

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある
デスメディファムのマウスリンパ腫L5178Y細胞を用いた遺伝子突然変異原性試験

(毒性資料No.原体-37)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1984年

検体の純度: 98%

試験方法: 継代培養したマウスリンパ腫細胞L5178Y TK+/- (チミジンキナーゼ) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化系(S9mix)の存在下及び非存在下で、TK遺伝子座の遺伝子突然変異試験を行った。用量設定試験に基づいて独立した2試験を以下の濃度で実施した。

1回目試験: 6.3、12.5、25、50、100、200 μ g/mL

2回目試験: 20、40、60、80、100、120 μ g/mL

検体処理時間は37°Cで4時間とした。その後2日間の突然変異発現時間を経て、トリフルオロチミジン(TFT)を含む選択培地に再播種し、さらに37°Cで11日間培養後に突然変異コロニーを計数した。またTFTを含まない培地に細胞を播種し生存率を求めた。溶媒対照群1群、陽性対照群として、メチルメタンスルホネート(MMS; 非代謝活性化)、3-メチルコラントレン(3-MC; 代謝活性化)それぞれ1群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。

細胞毒性 用量設定試験

0.48、4.8、48、480及び4800 μ g/mLの用量で代謝活性化の存在及び非存在下、37°C、4時間検体処理後、2日間培養し毎日細胞を計数して毒性を調べた。その結果代謝活性化の存在の有無にかかわらず480 μ g/mL以上の区で全細胞が生存できず、また検体の沈殿が認められた。

結果の判定 溶媒対照の10%以上の平均生存コロニー数が認められ、突然変異誘発頻度が 10×10^{-5} 以上認められた場合に有意な増加とした。また3つ高用量のうち1以上の用量で有意な増加がみられ、この増加に用量関連性が認められた場合、その試験結果を陽性とした。さらに独立した2つの試験で同一の代謝活性化条件で陽性の結果がみられた場合、当該化合物の変異原性は陽性と判断した。

試験結果: 結果を表に示す。

1回目の試験では、代謝活性化系の有無にかかわらず、最高濃度100 μ g/mL区で変異コロニー数および突然変異誘発頻度に溶媒対照値を超えた有意な増加が認められた。2回目の試験では、代謝活性化系存在下の検体処理区で変異コロニー数および突然変異誘発頻度に用量関連性のある増加が認められ、80および100 μ g/mL区では溶媒対照値を超えた有意な増加が認められた。代謝活性化系非存在下では最高濃度の100 μ g/mL区で有意な増加が認められた。

一方、陽性対照では1回目の試験のMMSの代謝活性化系非存在下で突然変異誘発頻度が $16/10^{-5}$ より低かったが、検体処理区で陽性反応が得られたため、この試験を無効とは判断しなかった。この他の陽性対照区では突然変異誘発頻度は増加した。

以上の結果より、本試験条件下において検体のマウスリンパ腫細胞L5178Yを用いた突然変異性は陽性であり、変異原性はありと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

表1 マウスリンパ腫細胞を用いた突然変異原性試験結果 (第1回目の試験結果)

薬物	濃度 μg/mL	S-9 mix の有無	平均生存コロニー数	相対的 総増殖率 (RTG%)	変異 コロニー数	突然変異誘発 頻度(×10 ⁻⁵)
陰性対照DMSO			115	100	35	6
			122		33	5
陽性対照MMS	15		100	101	23	5
			107	85	32	6
検体 (4時間暴露)	6.3	-	93	114	25	5
	12.5		105	85	41	8
	25		63	63	22	7
	50		90	64	37	8
	100		98	39	60	12
	200*		—	—	—	—
	陰性対照(DMSO)				181	100
			180	24	3	
陽性対照3-MC	2.5		108	32	192	36
			89	30	157	35
検体 (4時間暴露)	6.3	+	132	81	27	4
	12.5		111	60	33	6
	25		101	68	24	5
	50		106	54	41	8
	100		97	31	54	11
	120		—	—	—	—
					—	—

MMS : Methyl methanesulphonate、3-MC : 3-Methylcholanthrene

* : 全細胞生存できず

表2 マウスリンパ腫細胞を用いた突然変異原性試験結果 (第2回目の試験結果)

薬物	濃度 μg/mL	S-9 mix の有無	平均生存コロニー数	相対的 総増殖率 (RTG%)	変異 コロニー数	突然変異誘発 頻度(×10 ⁻⁵)
陰性対照(DMSO)			134	100	53	8
			167		48	6
陽性対照MMS	15		51	21	86	34
			58	33	85	29
検体 (4時間暴露)	20	-	117	94	25	4
	40		155	79	55	7
	60		151	68	44	6
	80		121	50	61	10
	100		66	6	122	37
	120		NP	NP	NP	NP
					—	—
陰性対照DMSO			176	100	45	5
			142		29	4
陽性対照3-MC	2.5		122	37	201	33
			115	38	207	36
検体 (4時間暴露)	20	+	159	84	52	7
	40		162	82	63	8
	60		133	45	59	9
	80		121	37	117	19
	100		44	2	97	44
	120*		—	—	—	—
					—	—

MMS : Methyl methanesulphonate、3-MC : 3-Methylcholanthrene

* : 全細胞生存できず。 NP : 突然変異発現時間以降播種しなかった。

デスメディファムの CHO 細胞—HGPRT 法による in vitro 変異原性誘発試験

(毒性資料 No. 原体-38)

試験機関：

報告書作成年： 1991 年 [GLP 対応]

検体の純度：不明

試験系：チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)

試験方法：

CHO 細胞の HGPRT 座における突然変異原性を in vitro 条件下で評価した。検体の濃度は S9 mix 非存在下/存在下で 10 μ g/mL から 320 μ g/mL の範囲の 5 濃度を設定した。その他、溶媒対照群 1 群、陽性対照群として、エチルメタンスルホネート (EMS; 非代謝活性化)、3-メチルコラントレン (3MC; 代謝活性化) それぞれ 1 群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

