次減少する。しかし B ラットのそれは 2 つのピークがあり、1 つは A ラット同様速やかに行われるが、他は前者の 8~11 時間後に現われ、排泄量は後者が大きい(図 1-5)。

表 1-3 単回静脈注射 (124 µg/kg) 後の放射活性物質の排泄 (資料 13-2 の Table 3 より)

排泄物	Rat (A) ^{a)}	Rat (B) ^{b)}
糞	7.2 %	16.7 %
尿	30.8	22.5
胆汁	53.0*	24.3
合計	91.0	63.5

^{a)} 投与量に対する 24 時間までの排泄量

^{b)} ラット (A) から受け取った量に対する 24 時間までの排泄量

* 投与量に対する 12 時間までの排泄量

4) 代謝物の検索

①: 排泄された放射活性のうち、尿では 87 %がエーテルで抽出され、糞では 36 %が有機溶媒により抽出された。tlc により尿中にはダイムロンは検出されず、10 種以上の代謝物が存在することがわかった。糞の抽出物中にはダイムロンの他、5 種以上の代謝物が存在した。尿中の主要代謝物は酸性フラクションに存在し、

[E]と推定された。

②: 胆汁中にはダイムロンや glucuronidase で処理すると

は検出されないが、β- と推定される物質が生成した。

③: 他の尿中微量代謝物としては、

[I]が monochloroacetyl 体として GC により検出された。

5) 尿中の主要代謝物の同定

腹腔内に標識化合物を 1 回投与後 48 時間までに採取された尿中には投与量の 77%に相当する放射活性物質が排泄され、そのうちの 87%は酸性フラクション中の 1 化合物が占めていた。非標識ダイムロンの繰り返し投与を行ったラットの尿中のこの化合物を抽出し、結晶として単離した。この物質およびそのメチル化物の NMR、IR、MS 等

を測定し、標準物質と比較した結果、この物質は [E]と同定された。

他の微量代謝物として [G]の存在が、標識ダイムロン投与ラットの尿の tlc によって確認された。

6) まとめ

ラットに経口投与されたダイムロンは消化管から比較的速やかに吸収され、代謝される。代謝の主要な経路はトリル基のメチルの急速な酸化であり、

[E]が生成する。代謝物は尿中に排泄されるほか、抱合体として胆汁にも排泄される。胆汁に排泄された物質の一部は再び消化管から吸収される。すなわち腸肝循環が活発に行われており、これが糞中への見かけの排泄率を大にしている。尿中代謝物としてはこの他 [G]、 [I]および未知の数種の代謝物が存在するがその量は少ない。臓器中の放射活生物質の減少は速やかで、ダイムロンおよびその代謝物の体内残留性はほとんどないと判断される。

7) 参考文献 1

試験機関 : 東京女子医科大学
昭和電工・生化学研究所

報告書作成年 : 1974 年

供試化合物 : ダイムロン原体-非標識化合物

供試動物 : SD系雄ラット(4週齢 約110g) 計4匹

試験方法 : 供試化合物をオリーブ油で溶解し、25%懸濁液を調製して各ラットに5g/kg体重の割で経口用ゾンデを用いて1回投与した。投与に先立って2日間絶食させ投与後は自由に摂餌、飲水させた。

投与時より24時間毎96時間後まで排泄した糞の全量を採取し、その重量測定とダイムロンの分析(紫外分光法またはガスクロマトグラフ法)を行った。

試験結果 : 糞中へのダイムロンの排泄

ラット No.	投与量 (mg)	糞中のダイムロン量 (mg)					糞中への排泄率 (%)
		0-24h	24-48h	48-72h	72-96h	0-96h	
1	560	539.2	21.3	0.60	0.04	561.1	100.2
2	580	556.3	19.2	1.90	0.09	577.5	99.6
3	620	513.0	103.9	1.30	0.47	619.2	99.9
4	540	502.0	37.2	0.35	0.08	539.6	99.9

経口的に取り込まれたダイムロンは、そのまま大部分が糞中に排泄された。但し、本実験では糞と尿が混合されているため、消化管吸収がないとは結論できない。

申請者註 : 本試験について、資料 13-1 の報告者は、投与量設定、投与方法、糞尿分離法等の点で問題を残しているとした。

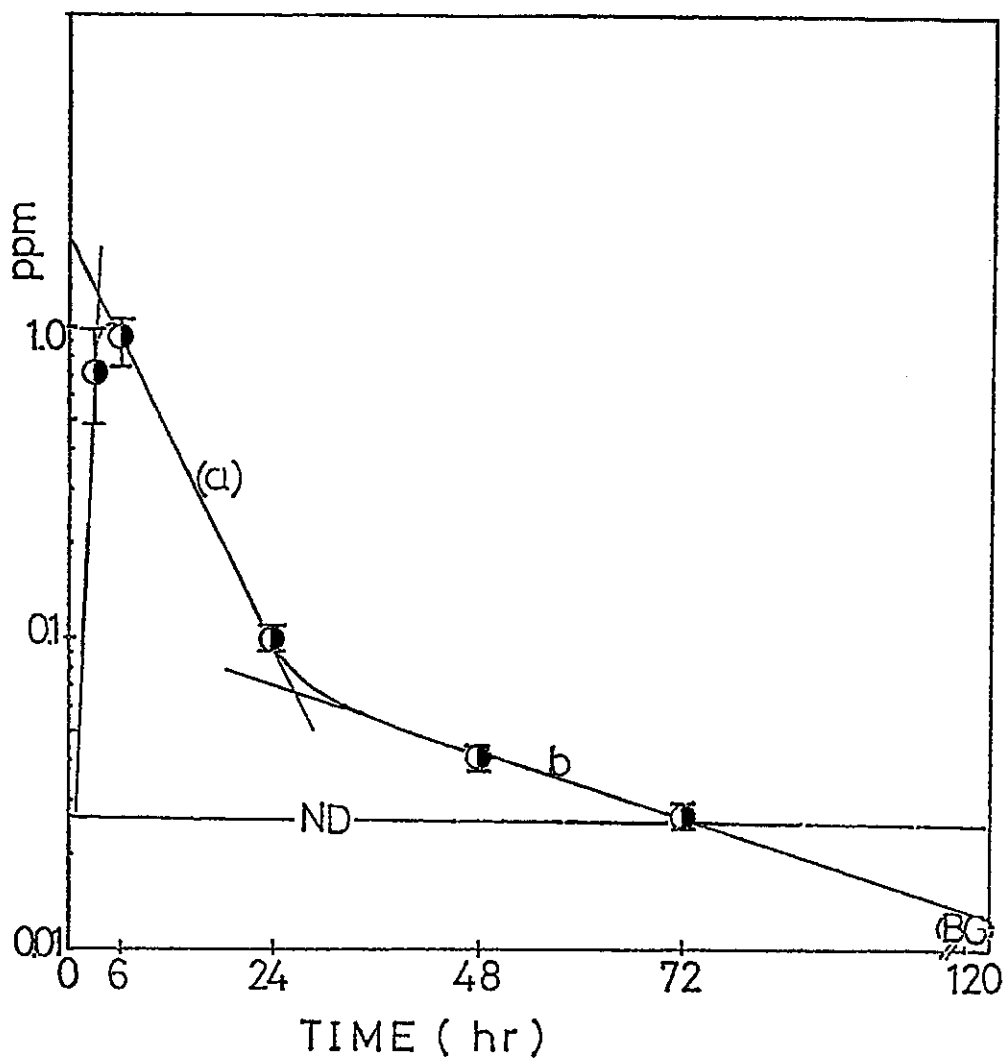


図 1-1 血中における放射性物質濃度
(ppm : ダイムロン換算濃度)
(資料 13-1 の Fig.2)