細胞毒性 試験用量設定試験

1 \times 10⁷ 細胞の V79 細胞を培養用培地に入れて、S9 mix 非存在下及び存在下、検体濃度 0.5, 5, 50, 500 及び 5000 μ g/mL で 37 $^{\circ}$ C、5 時間暴露させ回転培養した。培地で洗浄後、2 \times 10⁵ 個/ml に希釈した。37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後 1 \times 10⁵ 個/ml に調製し、さらに 24 時間培養して細胞数を計測した。その結果から変異原性試験用に以下の濃度を設定した。

試験 1 (S9 mix 非存在下)：10、20、40、80、160 及び 320 μ g/mL

試験 2 (S9 mix 非存在下)：25、40、55、70、85 及び 100 μ g/mL

試験 3 (S9 mix 存在下)：25、40、55、70 及び 85 μ g/mL

試験 4 (S9 mix 存在下)：10、25、40、55 及び 70 μ g/mL

突然変異試験

検体処理区は各濃度について 2 反復、培養液を設定した。上記の用量で 5 時間培養後、細胞を培地で洗浄し 2 \times 10⁵ 個/ml になるように培地に再懸濁した。この一部から 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を再播種し約 14 日間培養して、コロニー数を算定し、0 日のコロニー形成率を算出した。

突然変異発現

残りの細胞は 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養して 1 \times 10⁵ 個/ml に調製した。この手順は暴露終了後 7 日間経過するまで 48 時間ごとに繰り返された。

コロニー形成率

発現時間終了時に細胞数を計測後、一部の細胞懸濁液を 2 \times 10³ 個/ml に希釈した。3 枚のペトリ皿に播種して 7 日のコロニー形成率を計測した。

突然変異体の選択

残りの培養液は 2×10^5 個/ml になるように希釈後、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の 6-チオグアニン (6-TG) を添加した培養液と混合し 5 枚のペトリ皿で 37°C 、約 14 日間培養した。培養後 6-TG 抵抗性コロニー数を計測した。

試験結果：

1. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。 $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 区では変異率が増加したが、相対総増殖率が 1% 未満だったので、評価の対象としなかった。

陽性対照群の EMS は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。従って、検体は本非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

2. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。 $55 \mu\text{g}/\text{mL}$ 区では変異率が増加したが、用量関連性が認められず、試験 4 では再現されていないこと、また相対総増殖率が 4% と低かったことから、有意な増加ではないと判断した。

従って、検体は本代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

陽性対照物質の 3-MC は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、CHO-HPRT 突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

非代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験①				試験②			
		生存 コロニー数	相対総 増殖率	変異 コロニー数	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対総 増殖率	変異 コロニー数	変異率 ×10 ⁻⁶
溶媒対照 (DMSO)	0	126.3	100	3.5	10.5	106.3	100.3	8	10.3
陽性対照 EMS	200	118	113	29.5	48	80	45.3	60.7	155.7
検体	10	88.5	39	4	9	/	/	/	/
	20	126.5	70.5	1	1.5	/	/	/	/
	25	/	/	/	/	108.5	48.5	3	5
	40	145	74.5	1.5	2	100	44.5	1	2
	55	/	/	/	/	102	2	5.5	10.5
	70	/	/	/	/	108	0.1	12.5	24*
	80**	140	2	1	1	/	/	/	/
	85	/	/	/	/	NP	-	NP	-
	100	/	/	/	/	NP	-	NP	-
	160	NP	-	NP	-	/	/	/	/
320	NP	-	NP	-	/	/	/	/	

1 反復が 5 ペトリ皿 (生存コロニー数は 3 ペトリ皿) からなる 2 反復の平均 (溶媒対照は 4 または 3 反復、陽性対照は 3 または 2 反復) コロニー数

EMS : エチルメタンサルホネート

NP : 突然変異発現以降播種しなかった。

* : 毒性のため評価しなかった。

** : 反復試験は実施しなかった。

代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験③				試験④			
		生存 コロニー数	相対総 増殖率	変異 コロニー数	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対総 増殖率	変異 コロニー数	変異率 ×10 ⁻⁶
溶媒対照 (DMSO)	0	138	100	4.8	6.8	145.3	100	3.25	4.5
陽性対照 3-MC	3	140.7	43.3	79.3	113.7	157	73	158	201
検体	10	/	/	/	/	179	156.5	4.5	5
	25	117	63.5	4.5	8	156	124	6	8
	40	137	31	6	9	142	98.5	3.5	5
	55	147	4	14.5	19.5	140.5	53.5	5.5	8
	70	96.5	0.009	0	0*	159	45.5	6	7.5
	85	NP	-	NP	-	/	/	/	/

1 反復が 5 ペトリ皿 (生存コロニー数は 3 ペトリ皿) からなる 2 反復の平均 (溶媒対照は 4 反復、陽性対照は 3 反復) コロニー数

3-MC : 3-メチルコラントレン

NP : 突然変異発現時間以降播種しなかった。

* : 毒性のため評価しなかった。

デスメディファムのヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料No. 原体-39)

試験機関：

報告書作成年：1985年[GLP]

検体の純度：98%

試験方法：*in vitro*でS-9mixの存在及び非存在下におけるヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を検討した。検体はエタノールに溶解した。

検体の最終濃度0.24～125µg/mLで実施した予備試験の結果、最大溶解量は100µg/mLであり、これを僅かに超える濃度においても検体の影響はみられなかったことから、検体の最終濃度をS-9mixの存在及び非存在下とも10、50、100µg/mLした。

ヒト血液より、リンパ球を分離採取し細胞分裂を誘発し、37°Cで48時間培養した。その後、一連の培養に検体を所定濃度になるように加えた。溶媒対照としてエタノール及びDMSOをそれぞれ50µL、陽性対照としてエチルメタンサルホネート(EMS)500µg/mLを添加した。さらに22時間培養した。

代謝活性化存在下ではS-9mix及び検体を加えた。溶媒対照としてエタノール及び蒸留水をそれぞれ50 µL、陽性対照としてシクロホスファミド(CP)を添加し、2時間培養後細胞を分離し、新鮮な培養液中に再懸濁し、さらに22時間培養した。各培養液中にコルヒチンを添加し、2時間培養後定量処理し、固定、染色して中期分裂像について鏡検した。

鏡検は、各培養につき100個の中期分裂像について実施した。

試験結果：以下に結果の表を示す。

陽性対照は溶媒対照と比較して、中期分裂像の割合が有意に増加した。

デスメディファム原体の中期分裂像の割合は溶媒対照と同様であった。

化合物	濃度 (µg/mL)	S-9 mix	検査した細胞 数	異常細胞数		異常が見られた細胞の割合(%) 平均値	
				キヤップを 除く	キヤップを 含む	キヤップを 除く	キヤップを 含む
溶媒対照 (エタノール)	50µL	-	100×4	0、0、1、2	0、0、1、2	0.75	0.75
溶媒対照 (DMSO)	50µL	-	100×4	1、0、1、0	1、0、1、0	0.5	0.5
デスメディファム	10	-	100×2	2、0	2、0	1.0	1.0
	50	-	100×2	2、1	4、1	1.5	2.5
	100	-	100×2	1、2	1、2	1.5	1.5
陽性対照 (EMS)	500	-	100×2	10、14	12、15	12.0***	13.5***
溶媒対照 (エタノール)	50µL	+	100×4	2、0、0、2	2、0、1、2	1.0	1.25
溶媒対照 (滅菌蒸留水)	50µL	+	100×4	0、0、0、2	0、0、1、3	0.5	1.0
デスメディファム	10	+	100×2	0、0	1、0	0	0.5
	50	+	100×2	0、0	0、1	0	0.5
	100	+	100×2	1、0	1、0	0.5	0.5
陽性対照 (CP)	20	+	100×2	13、6	13、6	9.5***	9.5***

***：P<0.001 (Fisherの検定)

以上の結果から、デスメディファム原体は *in vitro* 細胞遺伝学的試験で代謝活性化の存在下及び非存在下のいずれにおいても変異原性を示さなかった。

デスメディファムのチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた

in vitro染色体異常試験

(毒性資料No. 原体-40)

試験機関：

報告書作成年：1991年[GLP]

検体の純度：不明

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣細胞(CH0-10 B4)を用い、代謝活性化及び非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。検体及び陽性対照物質はDMSOに溶解して用いた。チャイニーズハムスター卵巣細胞を、薬剤暴露前に37°Cで20時間培養した。

代謝活性化系非存在下では、一連の培養に検体を所定濃度になるように加えた。溶媒対照としてDMSOを50 µL、陽性対照としてメチルメタンスルホネート(MMS)を添加した。さらに24時間培養して検体に暴露させた。無処置対照も同時に設定し試験した。

代謝活性化系存在下ではS-9mix及び検体を加えた。溶媒対照としてDMSOを50 µL、陽性対照としてシクロホスファミド(CP)を添加し、6時間培養後細胞を分離し、新鮮な培養液中に再懸濁し、さらに18時間培養した。

代謝活性化系存在下及び非存在下ともに、各培養液中にコルヒチンを添加し、2時間培養後定量処理し、固定、染色して中期分裂像について鏡検した。

各処理につき試験区は2連で行った。

鏡検は、各培養につき100個の中期分裂像について実施した。

用量設定根拠：検体の19.5、39.1、78.1、156.3、312.5、625、1250、2500及び5000µg/mLの濃度範囲で実施した予備試験の結果、代謝活性化系存在下では312.5 µg/mL以上で検体の沈殿がみられ、また、39.1 µg/mLで軽度な、78.1 µg/mL以上で明白な細胞毒性がみられた。代謝活性化系非存在下では1250 µg/mL以上で沈殿がみられ、78.1 µg/mL以上で細胞毒性がみられた。このことから、本試験の用量として試験Aに示す濃度段階を当初設定した。

試験概要

試験A 代謝活性化系存在下；5、10、20及び40 µg/mL

代謝活性化系非存在下；10、20、40及び80 µg/mL

陽性対照；代謝活性化系存在下 CP；20 µg/mL

代謝活性化系非存在下 MMS；20 µg/mL

この結果、代謝活性化系存在下のいずれの検体処理区においても毒性がみられなかったため染色体の観察は行わなかった。しかし代謝活性化系存在下の陽性対照であるCPでの染色体異常が増加しなかった(数値は報告書中で示されていない)ため、代謝活性化系存在下のみで同じ用量設定で試験Bを以下の濃度で実施した。

試験B 代謝活性化系存在下；10、20、40及び80 µg/mL

陽性対照； CP；30 µg/mL

上記の試験Bの結果、最高用量区で強い細胞毒性とともに疑陽性の結果が得られたことから、より狭い用量間隔の以下の濃度で代謝活性化系存在下のみ試験Cを実施した。

試験C 代謝活性化系存在下；40、50、60、70及び80 µg/mL(60 µg/mL以上のみ観察)

陽性対照； CP；30 µg/mL

その結果、陽性対照であるCPで染色体異常が増加せず、検体の変異原性の有無を確認するため、代謝活性化系存在下のみでさらに以下の濃度で実施した。

試験D 代謝活性化系存在下；40、50、60、70、80、90及び100 µg/mL(60 µg/mL以下のみ観察)

陽性対照； CP；20、30及び40 µg/mL

試験結果：以下に結果の表を示す。

試験A 代謝活性化系非存在下のいずれの濃度においても構造異常及び倍数異常はみられなかった。

試験B 代謝活性化系存在下で最高濃度である80 µg/mLでは細胞毒性が強く認められ、生存細胞が2及び9個しか認められず、染色体異常誘発性の判定に十分な結果は得られなかった。