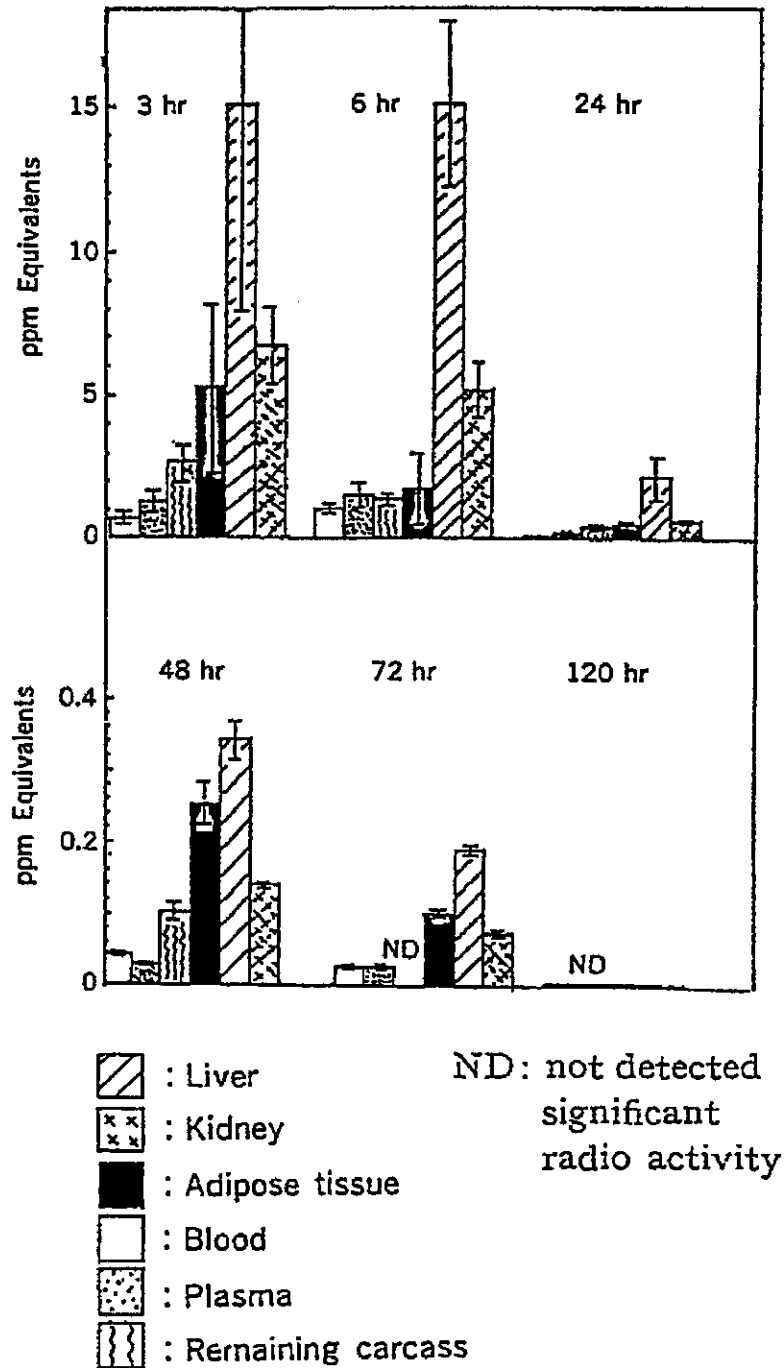


図 1-2 単回経口投与 (50mg/kg) ラットの臓器及び組織中での放射活性物質の分布
(資料 13-1 の Fig.5 /資料 13-2 の Fig.2)

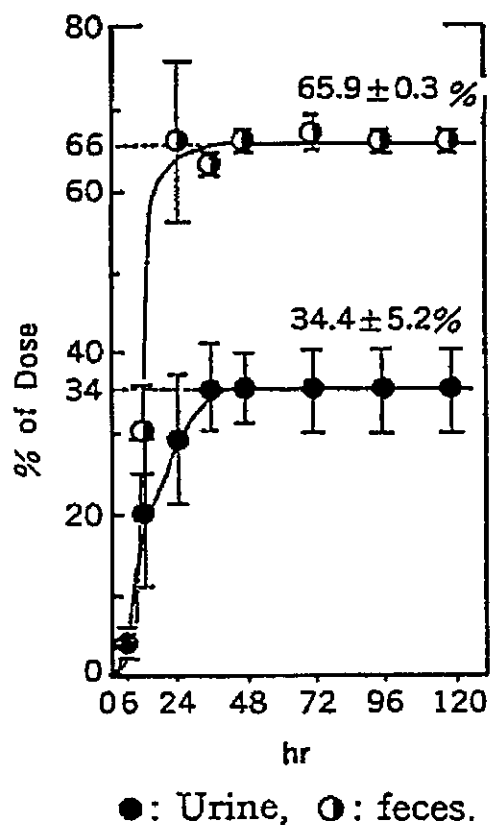


図 1-3 単回経口投与 (50mg/kg) 後の尿、糞への放射活性物質積算排泄量
(資料 13-1 の Fig.6,7 /資料 13-2 の Fig.3)

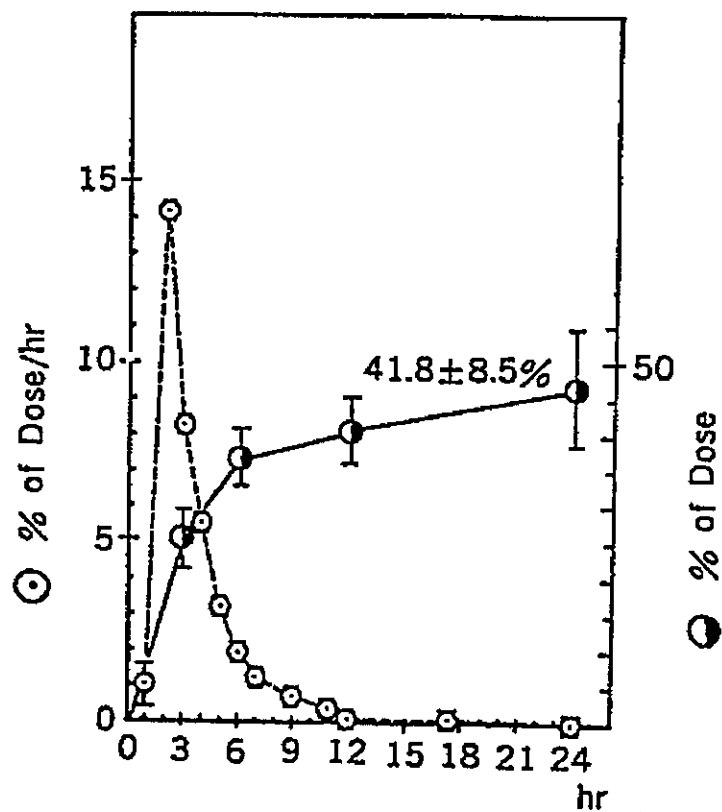


図 1-4 単回静脈注射 (124 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 後の放射活性物質の胆汁排泄
(資料 13-2 の Fig.4)

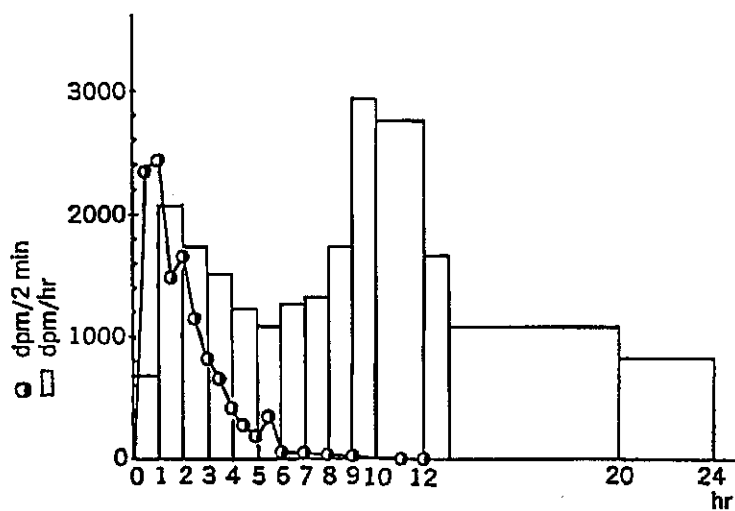


図 1-5 胆管カニューレションを施した相互のラットにおける放射活性物質の胆汁中への排泄速度
●-● : 静脈注射されたラット(A) の30分毎の 2分間の排泄量
□ : 十二指腸内にラット(A) より胆汁を受けたラット(B) の時間当りの排泄量
(資料 13-2 の Fig.5)

2. ダイムロンの植物における代謝

(資料 14-1、2)

試験機関：東京農工大学
昭和電工・薬品研究部

報告書作成年：1977年

(資料 14-2 は、資料 14-1 で触れられていない少量の植物代謝物の同定実験について述べている。参考文献 2 は資料 14-1 の実験に先立つ作用機作解明のための実験報告で、各種植物での代謝の知見を含んでいる。)

供試標識化合物：カルボニル- ^{14}C -ダイムロン

比放射活性

放射化学的純度

ベンジル- ^{14}C -ダイムロン

比放射活性

放射化学的純度

供試動物：イネ(品種；金南風、コシヒカリ)

試験方法：

1) 水耕法による吸収・代謝試験 (資料 14-1、参考文献 2)

カルボニル- ^{14}C -ダイムロン 0.5ppm、代謝物検索の一部についてはベンジル- ^{14}C -ダイムロン 0.5ppm を含む春日井水耕液に、3~4 葉期のイネ(金南風)の根部を浸漬し、1~6 日後にイネを採取した。イネは根をメタノールで洗浄した後、根部、地上部に分け、それぞれメタノールで抽出し、抽出液を濃縮し、その 1 部を用いて液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。さらに tlc によって放射活性成分を単離し、代謝物の同定と放射活性による定量を行った。抽出後の植物体は灰化後、放射活性を測定した。イネを採取したあとの培養液は根の洗液と共に濃縮、同様に放射活性の測定と tlc による代謝物の検索に供した。

2) イネの根からの ^{14}C の漏出試験 (資料 14-1、参考文献 2)

カルボニル- ^{14}C -ダイムロンまたはベンジル- ^{14}C -ダイムロン 0.5ppm を含む春日井水耕液に 3~4 葉期のイネ(金南風)の根部を浸漬し、3 日後にイネを標識化合物を含まない水耕液に移した。その後 1~6 日にイネおよび水耕液を採取し、イネの根部および水耕液について 1) と同様に放射活性の測定と代謝物の分析を行った。

3) ポット栽培による土壌からイネへの吸収移行試験 (資料 14-1、2)

1/5000a ワグネルポットに火山灰壤土を入れ 4cm に湛水し、2 葉期のイネの苗(コシヒカリ)を植えた。カルボニル- ^{14}C -ダイムロンをポット当り 4.5mg 加えて温室内で収穫日まで栽培した。所定日ごとにイネ体を採取し、水洗後、根、茎葉、玄米等の部位に分け、メタノールで抽出した。

メタノール抽出液は濃縮、可溶化し、抽出残は灰化し、それぞれ放射活性を測定した(資料 14-1)。また、一部イネ体のメタノール抽出物を XAD 等で

精製、微量代謝物の同定を行った(資料 14-2)。

4) 参考文献 2 では方法 1)、2) でイネ以外にえんどう、きゅうり、ハマスグを用い比較実験を行った。

試験結果:

1) 水耕液からイネ体への吸収移行

表 2-1 に示すように、水耕液中の放射活性物質は根から急速に吸収され、地上部に移行し、イネ体中の濃度は 6 日後は 1 日後に比べ地上部で 12 倍、根部で 4 倍となった。地上部と根部との濃度は 2 日後以降はほぼ同じとなった。また、吸収された放射活性物質の 95% 以上はメタノール抽出物に分布していた。

表 2-1 水耕液からイネ体への ^{14}C の移行
(資料 14-1 の要約/本文の Table 5 より作成)

経過 日数	地上部		根部	
	全 $^{14}\text{C}^{\text{a)}$	可溶分 (%)	全 $^{14}\text{C}^{\text{a)}$	可溶分 (%)
1	32	100	100	96
2	135	98	129	95
4	177	97	229	97
6	400	96	406	97

^{a)} 生重量当りの放射活性を 1 日後の根部を 100 とした指数に換算

2) イネ体および水耕液中の代謝物

イネ体のメタノール抽出物の tlc ではダイムロンを含め地上部で 4 個、根部で 5 個のスポットが検出された。根部では放射活性の大部分は未変化のダイムロンでメタノール抽出物の全 ^{14}C に対し、1 日後で 70%、2~6 日後は 80% を占めていた。微量代謝物としては [D] と [A] がコクロマトグラフィー等により確認された。その他、原点付近に留る高極性代謝物 UK1 と、ダイムロンより Rf 値がやや高い未知の代謝物 UK2 が存在した(図 2-1)。UK1 は内山ら¹⁾が、えんどう、イネ等から検出し、えんどうの根のメタノール抽出物中から確認した

の抱合体であると推定される。

地上部のメタノール抽出物中の大部分を占めるのはダイムロンと UK1 であり、ダイムロンは 1 日後は 50% を占め、以後徐々に低下し 6 日後は約 40% となった。UK1 は 1 日後は約 20%、2 日後約 20%、4 日後約 50% と次第に増加するが 6 日後は 45% とやや減少した。他の代謝物は [A] と [D] で、両者は経時的に僅に増加するが 10% を超えることはなかった(図 2-2)。

文献 ¹⁾ : M. Uchiyama, R. Sato, H. Kubo;

“Proceedings of The 5th Asian-Pacific Weed Science Society Conference”,
p. 198~203 (1976).

(参考文献 2)

水耕液ではダイムロンの割合が次第に減少して6日後には約30%となった。それに応じて [A]の割合が増加し、6日後は70%となった。その他微量のUK1が存在した(図2-3)。

この水耕液中の多量の [A]の生成は、稲の根が直接水耕液と触れている条件下における根圏の free space の作用によるものと推定される。一方、土壤残留試験においては、水田圃場試験及び容器内試験(湛水条件下、水と土を合わせて採取)ともに、 [A]は検出限界以下であった。したがって、一般の水田水中では、親化合物であるダイムロンに比べて [A]が著しく多量に生成する可能性は低いと考えられる。

3) イネ根から水耕液への漏出

ダイムロンを吸収したイネの根を水耕液に浸漬すると、吸収された放射性物質の約40%が1日で水耕液中に移行し、以後平衡状態となった(図2-4、図2-5)。漏出液中にはダイムロン、 [A]、UK1が検出され、処理1日後の漏出液ではダイムロンが、6日後では [A]が大部分を占めていた。その他、ベンジル-¹⁴C-ダイムロンを用いた試験によって [B]が確認された。

4) ポット栽培イネにおけるダイムロンの吸収

ポット栽培したイネの根における放射性物質の濃度(生重量当りダイムロン換算、以下同じ)は、処理7日後の3ppmが最高で、以後次第に低下し、98日後には0.2ppmとなった。放射性物質は根から葉へ移行し、その濃度は新しい葉ほど小さい。例えば処理21日後は1+2葉が19.4ppm、第7葉が0.5ppmであった。収穫期(処理98日後)の葉には11~13葉(10葉以前の葉は枯死)に約1.5ppm、茎部に約0.3ppm、枝梗に1.06ppm、籾に0.16ppmが残留していた。しかし、玄米での残留量は0.033ppmであった(表2-2)。

イネ体中の微量代謝物として2)に記載のもの他、 [F]、 [E]の存在が確認された。

5) イネ体内運命のまとめ

ダイムロンは水耕液や湛水土壌からイネの根によって吸収され、求頂的に移行するが、通常の栽培状態での玄米への移行は僅かである。ダイムロンはイネ体中で急速に代謝される。代謝の主経路はトリル基のメチルの水酸化であり、

[D]が生成し、さらにその抱合体となる。その他、 [A]、 [F]、 [E]等も生成するが、その量は少ない。

表 2-2 稲体生重量当りの ^{14}C 量 (ダイムロンに換算 $\mu\text{g/g}$)
(資料 14-1 の要約の Table 6/本文の Table 6 より)

	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後	35 日後	42 日後	49 日後	63 日後	77 日後	98 日後
根 部	1.05	3.18	0.923	0.874	0.457	0.527	0.374	0.509	0.258	0.213
集合節部	0.74	0.22	0.719	0.424	0.549	0.591*	0.595*	0.750*	0.756*	0.771*
1+2 葉	} 5.39	36.6	19.4							
3 葉		6.36	6.99	13.5	5.98	(44.3)	(22.5)			
4 葉		4.07	4.08	5.73	3.21	(31.7)	(14.7)	(11.3)		
5 葉		0.82	1.98	3.09	3.26	(7.87)	(13.7)	(19.4)		
6 葉			1.36	2.88	2.33	4.18	3.03	(8.68)	(6.35)	
7 葉			0.51	0.84	0.56	2.21	2.64	(5.18)	(2.96)	(6.48)
8 葉				0.42	0.69	1.86	1.82	4.51	4.83	(5.32)
9 葉					0.17	0.57	0.90	3.29	3.05	(4.29)
10 葉						0.37	0.37	2.26	2.59	(3.83)
11 葉							0.12	1.55	2.18	1.63
12 葉							0.49	0.56	1.22	1.58
13 葉								0.096	0.61	1.38
伸長基部						0.169	0.086	0.164	1.36	0.254 (I節) 0.257 (II節) 0.238 (III節) 0.328 (IV節) 0.296 (V節)
穂 穂軸枝梗 籾 玄 米								0.056	0.222	1.06 0.165 0.033

*: 不伸長基部 (): 枯葉

6) イネ以外の植物での結果

ハマスゲとえんどうではイネ同様カルボニル- ^{14}C -ダイムロンを速やかに吸収し求頂的移行を示した(図 2-6)。組織中の ^{14}C の分布の型は植物種によって異なっており、イネ、えんどうでは下葉や茎の細胞間隙に蓄積していたのに対し、ハマスゲの塊茎では表面近くのみ検出された。またイネの根は外部に ^{14}C 化合物を漏出するが、ハマスゲの地下組織ではこの現象はみられなかった。

各植物の代謝物の TLC での検索結果を表 2-3 に示した。えんどうの根の極性物質画分は、 β -グルコシダーゼ処理及び合成化合物とのクロマトグラフィーによりグルコシドとされた。ダイムロンをこの極性物質に代謝する速さは、きゅうり、えんどうで極めて急速であることが示された。(図 2-7)。

表 2-3 各種植物部分における放射活性物質の分布 (%) ^{a)} (参考文献 2 の Table 4)

Rf ^{b)}	化合物	きゅうり		えんどう		イネ		ハマスゲ		
		根	茎	根	茎	根	茎	根	塊茎	茎

^{a)} ^{14}C -ダイムロンを 3 日間浸漬処理した植物各部からメタノール抽出後 TLC により検索した。

^{b)} 溶媒系—ヘキサン：トルエン：アセトン=1：1：1

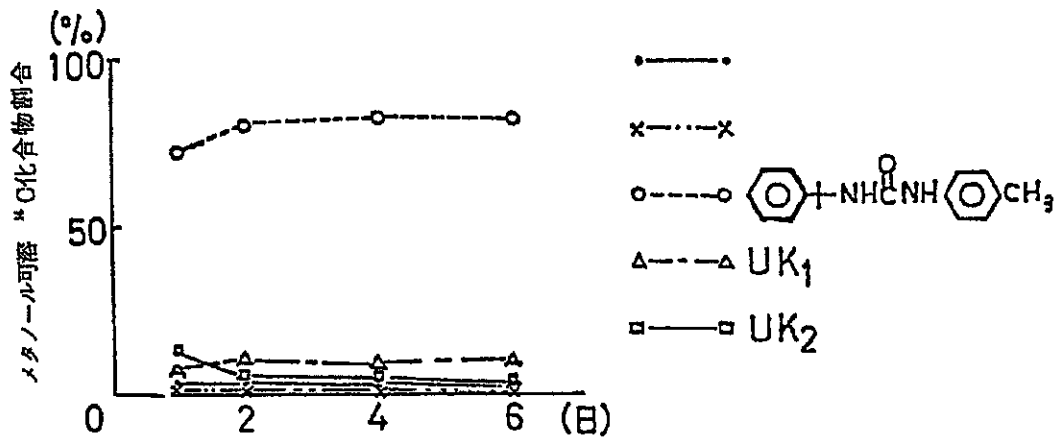


図 2-1 根部メタノール可溶¹⁴C化合物の割合 (資料 14-1 の要約の Fig.14/本文の Fig.17)