試験C 試験Bでは検体の染色体異常誘発性が疑われたため、十分な細胞数がえられ、かつ中期分裂像がえられる用量で試験を行った。80 µg/mLまで細胞毒性は認められなかったものの、70及び80 µg/mL区で染色体異常が増加した。しかし、この試験では陽性対照CPの染色体異常誘発性が認められず、試験結果は信頼性にかける可能性が示唆された。

試験D 60 µg/mL区で染色体異常が増加した。70及び80 µg/mL区では細胞毒性が顕著に認められ、染色体異常の観察はできなかった。

以上の結果から、デスメディファム原体はチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験で細胞毒性を示すような高濃度において代謝活性化系存在下で染色体異常誘発性を有する可能性が示唆された。

試験A

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標本 作製 時間	観察 細胞 数	S-9 mix の有 無	染色体異常を有する細胞数										異常細胞頻度%		倍数異常を有する細胞の%			
						染色分体型			染色体型			その他			複 合	キ ャ ッ プ を 含 む	キ ャ ッ プ を 除 く	AE	ER	PP	
						g	b	f	g	b	f	e	d	r							
溶媒対照 (DMSO)	100	24	26	100	—	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	10	0	0	
				100	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
デスメデ イファム	10			100	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7	0	1
				100	—	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	0	0
	20			100	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0
				100	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	10	0	0
	40			100	—	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	0	0
				100	—	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	6	0	0
	80			100	—	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	8	3	0
				100	—	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	0	3
無処理 対照	—			100	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9	0	1
				100	—	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	10	0	0
陽性対照 (MMS)	20			50	—	6	6	3	0	6	2	10	0	0	1	42	40	18	0	2	
				100	—	4	3	1	0	1		5	0	0	0	7	7	20	0	1	

g:ギャップ b:切断 f:断片化 e:交換 d:二動原体 r:環状 AE:異数性 ER:核内倍加 PP:倍数性 複合:10以上の異常を有する細胞

試験B

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標本 作製 時間	観察 細胞 数	S-9 mix の有 無	染色体異常を有する細胞数										異常細胞頻度%		倍数異常を有 する細胞の%		
						染色分体型			染色体型			その他			複 合	キ ャ ッ プ を 含 む	キ ャ ッ プ を 除 く	AE	ER	PP
						g	b	f	g	b	f	e	d	r						
溶媒対照 (DMSO)	100	4	26	100	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
				100	+	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	4	3	7	2	1
デスメデ イファム	10			100	+	3	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	9	1	0	
				100	+	2	1	0	0	1	2	0	0	0	6	4	14	0	0	
	20			100	+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	
				100	+	2	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	5	0	0	
	40			100	+	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3	2	5	0	0	
				100	+	8	1	0	0	1	6	0	0	0	13	8	8	2	1	
	80			100	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	
				100	+	2	0	0	0	0	1	1	0	0	22	11	33	0	0	
無処理 対照	-			100	+	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	7	0	0	
				100	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	7	0	1	
陽性対照 (CP)	30			100	+	10	5	2	3	7	9	4	0	0	30	22	12	0	0	
				100	+	16	9	3	3	2	10	5	0	0	29	20	23	1	0	

g:ギャップ b:切断 f:断片化 e:交換 d:二動物体 r:環状 AE:異数性 ER:核内倍加 PP:倍数性 複合:10以上の異常を有する細胞

試験C

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標本 作製 時間	観察 細胞 数	S-9 mix の有 無	染色体異常を有する細胞数										異常細胞頻度%		倍数異常を有 する細胞の%		
						染色分体型			染色体型			その他			複 合	ギ ャ ッ プ を 含 む	ギ ャ ッ プ を 除 く	AE	ER	PP
						g	b	f	g	b	f	e	d	r						
溶媒対照 (DMSO)	100	4	26	100	+	8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	8	1	10	0	0
				100	+	6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	7	2	6	0	1
デスメデ イファム	60			100	+	5	2	0	0	1	0	0	0	0	0	8	3	8	4	1
				100	+	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	6	5	0	
	70			100	+	21	9	3	0	3	0	9	0	0	0	17	8	8	3	0
				100	+	15	12	3	1	2	1	10	0	1	1	18	13	4	5	0
	80			100	+	9	14	7	1	2	5	14	0	0	3	28	24	16	3	0
				100	+	33	24	9	1	2	4	23	0	1	0	31	22	14	1	1
陽性対照 (CP)	30			100	+	8	2	1	0	0	0	0	0	0	9	3	11	0	0	
				100	+	3	4	1	1	0	0	0	0	0	8	4	10	0	1	

g:ギャップ b:切断 f:断片化 e:交換 d:二動原体 r:環状 AE:異数性 ER:核内倍加 PP:倍数性 複合:10以上の異常を有する細胞

試験D

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標本 作製 時間	観察 細胞 数	S-9 mix の有 無	染色体異常を有する細胞数										異常細胞頻度%		倍数異常を有 する細胞の%		
						染色分体型			染色体型			その他			複 合	ギヤップ [*] を含む	ギヤップ [*] を除く	AE	ER	PP
						g	b	f	g	b	f	e	d	r						
溶媒対照 (DMSO)	100	4	26	100	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	9	0	0
				100	+	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	8	0
デスメデ イファム	40	4	26	100	+	3	2	0	0	0	0	0	0	0	4	2	6	3	0	
				100	+	4	1	1	0	1	2	1	0	0	0	10	7	3	2	1
	50	100	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	
		100	+	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0		
		59	+	5	12	2	0	1	2	14	0	1	1	41	39	15	0	0		
60	100	+	4	11	1	2	2	2	12	0	0	0	21	16	6	1	1			
	無処理 対照	-	100	+	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3	2	7	3	0		
陽性対照 (CP)	20	4	26	100	+	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	
				100	+	3	5	0	0	0	0	1	0	0	0	9	6	8	1	0
	30			100	+	3	2	0	1	2	0	2	0	0	0	9	6	6	1	0
				100	+	4	3	0	1	0	1	3	0	0	0	12	7	15	0	0
				100	+	2	3	1	1	1	0	6	0	0	0	14	11	8	0	0
	40			100	+	4	11	2	1	1	3	11	0	0	0	27	22	13	0	0
				100	+	9	6	1	3	3	2	7	0	0	0	18	14	16	0	0

g:ギヤップ b:切断 f:断片化 e:交換 d:二動原体 r:環状 AE:異数性 ER:核内倍加 PP:倍数性 複合:10以上の異常を有する細胞

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある
デスメディファムのラット初代肝培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験
(毒性資料 No. 原体-41)