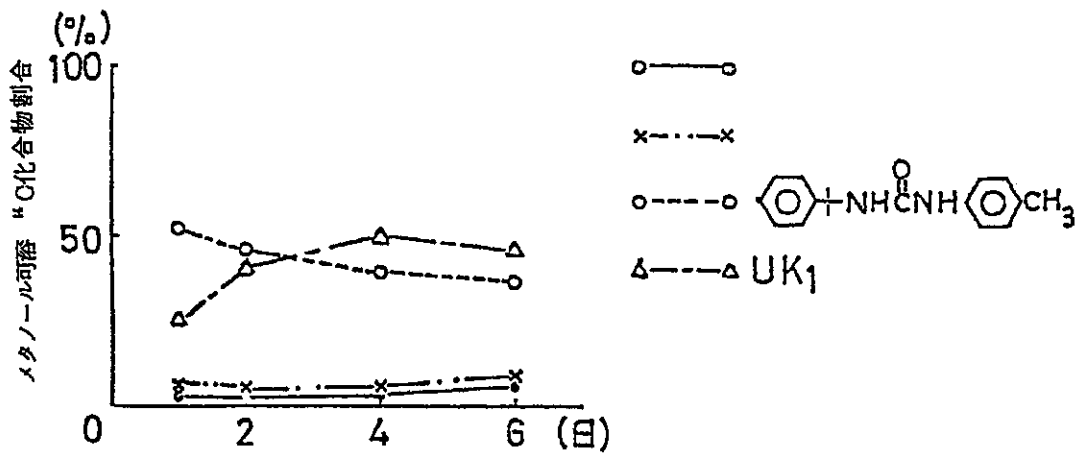


図 2-2 地上部メタノール可溶¹⁴C化合物の割合 (資料 14-1 の要約の Fig.13/本文の Fig.16)

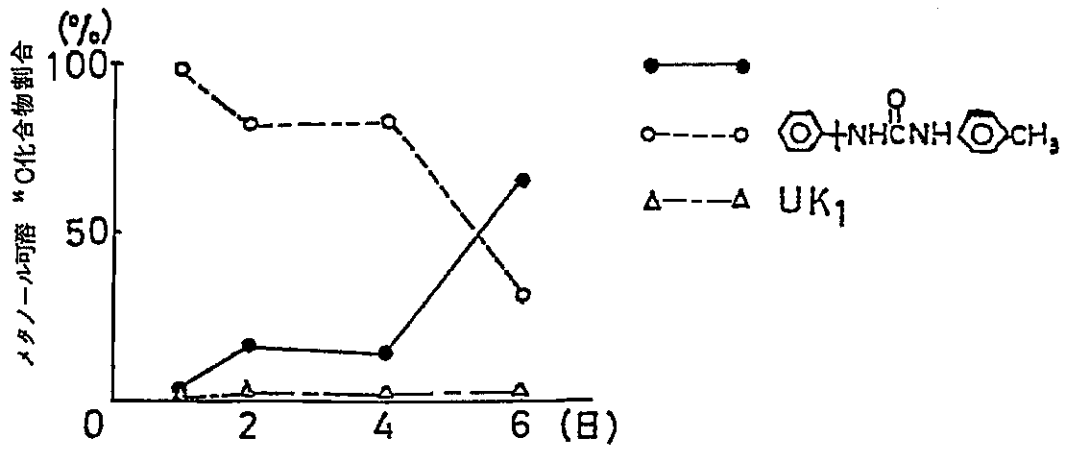


図 2-3 水耕液メタノール可溶¹⁴C化合物の割合 (資料 14-1 の要約の Fig.15/本文の Fig.18)

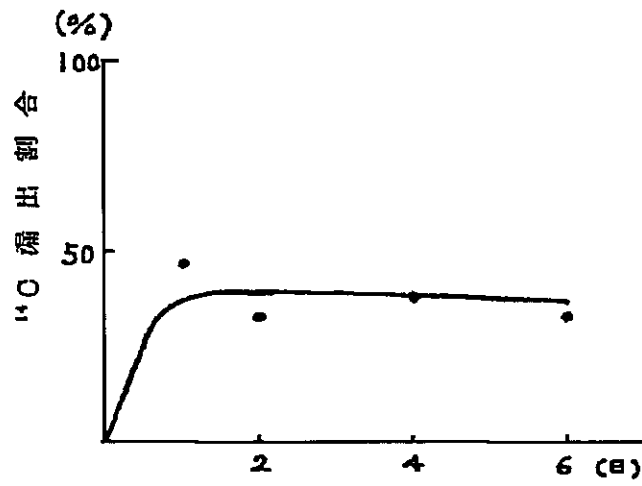


図 2-4 稲根からの経時的漏出割合 ———— カルボニル- ^{14}C -ダイムロン投与
(資料 14-1 の要約の Fig.18/本文の Fig.21)

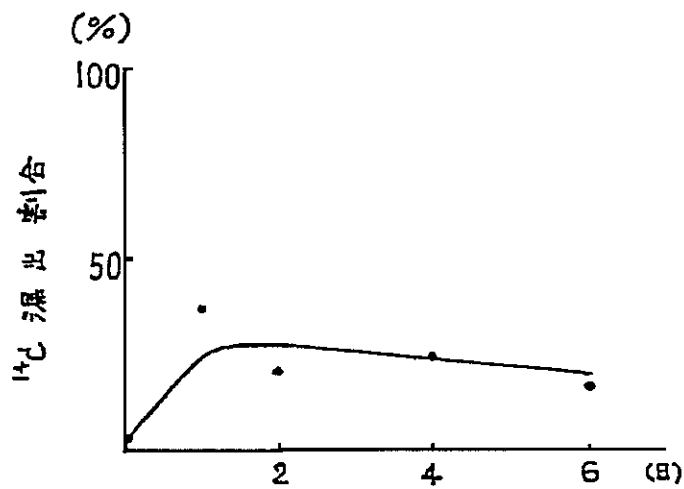


図 2-5 稲根による経時的漏出割合 ———— ベンジル- ^{14}C -ダイムロン投与
(資料 14-1 の本文の Fig.23)

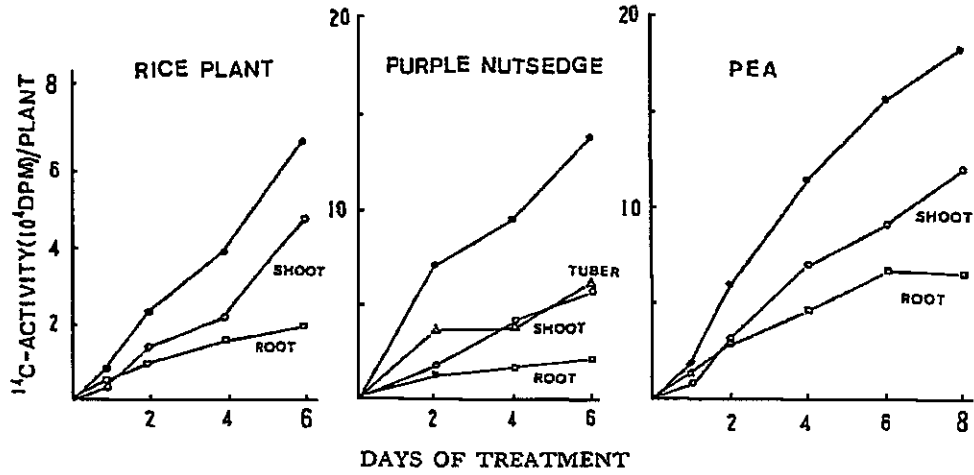


図 2-6 標識ダイムロンのイネ、ハマスゲ、えんどうによる吸収と移行 (参考文献2 の Fig.1)

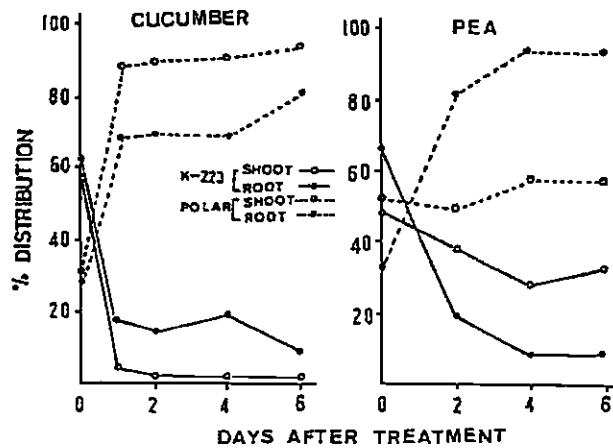


図 2-7 えんどう及びきゅうりにおけるダイムロンと極性物質での ^{14}C 分布 (参考文献2 の Fig.2)

3. ダイムロンの土壌における代謝 (資料 14-1、15-1、2)

試験機関：東京農工大学
昭和電工・薬品研究部
報告書作成年：1977年

(資料 15-1 は資料 14-1 で触れられていない代謝物の検索、及び同定実験について述べ、資料 15-2 は資料 14-1 では用いなかった滅菌土壌での実験報告である。なお参考文献 3 は著者等からの聴取によれば、大部分資料 14-1 及び 15-1、2 と同一の実験に基づく報文である。)

供試標識化合物：カルボニル- ^{14}C -ダイムロン

比放射活性

放射化学的純度

供試土壌：火山灰(L)、三紀系粘質(HC)、海成砂質(S)いずれも千葉県産

試験方法：

1) 畑状態試験(資料 14-1)

最大容水量の 65~70%の水分に調節し、30ppm(乾土重当り)の供試化合物を添加した土壌を、NaOH 溶液を入れた炭酸ガス捕集瓶を付した容器および付さない容器中で、25°Cの暗所中に保存した。3 および 6 ヶ月後に土壌をアセトンついでアセトンクロロホルムでの抽出に供した。炭酸ガス捕集液および土壌抽出液の放射活性を常法により液体シンチレーションカウンターで測定した。抽出液を濃縮し代謝物の検索に供した。また、抽出液の土壌をさらに NaOH メタノール溶液で抽出し、同様に放射活性の測定と代謝物の検索に供した。

2) 湛水状態試験(資料 14-1)

1cm に湛水した土壌を用いて 1) と同様の試験を行った。ただし、保存後の土壌は遠心分離により水と土壌に分け、水はエーテルで、土壌はアセトン、アセトンクロロホルムで抽出し、抽出液を合わせて放射活性の測定と代謝物の検索に供した。

3) 滅菌状態試験(資料 15-2)

容器に分取後オートクレーブで滅菌した土壌を用いて 1) と同様の試験を行った。

4) ポット試験(資料 14-1)

ワグネルポットで稲を栽培し、 ^{14}C -ダイムロンを加えた後、経時的に、稲をぬき取った後の土壌を採取した。

5) 代謝物の検索(資料 14-1、15-1)

土壌抽出液を濃縮し、TLC に供し、各スポット部分をかきとってクロロホルム-メタノールで抽出して放射活性を測定した。標準物質とのクロマトグラフィーおよび MS 等により代謝物を同定した。

試験結果：

1) 炭酸ガス発生と溶媒での抽出率(表 3-1)

放射性炭酸ガスの発生量はいずれの土壌、いずれの状態でも僅かであり、三紀系粘質土壌 6 ヶ月後で投与量の 1.58%を占めた他は 0.1~0.5%程度であった。

有機溶媒で抽出可能な放射活性成分の割合は、畑状態 3 ヶ月後ではすべての土壌で 87%程度の高い値であるが 6 ヶ月後には 30~55%に低下した。一方湛水状態では 3 ヶ月では 76~90%であり、6 ヶ月後には火山灰と三紀系粘質では 74%と 84%であったが、海

成砂質土壌では 57%に低下した。

表 3-1 畑及び湛水土壌における ^{14}C 量の割合(資料 14-1 の要約/本文の Table 2、3 より)

土 壌		経過日数	$^{14}\text{CO}_2$ 発生量 (%)	有機溶媒可溶 ^{14}C 量 (%)	回収率 (%)
畑 土 壌	火山灰土壌	60	0.01	86.4	86.4
		180	0.11	42.2	42.3
	三紀系粘質 土 壌	60	0.02	87.0	87.0
		180	1.58	30.0	31.6
	海成砂質 土 壌	60	0.01	87.8	87.8
		180	0.10	55.4	55.5
湛 水 土 壌	火山灰土壌	60	0.11	76.1	76.2
		180	0.35	74.1	74.4
	三紀系粘質 土 壌	60	0.12	87.2	87.4
		180	0.41	84.2	84.7
	海成砂質 土 壌	60	0.27	89.6	89.9
		180	0.49	56.8	57.3

2) 土壌抽出物中の代謝物

土壌抽出物の TLC のパターンには、土壌の種類や保存状態による大きな差はなく、6 ヶ月後の畑状態では 11~12 個、湛水状態では 9 個のスポットが検出された。これらのうち、量的に多いものは、コクロマトグラフィー等により [A] および [C] と同定された物質であり、両者あわせて抽出物中の放射活性の 16%(火山灰、湛水)~74%(三紀系、湛水)を占めていた。一方、[A] : [C] の比率は、10~13 : 87~90 であった(参考文献 3)。ついで多いのは未変化のダイムロンで 5.7%(三紀系、湛水)~76%(火山灰、湛水)を占めていた。この他、微量代謝物として、[E]、

[D]、 [F] の存在が確認された(代謝の総括の表参照)。

土壌のアルカリ抽出物の TLC では未変化のダイムロンの他、高極性の代謝物 3 種が検出されたが、その構造は不明である。

3) 滅菌土壌での変化(表 3-2)

滅菌土壌にダイムロンを添加し 360 日間保存した場合の土壌抽出液中の放射活性物質は、大部分が未変化のダイムロンで、火山灰および海成砂質土壌では 93%を占めていた。三紀系粘質土壌ではダイムロンは 58%で、[A] が 37%を占めていた。

表 3-2 滅菌土壌におけるアセトン抽出物中の ^{14}C 分布 (資料 15-2 の表)

分解物	海成砂質土壌	三紀系粘質土壌	火山灰土壌

4) ポット試験結果

有機溶媒で抽出される ^{14}C は、経時的に減少しており、土壌深部への移動はあまりみられなかった (表 3-3)。

また、有機溶媒で抽出される ^{14}C 化合物は薬剤施用後 98 日では TLC 上で 5 つあり、量的には大部分がダイムロンであった (図 3-1)。

表 3-3 ポット土壌中の経時変化と 98 日後の深さ別 ^{14}C 量
(資料 14-1 の要約/本文の Table 4)

経過日数 (日)	有機溶媒可溶 ^{14}C 量 (dpm)	
7	3235420	
14	1567576	
21	1511318	
28	2616061	
98	各層の深さ	
	0~7 cm	540833
	7~14 cm	216331
	14~20 cm	169941

5) まとめ

土壤に添加されたダイムロンは次第に分解し、また、未変化物および変化生成物の形で土壤に吸着または結合する。代謝の速さは土壤の種類および畑状態、湛水状態の差によって若干異なるが、代謝物の種類はほとんど同じで、 [A]および [C]が大部分を占め、その比率は、 [A]1に対して [C]がおよそ9であった。その他 [D]、 [E]、 [F]の他、若干の微量代謝物が生成する。尿素の炭素に由来する炭酸ガスの発生も若干認められる。滅菌土壤においては代謝物の生成が極めて少いので、土壤中での変化は主として微生物による代謝によるものと判断される。

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

4. 水中運命に関する試験

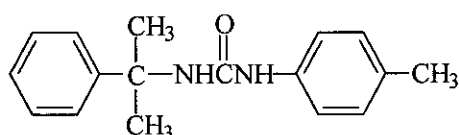
(1) 加水分解

加水分解試験

(資料 H-1)

試験機関 (株)エス・ディー・エス バイオテック
つくば研究所
報告書作成年 1992 年

供試化合物 : ダイムロン



1-(α, α -ジメチルベンジル)-3-(パラトリル)尿素

供試水溶液 : pH 4 : 0.1M 酢酸-カリウム 500ml 及び 0.1N NaOH 90ml を蒸留水で 1000ml とする。

pH 7 : リン酸 標準緩衝液(和光純薬市販品)

pH 9 : 酢酸 標準緩衝液(和光純薬市販品)

試験方法 : 500ppm のダイムロン標準エタノール溶液 1 ml ずつを 3 本の 500ml 容メスフラスコに秤り取り、各々 pH 4、pH 7、pH 9 の各緩衝液で定容し、1ppm の試験溶液とする。これらの試験溶液を、メスシリンダーを用いてそれぞれ 12 本ずつの共栓付試験管に約 25ml ずつ分注し、直ちに栓をする。栓の部分はパラフィルムで封じ、逆さにして試験管立てに立てる。これを、底に少量の水を張ったクーラーボックス内に収納し、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温室に設置する。

試験開始直後、1 週間後、2 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後にそれぞれ 2 連ずつサンプリングする。

試験溶液中より 20ml をエキストレルートカラムにチャージし、10~15 分間放置後 60ml のクロロホルムを用いて液-液抽出を行い、溶媒留去後、メタノール 5ml に溶解する。この $30 \mu\text{l}$ を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムピーク面積よりダイムロン濃度を算出する。

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

結 果 : 試験結果を以下に示す。

(ppm)

経過日数	pH 4.0	pH 6.9	pH 9.2
直後	0.952	0.920	0.960
1週間後	0.888	0.887	0.939
2週間後	0.877	0.878	0.930
1ヶ月後	0.836	0.887	0.950
3ヶ月後	0.708	0.894	0.942
6ヶ月後	0.546	0.892	0.932

試験の初期濃度 : 1.00ppm

試験温度 : 25°C

試験期間 : ' 91.7~' 92.1

pH 4 では、6ヶ月間で約半分程度に加水分解されて減衰した。この場合のダイムロンの推定半減期は、グラフの外挿より 7.2ヶ月であった。pH 7 または pH 9 では、ダイムロンは水溶液中で加水分解されにくく安定であることが明らかになった。

加水分解運命試験

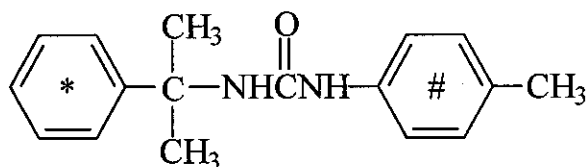
(資料 H-2)

試験機関：Huntingdon Life Sciences(英国)