試験機関：

報告書作成年： 1990 年[GLP]

検体の純度： 不明

試験方法：

ラットの初代肝培養細胞を用い検体の DNA に及ぼす影響を、不定期 DNA 合成を指標として評価した。

1. 供試液の調製

検体及び陽性対照物質の 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)は DMSO に溶解した。

2. 肝細胞の単離

若齢成獣(週齢不明)の Fischer 系雄ラットを麻酔下で頸部脱臼により屠殺し、コラゲナーゼ液を灌流して肝を摘出した。この肝試料から肝細胞を単離調製した。

3. 用量設定

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞試験(毒性資料 No. 原体-37)における結果に基づき、同じ用量である 3.13、6.25、12.5、25、50、100 及び 200 μ g/mL とその下に 1.56 μ g/mL を設け 8 段階とした。

陽性対照として 2-AAF、陰性対照として無処置対照[Williams E 培養液(WME)]及び溶媒対照(DMSO)を設けた。

4. 不定期 DNA 合成(UDS)検査用標本の作製と観察

1 \times 10⁵個以上の肝細胞を牛胎児血清、インシュリン、デキサメタゾン及びゲンタマイシンを含む WME に加え、約 2 時間、5%炭酸ガスを含む空气中で 37 $^{\circ}$ C で培養した。その後単層細胞を得るためにカバーグラスに接着させ、WME で洗浄し余剰の細胞を除去した。

この単層細胞を含む WME 培地に検体及び ³H-チミジンを加え、18~20 時間培養した。培養は各群 4 反復で行い、うち 3 反復を UDS 評価に、1 反復を細胞毒性の評価に用いた。

UDS の評価は培養後にチミジン含有 WME で洗浄し、1%クエン酸ナトリウムで核を膨化処理後、メタノール/氷酢酸(3/1)で細胞を固定し風乾した。オートラジオグラフィー処理のため細胞の接着したカバーグラスをスライドグラスに載せ、オートラジオグラフィー後 ³H-チミジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を計測した。

細胞毒性の評価は、トリパンブルー色素を排除した生存細胞数を求めた。

試験は独立して 2 回実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

試験結果：

結果を下表に示した。

細胞生存率が 100 μ g/mL 以上で減少し検体による細胞毒性が認められたため、50 μ g/mL までの試験濃度について不定期 DNA 合成を評価した。

検体を処理したいずれの濃度群でも不定期 DNA 合成率について再現性のある増加は認められなかった。これに対して、陽性対照群では顕著な不定期 DNA 合成の誘導が認められた。

試験群	濃度 (μ g/mL)	細胞生存率 (%) ¹⁾		核あたりの 補正粒子数		修復中の細胞 割合 (%) ²⁾	
		1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
培地対照	—	114.0	72.9	-3.22	-1.09	0.00	2.00
溶媒対照 (反復1)	—	90.3	100.0	-2.44	-3.88	4.00	1.33
溶媒対照 (反復2)	—	109.7	100.0	-3.15	-3.37	2.67	1.33
検体	1.56	109.7	67.1	- ³⁾	-3.24	- ³⁾	2.67
	3.13	122.6	71.4	-1.81	-3.69	4.00	4.00
	6.25	154.8	62.9	-5.00	-3.14	0.00	0.00
	12.5	109.7	67.1	-4.04	-3.07	2.00	2.67
	25.0	103.2	72.9	-2.64	-2.92	5.00	0.67
	50.0	114.0	58.6	-1.15	- ³⁾	2.00	- ³⁾
	100.0	75.3	75.7	- ⁴⁾	- ⁴⁾	- ⁴⁾	- ⁴⁾
2-AAF	0.5	139.8	130.0	20.95	12.82	94.00	98.00
	2.0	109.7	141.4	20.40	88.83	95.00	100.00

1) 溶媒対照の平均生存細胞数に対する生存細胞数

2) 補正粒子数が 5 個以上の細胞の割合

3) 評価せず

4) 毒性のため評価できず

以上の結果より、検体はラット初代肝培養細胞において、不定期 DNA 合成を誘発しなかったと判断される。

デスメディファムのマウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-42)

試験機関：

報告書作成年：1985年 [GLP]

検体の純度 : 98.3%
試験系 : NMRI系マウス、1群雌雄各18匹
(試験開始時:雄6週齢、雌7週齢、体重雄26~37g 雌26~34g)
試験期間 : 投与後24、48、72時間

【試験方法】

検体の投与量は、マウスの急性経口毒性試験においてLD50値が5000mg/kgを上回ることに基づいた。従って、本試験の最大耐量として5000mg/kg体重を選択した。検体を蒸留水を用いた2%カルボキシメチルセルローズ溶液に溶解して、1群雌雄各6匹のマウスに5000mg/kgを1回経口投与した。

陽性対照として生理食塩水に溶解したシクロホスファミドの50mg/kgを検体と同様に腹腔内投与した。24、48、72時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。投与容量は、全投与群ともに20mL/kgとした。

摘出した骨髄についてSchmidの方法を用いて検査用の塗抹標本を作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。1動物につき1000個の多染性赤血球を観察し、同時に正染性赤血球数も観察した。また1動物につき1000個の赤血球に基づいて算出した多染性：正染性赤血球数の比(PCE/NCE)を算出し、検体の毒性影響を評価した。各屠殺時点毎に、5例について観察した。