報告書作成年：2005 年

供試標識化合物：

化学構造：



* : [フェニルエチル- $U-^{14}C$]標識位置を示す。

: [トリル- $U-^{14}C$]標識位置を示す。

化学名： 1-(α, α -ジメチルベンジル)-3-*p*-トリル尿素

比放射能： [フェニルエチル- $U-^{14}C$]ダイムロン：

[トリル- $U-^{14}C$]ダイムロン：

放射化学的純度： [フェニルエチル- $U-^{14}C$]ダイムロン：

[トリル- $U-^{14}C$]ダイムロン：

標識位置の選定理由：

供試水溶液： pH 4.0 の 0.01 M 酢酸塩緩衝液*

試験方法：

試験溶液の調製： 両標識化合物をそれぞれアセトニトリルに溶解して、約 0.120 mg/mL の濃度の原液を調製し、各 750 μ L を、滅菌し、窒素ガスを通して酸素を除去した上記緩衝液の 150 mL に加えて試験溶液を調製した。両標識化合物の最終濃度はそれぞれ約 0.6 mg/L となり(被験物質の水溶解度の約 1/2)、溶媒アセトニトリルの濃度は 0.5% (容積比)となった。

処理方法： テフロンライニングしたスクリーキャップ装着のホウケイ酸ガラス製の容量 10 mL の試験管に、上記の試験溶液 10 mL を充填し、蓋をして 25 \pm 1 $^{\circ}$ C の暗所で最長 30 日間インキュベーションした。

試料の採取及び分析： 被験物質の処理後 0 (処理直後)、1、3、7、14、21 及び 30 日に分析用に試験溶液を採取した。それぞれ液体シンチレーションカウンター(LSC)による放射能測定並びに薄層

* : (申請者註) 標識化合物を用いなかった加水分解試験で、pH 7 および 9 では分解しないことが判明しているので、ここでは pH 4 のみについて試験を実施した。

クロマトグラフィー (TLC) 及高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により親化合物の分解並びに分解物の生成および減衰を調べ、分解物の同定を行った。また、試験溶液の無菌性および pH についても確認した。

なお、予備試験の結果では揮発性物質の生成が認められなかったため、本試験では気体捕集は行わなかった。

試験結果：

1) 分布

HPLC により認められた各成分とその量の経時的变化を下表に示した。

成 分	インキュベーション時間 (日)						
	0	1	3	7	14	21	30
([フェニルエチル-U- ¹⁴ C]標識体)							
([トリル-U- ¹⁴ C]標識体)							

数値はHPLCにおける% (この数値は全体の回収率からこのまま処理放射能に対する%とみなされた。)

親化合物ダイムロンの 30 日後の存在率は、両標識体共に、処理放射能の約 90%であった。

加水分解物は 30 日後に両標識体について数種が検出されたが、同定可能な分解物はそれぞれ 1 種類であり、コクロマトグラフィーにより [フェニルエチル-U-¹⁴C] 標識体処理溶液中では (本抄録の J) が、[トリル-U-¹⁴C] 標識体処理溶液中では

(本抄録の A) が同定された。両分解物の最大値は、共に 30 日後で処理放射能の 8.0%であった。その他の未知分解物は、両標識体溶液中で最大でも単独では処理放射能の 0.7%に過ぎなかった。

なお、各標識体について経時的な物質収支を次表に示した。全体として各処理溶液から処理放射能の 97.9~101.8%の回収率が得られた。このことから HPLC における%値はそのまま処理放射能に対する%とみなされた。

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

処理後 経過日数	[フェニルエチル-U- ¹⁴ C]標識体 処理溶液からの回収率(%)	[トリル-U- ¹⁴ C]標識体 処理溶液からの回収率(%)
0	98.2	98.3
1	98.6	99.1
3	99.3	98.7
7	98.6	97.9
14	100.7	101.8
21	101.4	100.4
30	102.0	99.8

単位：処理放射能に対する%

2) 代謝

想定分解経路を下に示す。加水分解はダイムロンの尿素結合部分で生じることが判明した。

3) 推定半減期

試験温度	pH	推定半減期	
		[フェニルエチル-U- ¹⁴ C]標識体：	228 日
25°C	4.0	[トリル-U- ¹⁴ C]標識体：	239 日
		平均：	234 日

(2) 水中光分解

水中光分解試験

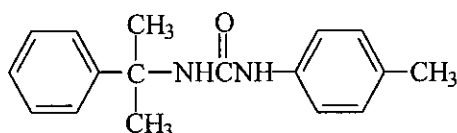
(資料 L-1)

試験機関 (株)エス・ディー・エス バイオテック

つくば研究所

報告書作成年 1992 年

供試化合物 : ダイムロン



1-(α , α -ジメチルベンジル)-3-(p -トリル)尿素

供試水 : 滅菌蒸留水 (pH 6.23、オートクレーブ滅菌)

自然水 (採取場所: 荒川水系秋ヶ瀬取水口/採取年月日: 1992 年 4 月 18 日、pH 7.21、
無滅菌)

光源 : 蛍光ケミカルランプ (東芝 FL-20S-BL)、光学フィルタ無使用

光量 : 滅菌蒸留水 23 W/m² (2.3 mW/cm²、300-400 nm)

自然水 22 W/m² (2.2 mW/cm²、300-400 nm)

試験方法:

光分解 ; 蒸留水あるいは自然水を用いて、検体 1.0ppm 水溶液(助剤としてエタノール)を調製し試験溶液とした。試験溶液を共栓付の石英あるいは硬質ガラス試験管各 10 本に 30ml ずつ分注した。栓をし、シーロンフィルムで密封した。石英製試験管は試験区とし栓を下に向け静置し、光を照射した。硬質ガラス製試験管は対照区として逆さに試験管立てに立て、底に少量の水を張ったクーラーボックス中に遮光して保存した。光照射期間は滅菌蒸留水では 7 日間、自然水では 6 日間であった。また、この間の温度は 24~26°C であった。

分析方法 ; 直後、1、2、4 および、6 または 7 日に採取した試料を直接液体クロマトグラフに注入した。

半減期の計算；自然水の試験について、光照射によるダイムロンの減衰は擬似一次反応によると仮定し、最小二乗法による直線回帰式からその傾き $-k$ を求め、次式により半減期を求めた。

$$t_{1/2} = \ln(1/2) / -k = \ln(2) / k = 0.693 / k$$

結果：蒸留水と自然水を用いた結果を以下に示す。

表 1. ダイムロンの濃度変化

供試水	処理後日数	光照射区	暗所対照区
		平均値 (ppm)	平均値 (ppm)
蒸留水	直後	0.76	0.76
	1日後	0.76	0.79
	2日後	0.76	0.76
	4日後	0.78	0.82
	7日後	0.79	0.77
自然水	直後	1.04	1.04
	1時間後	1.04	1.08
	2日後	0.82	1.11
	4日後	0.30	1.16
	6日後	0.03	1.20

以上の結果、光照射区において、蒸留水ではほとんど分解は認められないが、自然水では分解が認められ、その半減期は人工光で 28.3 時間、東京春季太陽光換算で 3.3 日と推定された。一方、暗所対照区において、蒸留水および自然水ともに分解は認められなかった。

表 2. 蒸留水中の光分解に係る推定半減期

半減期 (DT ₅₀)	
人工光	太陽光換算値*
28.3 時間	3.3 日

* : 東京(北緯 35°)の春季太陽光

自然水中光分解運命試験

(資料 L-2)

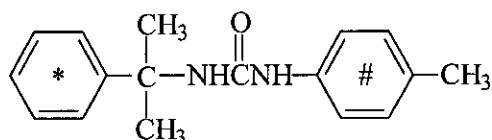
試験機関：ハンティンドン ライフサイエンス社(英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

化学構造：



* : [フェニルエチル-U-¹⁴C]標識位置を示す。

: [トリル-U-¹⁴C]標識位置を示す。

化学名： 1-(α , α -ジメチルベンジル)-3-*p*-トリル尿素

比放射能：[フェニルエチル-U-¹⁴C]ダイムロン：

[トリル-U-¹⁴C]ダイムロン：

放射化学的純度：[フェニルエチル-U-¹⁴C]ダイムロン：

[トリル-U-¹⁴C]ダイムロン：

標識位置の選定理由：

供試水[§]：

自然水；英国 Cambridgeshire, Huntingdon River Great Ouse から 2005 年 1 月 24 日に河川水を採取し、212 μ m のフィルターを通過させて水中に懸濁する固形物を除去した後、4°C で暗所に保存し、検体処理の直前に除菌フィルターでろ過滅菌した。供試水の特性は以下のとおりであった。290-750nm の波長域における UV/VIS 吸収スペクトルについても測定した。

pH	6.94 ^a	電気伝導度 (mS) ^b	0.91
溶存酸素量 (飽和量に対する%)	69.2 ^a	全蒸発物質濃度 (g/L) ^b	0.62
総懸濁物質濃度 (g/L) ^b	0.0002	総溶存有機炭素濃度 (mgC/L)	60.9

a：採水時、フィルター通過前に測定した。 b：滅菌後に測定した。

光源及び装置：キセノンアーク光源を装着し、フィルターで波長 290 nm 未満の紫外線をカットし

[§]：蒸留水については非標識体を用いた試験で既に水中光分解をしないことが判明しているため此処で試験されなかった。(申請者)