【試験結果】

1) 一般症状

死亡例は見られなかった。検体投与群の全例で、投与後6時間にわたり鎮静状態が認められた。

2) 突然変異誘発性

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	小核を有する 細胞数 ¹⁾ (平均値±SD)	PCE/NCE% ²⁾ (平均値)
24時間	陰性対照	0	雄	5	0.4±0.55	107
			雌	5	1.0±0.00	123
	検体	5000	雄	5	0.8±1.30	125
			雌	5	0.2±0.45	175
	陽性対照 シクロホスファミド ³⁾	50	雄	5	18.2**±12.24	96
			雌	5	20.8**±10.03	139
48時間	陰性対照	0	雄	5	1.4±1.34	140
			雌	5	0.6±0.89	142
	検体	5000	雄	5	0.8±0.84	159
			雌	5	0.6±0.89	119
	陽性対照 シクロホスファミド ³⁾	50	雄	5	12.4**±3.58	56+
			雌	5	7.4**±3.65	75**
72時間	陰性対照	0	雄	5	1.0±1.22	106
			雌	5	1.0±0.71	205
	検体	5000	雄	5	0.4±0.55	81
			雌	5	0.6±0.89	245
	陽性対照 シクロホスファミド ³⁾	50	雄	5	4.8*±1.64	33**
			雌	5	1.8±0.84	74**

¹⁾1000個の多染性赤血球あたりの小核を有する細胞数

²⁾PCE/NCE%：1000個の赤血球中の多染性赤血球数及び正染性赤血球数をもとにした、多染性赤血球数対正染性赤血球数の割合(%表示) (PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球数)

統計手法：以下の方法を用いて申請者が計算した。

小核出現頻度について *：P<0.05, **：P<0.01 有意 (溶媒対照間、二項検定)

PCE/NCE%について **：P<0.01 有意 (溶媒対照間、Dunnett多重比較検定)

+：P<0.05, ++：P<0.01 有意 (溶媒対照間、Steel検定)

検体投与群の小核を有する多染性赤血球の発現頻度はいずれの屠殺時期においても、陰性対照群と差はなかった。

シクロホスファミドは雌雄とも小核を有する多染性赤血球数の有意な増加を誘発し、試験系の感受性が確認された。また PCE/NCE 比の有意な低下から毒性作用も確認された。

要約すると、デスメディファムは小核を有する多染性赤血球数の増加を誘発せず本検体は小核試験で変異原性を有さないと考えられる。

デスメディファムのマウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-43)

試験機関：

報告書作成年： 1991 年[GLP]

検体の純度 : 報告されていない

試験系 : CD-1マウス、1群雌雄各15匹

(試験開始時:6~8週齢、体重 雄 23~34g 雌 20~26g)

試験期間 : 投与後 24、48、72 時間

【試験方法】

検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁させ、0、2000mg/kg の用量でマウスに単回経口投与した。陽性対照としてシクロホスファミドを滅菌水に溶解し、80mg/kg の用量で単回経口もしくは単回腹腔内投与した。投与容量はいずれも 10mL/kg とした。なお、シクロホスファミドは経口により投与する計画であったが、誤って雄の 8 匹(うち 5 匹は 24 時間後屠殺、3 匹は 48 時間後屠殺)について腹腔内投与が行われた。残りの雄 7 匹及び雌 15 匹は経口投与を行った。シクロホスファミドは染色体異常誘発性において経口及び腹腔内投与で同等の影響が見られており¹⁾、本試験の腹腔内投与でも明らかな陽性影響が認められたことから、この投与経路の差は本試験結果に影響を与えないと考えられた。

投与 24、48 及び 72 時間後に各群とも雌雄各 5 匹ずつ屠殺し、大腿骨骨髓標本を作製した。1 動物につき 1000 個の多染性赤血球(PCE)を観察し、小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の数を計数した。更に、多染性赤血球数と正染性赤血球数(NCE)の比を求めた。

用量設定根拠

予備試験において、検体を 2000mg/kg で雌雄各 5 匹の同系マウスに単回経口投与したところ、死亡及び毒性反応は見られず、剖検において異常は認められなかったため、本試験の用量として 2000mg/kg を選択した。

1) (1988) A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay, J Appl. Toxicol, 8, 141-144

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

【試験結果】

検体投与群及び溶媒対照群において、死亡及び毒性反応は認められなかった。
骨髄標本の観察結果を下表に示した。

検体投与群において、雌雄何れの標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に溶媒対照群と比べて増加は認められなかった。シクロホスファミドは雌雄とも小核を有する多染性赤血球数の有意な増加を誘発し、試験系の感受性が確認された。

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE	PCE/NCE (%)
24時間	陰性対照	0	雄	5	3	100
			雌	5	0	94
	検体	2000	雄	5	1	95
			雌	5	0	100
	陽性対照 シクロホスファミド ¹⁾	80	雄	5	44**	85
			雌	5	29**	88
48時間	陰性対照	0	雄	5	5	96
			雌	5	4	97
	検体	2000	雄	5	3	97
			雌	5	2	98
	陽性対照 シクロホスファミド ¹⁾	80	雄	5	76**	84
			雌	5	20**	86
72時間	陰性対照	0	雄	5	2	102
			雌	5	4	100
	検体	2000	雄	5	4	98
			雌	5	5	99
	陽性対照 シクロホスファミド ¹⁾	80	雄	5	33**	84
			雌	5	6	106

MNPCE：多染性赤血球 5000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

PCE：多染性赤血球数

NCE：正染性赤血球数

**：p<0.01 (Fisher's exact test、申請者の計算による)

要約すると、デスメディファムは小核を有する多染性赤血球数の増加を誘発せず本検体は小核試験で変異原性を有さないと考えられる。

(14) 生体機能に及ぼす影響

デスメディファムにおける一般薬理試験

(毒性資料No. 原体-44)

試験機関：

報告書作成年：1990年

デスメディファムはフェンメディファムとの混合剤として農業場面で使用されることから、一般状態に及ぼす影響についてのみ、フェンメディファム及びフェンメディファムとの混合物についても、併行して試験を行なった。

検体の純度：98.4%

1. 一般状態に及ぼす影響 (Irwin法)

試験動物：ICR系[Jcl:ICR]マウス、体重22~26g、1群 雄5匹

試験方法：各検体を0.5%CMC-0.04%Tween 80溶液に懸濁し、デスメディファム(DMP)、フェンメディファム(PMP)及び両者の混合物についてIrwinの変法に基づいて観察した。DMPは50、500及び2500mg/kg、PMPは500及び2500mg/kg、DMP/PMP混合物(混合比3:13)は50、500及び2500mg/kgとなるよう単回強制経口投与した。対照群には溶媒を投与した。投与後0.5、1.5、3及び6時間後、さらに1、2、3及び6日後に、Irwinの変法に基づいて観察した。

試験結果：中毒症状として、DMPの投与では50mg/kg群の2例に呼吸の不規則及び遅延が、500mg/kg群の4例ではこれらに加え運動性減少が、2500mg/kg群の5例にはさらに、歩行低調、縮瞳などがみられた。これらの症状はすべて投与0.5~6時間後に発現し、1日後には回復した。

PMPの投与では500mg/kg群の1例に呼吸の不規則及び遅延、運動性減少が、2500mg/kg群の3例ではさらに腹筋緊張度減少がみられ、これらは投与後0.5~3時間に発現し、6時間後には回復した。

DMP/PMP混合物(混合比3:13)では、50mg/kg群の1例、500mg/kg群の2例、2500mg/kg群の5例全例で不規則及び遅延、運動性減少及び腹筋緊張度減少がみられ、これらは投与後0.5~6時間に発現し、1日後には回復した。

2. 呼吸及び循環器系に及ぼす影響

試験動物：日本白色種ウサギ、体重2.9~3.3kg、1群 雄5匹

試験方法：動物をウレタン麻酔下で背位に固定した。呼吸運動は胸囲に装着した呼吸ピックアップを介して、血圧は右大腿動脈から圧トランスデューサを介して、心拍数は血圧脈波で瞬時計数計を駆動し、大腿動脈血流は左大腿動脈に装着した電磁血流計を用いて、同時に記録した。心電図は第II誘導法により記録した。DMPを0.5%CMC-0.04%Tween 80溶液で懸濁・調製し、カテーテルを通して50及び500mg/kgを腹腔内に投与した。投与後5、15、30、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

60、90及び120分にこれらのパラメーターを測定した。

試験結果：DMPの50mg/kg投与で血圧が60分以降、溶媒群に比べ有意に低下したが、DMPの500mg/kg群では用量に関連した変化はみられず、またこれ以外の項目に変化がなく、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。DMPの500mg/kg群では血圧、心拍数及び大腿動脈血流が投与15分以降軽度に低下した。呼吸数に変化はみられなかった。

3. 自律神経（摘出回腸）に及ぼす影響

試験動物：Hartley系モルモット（雄5匹）、体重470～490g

試験方法：モルモット回腸を摘出し、95%O₂+5%CO₂ガス通気下で、Tyrode液を満たした浴槽（32℃）中に懸垂し、筋の収縮をトランスデューサを介して記録した。アゴニストとして、アセチルコリン（Ach）、ヒスタミン（His）及び塩化バリウム（BaCl₂）を用い、各アゴニストの収縮に対するデスメディファムの影響を検討した。

DMP検体はメタノールに溶解し、これらによる収縮がほぼ一定になってから浴槽中最終濃度を10⁻⁶、10⁻⁵及び10⁻⁴g/mLで添加した。

試験結果：結果を次表に示す。

アゴニスト		検体		収縮率(%) #
種類	濃度(M)	種類	濃度(g/mL)	
Ach	3×10 ⁻⁷	溶媒（メタノール）		88.4
		DMP	10 ⁻⁶	87.1
		DMP	10 ⁻⁵	62.1
		DMP	10 ⁻⁴	6.8**
His	9×10 ⁻⁷	溶媒（メタノール）		97.9
		DMP	10 ⁻⁶	92.6
		DMP	10 ⁻⁵	66.5*
		DMP	10 ⁻⁴	3.5**
BaCl ₂	2×10 ⁻³	溶媒（メタノール）		93.7
		DMP	10 ⁻⁶	89.8
		DMP	10 ⁻⁵	51.9
		DMP	10 ⁻⁴	0**

* P<0.05、**P<0.01 (Kruskal Wallis/Dunnettの検定)

#: 検体適用直前のアゴニスト単独での発生張力を100%として、検体適用後の収縮を%表示した。

各アゴニストによる収縮へのデスメディファムの影響は、いずれの場合も用量依存的な抑制作用を示し、10⁻⁵～10⁻⁴g/mLの濃度で溶媒（メタノール）に比べて有意差が認められた。さらに、これらの抑制作用は洗浄を行うと、いずれの場合も回復がみられた。

4. 腸間輸送能に及ぼす影響

試験動物：ICR系[Jc1:ICR]マウス、体重20～23g、1群 雄8匹

試験方法：検体を0.5%CMC-0.04%Tween 80溶液に懸濁し、50、500及び2500mg/kg

の投与量で強制経口投与した。

陽性対照として、硫酸アトロピン20mg/kgを静脈内投与した。

検体投与後30分及び硫酸アトロピン投与直後に、10%アラビアゴム溶液に懸濁した5%炭末液を強制経口投与した。炭末投与後20分に小腸を取り出して炭末移動距離を測定し、小腸全長に対する炭末移動度 (%) を求めた。

試験結果：結果を次表に示す。

検 体	投与量 (mg/kg体重)	炭末移動度 (%)
溶 媒	10mL/kg	45.3
DMP	50	43.3
DMP	500	43.1
DMP	2500	42.7
硫酸アトロピン	20	18.1**