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

て自然光に類似するスペクトルの光を発する Suntest 光暴露装置を用いた。

光強度： 照射期間内の平均光強度(波長範囲 300~400 nm)は、42.0W/m²であった。

試験方法：

予備試験；光照射期間及び揮発性物質捕集の必要性を検討するため、標識位置が異なる2種の供試化合物を自然水に溶解し、光暴露装置に接続した揮発性物質捕集トラップ3基(エチルジゴールを充填したトラップ1基及び1モル水酸化カリウム充填トラップ2基)を接続して0、1及び3時間光照射後に供試水及び揮発性物質の放射能を測定した。

この結果、放射能回収率は処理放射能に対して85.9~100.9%で、1日光照射後にダイムロンは処理放射能に対して31~41%に低下した。この時点では放射能を有する揮発性物質は検出されなかった。3日間連続光照射後、ダイムロンは完全に分解した。揮発性物質の発生量は、[フェニルエチル-U-¹⁴C]標識体由来で処理放射能に対して0.3%、[トリル-U-¹⁴C]標識体では3.4%であった。この結果に基づいて、本試験の光照射期間を48時間とし、揮発性物質の捕集は実施しなかった。

試験液；各供試標識化合物のアセトニトリル溶液(濃度0.120mg/mL)を調製し、この溶液2mLを滅菌自然水400mLにそれぞれ加えて、ダイムロン濃度が水溶解度の50%に相当する0.6mg/Lの試験液を調製した。

試験容器；内径2.5cm、高さ8.5cmの珪酸ガラス製(ただし入光部は石英ガラス製)円筒容器を用い、各容器に試験液20mLを入れた。容器内で試験液は約4cmの高さとなり、この容器は光暴露装置の水冷ブロック内に設置し、光を容器の上から下へ通過させた。容器内に磁性攪拌棒を入れ、インキュベーション期間中、試験液を攪拌し続けた。

インキュベーション；光照射対象の試験液を25±2℃に維持し、連続して光を照射した。暗所対照の試験液も同じ温度範囲に設定してインキュベーションした。

試料採取；光照射開始前(0時間)、光照射開始後4、8、16、24、36及び48時間に試料を採取した。これらの光照射時間は、北緯35度の東京における春季太陽光に換算すると、それぞれ0、0.89、1.80、3.60、5.40、8.10及び10.80日に相当した。

暗所対照試験液についても同じ時点で試料を採取した。

無菌検査及びpH測定；試験液試料をトリプトン大豆寒天平板培地上で、30~35℃、5日間培養後にコロニーの有無を観察した。試験液のpHはpHメーターで測定した。

放射能測定；試料にUltima Goldシンチレーターを添加し、自動クエンチング補正付きの液体シンチレーションカウンター(LSC)を用いて試料の放射能を測定した。バックグラウンド値の2倍を定量限界とした。

放射性成分の分析；全ての試料について、逆相溶媒系(メタノール/水=90:10あるいは60:40)及び順相溶媒系(酢酸エチル/アンモニア=16:1)の薄層クロマトグラフィー(TLC)で定量した。

同定；放射能検出器付きHPLC及びTLCのコクロマトグラフィーを用いて既存の標準品と比較した。分解物UT3及びUT7については2次元TLCにより、それらに含まれる成分の分離

を試みた。

さらに、[トリル-U-¹⁴C]標識供試化合物濃度 6 及び 60mg/L の自然水溶液を調製し、約 5 日間光照射後、試験液を凍結乾燥させ、TLC で展開して分解物 UT3 及び UT7 が認められたシリカを分取し、それぞれのメタノール抽出物を質量分析器付き液体クロマトグラフィー(LC-MS)で分析した。

半減期の計算；光照射によるダイムロンの減衰データを以下の計算式による一次カイネティックモデルに適用して、半減期(DT₅₀)及び90%減衰期(DT₉₀)を計算した。

$$C_t = C_0 \times e^{-kt}$$

これを変換した[lnC_t=lnC₀-kt]に各時点の数値を入れて勾配-kを求め、

$$DT_{50} = \frac{\ln 2}{k} \quad , \quad DT_{90} = \frac{\ln 10}{k} \quad \text{により算出する。}$$

但し、 C_t : t 時間におけるダイムロンの割合

C₀ : 0 時間におけるダイムロンの割合

k : 速度定数

t : 時間

結 果 :

無菌検査及び pH ; 全ての試験における試験液の無菌が確認された。

試験液の pH は 7.51~7.82 の範囲内であった。

放射性物質の回収率 ; 表 1 に放射性物質の回収率(物質収支)を示す。回収率は、光照射した[フェニルエチル-U-¹⁴C]標識体試験液で 96.7~101.1%、[トリル-U-¹⁴C]標識体で 97.6~99.7%、暗所対照試験液ではそれぞれ 99.0~101.3%、97.6~101.7%であった。

放射性成分の分布 ; 表 1 に各時点における親化合物および各分解成分の分布を示す。[フェニルエチル-U-¹⁴C]標識体及び[トリル-U-¹⁴C]標識体のいずれを用いた試験においても、ダイムロンは速やかに光分解し、多数の化合物が検出された。光照射 48 時間後におけるダイムロンの割合は[フェニルエチル-U-¹⁴C]標識体及び[トリル-U-¹⁴C]標識体でそれぞれ処理放射能の 8.0%、3.9%に低下したが、暗所条件下ではそれぞれ 98.5%、99.5%が残存し、分解はほとんど認められなかった。

主な分解物として、[フェニルエチル-U-¹⁴C]標識体由来の

(D-5)が光照射 48 時間後に処理放射能に対して 71.5%の割合で定量された。[トリル-U-¹⁴C]標識体由来の主な分解物の割合は未同定のトリル環化合物(UT7c)が光照射 48 時間後に 52.1%、(D-6)が最大 4.4%、構造が推定された分解成分(略号 : UT3)が 48 時間後に 7.7%であった。さらに他の分解成分として

(D-3)が同定されたが量は痕跡程度であつ

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

た。D-5 及び D-6 それぞれを經由した既知の加水分解物、すなわち
及び は、本試験では検出されなかった。

想定代謝経路を図 1 に示す。

半減期;表 2 に半減期 (DT_{50}) 及び 90% 減衰期 (DT_{90}) を示す。自然水溶液中の光分解半減期及び 90% 減衰期はそれぞれ 11.91 時間及び 39.55 時間で、これらを東京における春季の太陽光照射に換算すると 2.68 日及び 8.90 日となった。

表 1. 放射性成分の分布、および、回収率

(1) [フェニルエチル- $U-^{14}C$]標識化合物

処理放射能に対する割合 (%)

処理条件	成分	Rf 値	処理時間(時間)						
			0	4	8	16	24	36	48
光照射									
	放射性物質の回収率 [#]		99.5	97.5	100.4	100.8	96.7	101.1	98.5
暗所									
	放射性物質の回収率 [#]		99.5	99.0	100.6	101.1	99.6	100.0	101.3

* : 分離した放射性成分を含まないクロマトグラム上の領域。 nd : 検出せず。

: 別測定であることから各成分の合計とは必ずしも一致しない。

(2) [トリル-U-¹⁴C]標識化合物

処理放射能に対する割合 (%)

処理条件	成分	Rf 値	処理時間 (時間)						
			0	4	8	16	24	36	48
光照射									
	放射性物質の回収率 [#]		97.6	98.4	99.7	98.8	98.8	98.4	99.1
暗所									
	放射性物質の回収率 [#]		97.6	97.9	99.7	99.0	101.5	101.5	101.7

* : 分離した放射性成分を含まないクロマトグラム上の領域。 nd : 検出せず。

: 別測定であることから各成分の合計とは必ずしも一致しない。

表 2. 自然水中の光分解に係る推定半減期および 90% 減衰期

半減期 (DT ₅₀)		90% 減衰期 (DT ₉₀)	
人工光	太陽光換算値**	人工光	太陽光換算値**
11.91 時間	2.68 日	39.55 時間	8.90 日

** : 東京 (北緯 35°) の春季太陽光

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

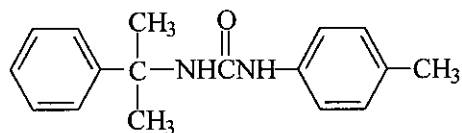
図 1. 想定代謝分解経路

5. 土壌吸着試験

(資料 K-1)

試験機関 (株)エス・ディー・エス バイオテック
東京研究所
報告書作成年 1990年

供試化合物 : ダイムロン(純度 99.8%)



1-(α, α -ジメチルベンジル)-3-(パラトリル)尿素

供試土壌 :

項目	I	II	III	IV
土壌 No.	2	3	6	9
土壌群名	細粒強グライ土			
採取場所	植調古川 試験地	新潟第一 試験地	植調研究所 圃場	宮崎試験場内
土性	LiC	LiC	LiC	LiC
砂%	14.0	24.4	28.0	73.2
シルト%	44.1	44.5	35.4	13.5
粘土%	41.9	31.1	36.6	13.3
有機炭素含有率%	3.37	1.23	2.60	1.49
pH H ₂ O	5.7	6.6	6.7	6.0
KCl	4.9	5.4	6.0	5.5
陽イオン交換容量	27.7	21.5	21.5	8.3
りん酸吸収係数	830	790	820	490
粘土鉱物の種類	モンモロライト カオリン鉱物	モンモロライト カオリン鉱物	モンモロライト カオリン鉱物	カオリン鉱物 パーミキュライト
土壌水分含量%	4.3	3.5	4.8	1.7

陽イオン交換容量の単位 : me/100g

試験方法：

吸着平衡化時間の測定；各土壌 5g を 200ml 容蓋付遠沈管に秤り取り、これに蒸留水 10ml を加え室温で 24 時間ゆっくり振とうする。これに、ダイムロン 0.25ppm の 0.01M CaCl₂ 標準溶液 100ml を加えて密栓し、25±1℃で振とうする。3、8、16 時間後にそれぞれサンプリングし、遠心分離した後、上澄み液の 100ml を分取して水相の分析と同様に操作し、各時間における水相中のダイムロンの濃度を求める。ダイムロンの水相濃度の変化率は次式により求める。

$$\text{変化率} = \left[\frac{\{(n \text{ 回時の濃度}) - (n-1 \text{ 回時の濃度})\}}{(n-1 \text{ 回時の濃度})} \right] \times 100$$

この変化率が 10%以内になった経過時間を平衡化時間とする。

物質収支；物質収支は、吸着平衡化後の水相及び土壌中のダイムロン量を測定して両者を加え、添加したダイムロン量で割って求める。各土壌とも、0.25ppm の 0.01M CaCl₂ 標準溶液を添加したサンプルについて測定した。その結果を次表に示す。

土壌 No.	初期添加量 (ug) a	残留物中物質質量 (ug)	残留物の水分中物質質量 (ug)	土壌吸着量 (ug) b	水相中物質質量 (ug) c	物質収支 (b+c)/a ×100 (%)	物質収支平均 (%)
I (No. 2)	25.0	14.5	0.86	13.6	9.54	93.6	94.4
	25.0	14.7	0.83	13.9	9.77	95.2	
II (No. 3)	25.0	11.2	1.11	10.1	13.2	94.0	94.2
	25.0	11.4	1.13	10.3	13.2	94.3	
III (No. 6)	25.0	12.5	1.03	11.5	11.3	91.6	91.6
	25.0	12.7	0.99	11.7	11.0	91.5	
IV (No. 9)	25.0	8.66	1.52	7.14	15.8	93.2	92.7
	25.0	8.61	1.32	7.29	15.6	92.2	

吸着操作；土壌 5g を 200ml 容蓋付遠沈管に秤り取り、これに蒸留水 10g を加え、室温で 24 時間ゆっくり振とうさせる。これに、所定濃度のダイムロンの 0.01M CaCl₂ 標準溶液 100ml を添加して密栓し、25±1℃で 16 時間振とうする。振とう後、遠心分離 (25±1℃、10000rpm、10 分) を行い、上澄み液より 100ml を分取し、水相の分析に供して水相濃度を求める。水相濃度と水分量より、水相に存在するダイムロン量を求め、添加量からこれを減じて土壌吸着量を算出する。なお、添加ダイムロン溶液は、0.50、0.25、0.125 及び 0.0625ppm の 4 濃度を用いた。

分析方法；水相試料はクロロホルムで抽出し、濃縮乾固後 10% IPA 含有 n-ヘキサンに溶解し、これを液体クロマトグラフに注入する。土壌試料はメタノールで抽出し、クロロホルムに転容、減圧留去後、10% IPA 含有 n-ヘキサンに溶解し、液体クロマトグラフに注入する。

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

結 果 : 試験結果は以下の通りである。

(1) K及びK o c'

土壌	1/n ¹⁾	K ¹⁾	r ¹⁾	o c % ²⁾	K o c' ³⁾
I	0.9667	32.06	0.9998	3.37	951.3
II	0.8836	14.92	0.9997	1.23	1213
III	0.8472	19.02	0.9978	2.60	731.5
IV	1.025	12.86	0.9990	1.49	863.1

¹⁾ Freundlich の吸着等温式による定数項と相関係数

²⁾ 土壌中の有機炭素含有率

³⁾ Kを各土壌のo c %で割り求めた有機炭素吸着係数

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

(2) 吸着平衡化時間

土壌 No.	振とう時間 (時間)	水相中のダイムロン濃度 (ug/g)		*変化率 (%)
		実測値	平均	
I (No. 2)	3	0.117 , 0.104	0.110	-
	8	0.094 , 0.094	0.094	-14.4
	16	0.092 , 0.092	0.092	-2.3
II (No. 3)	3	0.151 , 0.135	0.143	-
	8	0.128 , 0.127	0.128	-12.6
	16	0.125 , 0.125	0.125	-2.4
III (No. 6)	3	0.137 , 0.134	0.136	-
	8	0.101 , 0.100	0.100	-26.5
	16	0.090 , 0.090	0.090	-10.0
IV (No. 9)	3	0.173 , 0.173	0.173	-
	8	0.155 , 0.154	0.154	-12.1
	16	0.147 , 0.147	0.147	-4.5

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

各土壌とも、16時間の振とうで水相中のダイムロン濃度の変化率が10%以下になったので16時間を平衡時間とした。

ダイムロンの土壌、水および生物体内での代謝・運命の総括

ダイムロンは土壌処理によって使用される尿素系除草剤である。既存の尿素系除草剤には monuron、diuron、linuron 等があるが、これらはジメチル尿素の誘導体であるのに対し、ダイムロンはクミル基とトリル基の2つの芳香基を有することが特徴である。

土壌に施用されたダイムロンは主として微生物によって代謝され、また未変化物および代謝物は次第に土壌成分に吸着されあるいは結合する。ダイムロンの土壌への吸着は土壌の有機炭素含有率(oc%)と高い相関($r=0.92$)があり、土壌吸着係数(K_{oc})は8.0であった。土壌中の主たる代謝経路は尿素の一方の置換基の脱離であり、これにより [A]、 [C]、

[B]が生成する。なかでも [C]がおよそ9割を占める。monuron 等ではジメチル基の炭素の水酸化を経て脱メチルが主経路であるが、置換フェニルウレアを生成する点では共通している。他の経路として p-トリル基のメチル基の水酸化、酸化および芳香環の水酸化があるが量的には少ない。

水中でのダイムロンは pH が中性からアルカリ域では安定で加水分解を起さず、酸性域でゆっくり分解する。pH4 では推定半減期7.2ヶ月もしくは234日であり、尿素結合部分で加水分解され、 [A]と [K]が生成する。また、中性域で光を照射した場合、蒸留水では分解しないのに対し自然水を用いた場合には分解し、その半減期は東京春季太陽光換算で3.3日または2.68日であった。水中光分解物として、 [A]、

[E]と [J]が生成する。いずれの水においても光照射がない場合は分解を示さなかった。これらの水中光分解試験の結果から、水中のダイムロンの分解は間接光分解によると考えられ、自然条件下では、ダイムロンは光のもとで速やかに分解されると考えられる。

ダイムロンは植物の根から容易に吸収され、地上部へ求頂的に移行する。水耕栽培試験において、水耕液中に [A]が多量に生成するにもかかわらず、イネ体での存在量が少ないことからみて、土壌中での代謝物はダイムロンに比べて植物に吸収されにくいものと思われる。植物に吸収されたダイムロンは植物により急速に代謝される。その主経路は土壌中とは異なり、p-トリル基のメチル基の水酸化と抱合化であり、 [D]を経てそのグルコシドを生成する。その他の代謝物としては [F]、 [E]、 [A]の存在が確認されたが、その量は僅かである。水耕液への漏出試験の結果からみると、生成した [] や [] の抱合体は根から排出されると推定される。

ダイムロンは動物によって経口摂取されると消化管から急速に吸収され代謝される。代謝の主経路は p-トリル基のメチル基の急速な酸化であり、おそらく [] を経て [E]が生成する。この代謝物は尿中代謝物の87%を占めていた。

[E]は抱合体として胆汁に排泄され、消化管に排泄されたこの化合物は再び消化管から吸収される。 [A]、 [C]は尿中からは検出されなかった。しかし、 [I]、 [G]が尿中から検出されているので、尿素から芳香環が脱離する代謝経路も存在するものと思われる。ダイムロンおよびその代謝物は尿、胆汁、糞により急速に排泄され、特定臓器への親和性や体内での滞留性はほとんどないと判断される。

ダイムロンの使用対象の食用作物はイネであり、通常の使用方法での収穫期の玄米での残留量は、標識化合物を用いたポット栽培試験の結果では全放射活性物質をダイムロンに換算した値で、0.033ppm であった。その化学状態は明らかではないが、水耕試験の結果からみて、ダイムロンと [] の抱合体が大部分を占めていると推定される。

[D]の存在はラットの尿中では確認されていないが、これは動物体内ではヒドロキシメチル基からカルボキシル基への酸化が極めて速やかであるためと推定される。したがって

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

[D]の毒性は、ダイムロンの毒性試験結果から評価しうるものとする。

[A]が植物体に存在することも確認されているが、その量は前2者に比べ1/10程度であり、またその毒性は低い(急性経口 LD₅₀ 1,200mg/kg、ラット)。

現在までに実施された作物残留試験では未変化のダイムロンのみを定量している。植物中のダイムロンとグルコシドの存在比はほぼ等しい。0.033ppmのダイムロンおよび代謝物の残留する米を1日185.1g摂取した場合の残留物の摂取量は0.0061mg/人(0.00011mg/kg)以下であり、毒性試験からのADI(0.30mg/kg)よりもはるかに低い。これらの点からみて、ダイムロンのみを定量しても大きな支障はないと考える。

表1 ラットにおける排泄と臓器内残留量

表2 収穫時のイネ体における残留量

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

表 3 代謝物の存在率

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

ダイムロンの動植物等における代謝・分解経路図

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

[附] ダイムロンの開発年表