**P<0.01 (Dunnettの検定)

DMP投与群はいずれの投与量においても、その炭末移動度に溶媒投与群との差を示さなかった。アトロピン投与群では炭末移動度は有意に低下した。

5. 神経筋接合部に及ぼす影響

試験動物：Wistar系 [Jcl:Wistar] ラット (雄5匹)、体重310~330g

試験方法：ラット横隔膜神経筋標本を作成し、95%O₂+5%CO₂ガス通気下でKrebs-Henseleit液を満たした浴槽に懸垂した。横隔膜神経に矩形波の電気刺激を与え、惹起される横隔膜筋の収縮をトランスデューサを介して記録した。溶媒メタノール及びピレスメディファム 10^{-6} ~ 10^{-4} g/mLの濃度で5分間作用させ、筋収縮への影響を検討した。陽性対照として塩化ツボクラリンを用いた。

神経刺激試験終了後、同標本を用いて横隔膜筋に矩形波刺激を直接与え、同様の試験を行った。

試験結果：神経刺激による筋収縮に対して、検体の 10^{-6} ~ 10^{-5} g/mLは影響を与えなかった。検体の 10^{-4} g/mLの濃度では、処理後1分に溶媒群と比べて有意な収縮増強が認められたが、2分以降には次第に抑制され、5分後には有意な抑制が認められた。

標本を水洗浄した後では、その収縮はほぼもとの状態に回復した。同条件下で塩化ツボクラリンの場合、投与直後から収縮を次第に減弱させ、2~5分後の抑制は溶媒群に比べて有意であった。

筋直接刺激による収縮は、溶媒群との差は認められなかった。

6. 血液凝固系に及ぼす影響

試験動物：Wistar系 [Jcl:Wistar] ラット (雄5匹)、体重230~260g

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

試験方法：検体を0.5%CMC-Na-0.04% Tween 80液に懸濁・調製した。ラットを一晩絶食後、溶媒あるいはDMP50、500及び2500mg/kgを強制経口投与した。投与後1時間に麻酔下で腹大静脈より採血して、クエン酸ナトリウムを添加して血漿を遠心分離した。得られた血漿を用いて、トロンビン時間 (TT)、プロトロンビン時間 (PT) 及び部分活性トロンボプラスチン時間 (APTT) について試験した。

試験結果：結果を次表に示す。

デスメディファム投与群のいずれの投与量においてもトロンビン時間、プロトロンビン時間及び部分活性トロンボプラスチン時間とも溶媒投与群との差は認められなかった。

7. 溶血作用

試験方法：検体を生理食塩水に溶解し、最終濃度が0.0007及び0.007mg/mLとなるように調製した。

試験には精製水、生理食塩水あるいはデスメディファム溶液を37°Cに加熱した後、クエン酸ナトリウム添加ウサギ全血を混和し、37°Cで30分間静置した。静置後、遠心分離し上清を採取し、吸光度 (540nm) を測定した。

試験結果：結果を次表に示す。

検体		吸光度	溶血率 (%)
種類	濃度 (g/mL)		
生理食塩水		0.014	0
DMP	0.0007 mg/mL	0.034	0.36
DMP	0.007 mg/mL	0.062*	0.89
精製水		5.354**	100

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Kruskal Wallis/Dunnettの検定)

吸光度は用量依存的に上昇し、0.007 mg/mLの濃度では、生理食塩水と比べて有意差が認められた。

精製水における溶血率を100%とした場合、デスメディファムの溶血率は0.007 mg/mLで0.36%、0.007 mg/mLで0.89%であった。

以上の結果から、デスメディファムはマウスに2500mg/kg経口投与した結果、一般状態の変化として呼吸不規則、運動性減少、縮腫がみられたが、いずれも軽度な作用であり、投与後1日には正常に回復した。フェンメディファムの併用は毒性を増強しなかった。ウサギに500mg/kg腹腔内投与した結果、循環系の変化として血圧低下、心拍数減少がみられた。また $10^{-5} \sim 10^{-4}$ g/mLの濃度で摘出回腸のアゴニストによる収縮の抑制、 10^{-4} g/mLでラットの横隔膜筋神経接合部の電気刺激による収縮の増強がみられた。さらに0.007 mg/mLの濃度で血球に対し溶血作用を示した。

生体機能に及ぼす影響に関する試験の総括

試験項目	試験動物	1群当り動物数	投与方法、投与量(mg/kg)及び溶媒	無作用量(mg/kg)	作用量(mg/kg)	結果の概要
一般状態に及ぼす影響 (Irwinの変法)	マウス	♂ 5	経口 DMP*単独; 50, 500, 2500 PMP**単独; 500, 2500 DMP*・PMP**混合 (混合割合3:13) 50, 500, 2500	—	DMP* ; 50 DMP*・PMP** 混合 ; 50	いずれの場合でも、呼吸不規則、運動性の減少、腹筋緊張度減少、縮瞳が用量相関的に発現した。症状発現のピークは投与後数時間であり、1日後には正常に回復した。
呼吸及び循環器系に及ぼす影響	ウサギ (麻酔下)	♂ 5	腹腔内 50, 500	—	50	50mg/kgで血圧のみ軽度の低下、500mg/kgで血圧、心拍数、大腿動脈血流のいずれも軽度の低下。
摘出回腸に及ぼす影響	モルモット	♂ 5	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁵ 、 10 ⁻⁴ (g/mL) (メタノール)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁵ (g/mL)	アセチルコリン、ヒスタミン及びBaCl ₂ による収縮を用量依存的に抑制した。
腸間輸送能に及ぼす影響	マウス	♂ 8	経口 50, 500, 2500	2500	—	いずれの投与量においても腸間輸送能に影響は認められなかった。
神経筋接合部に及ぼす作用	ラット	♂ 5	10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁵ 、 10 ⁻⁴ (g/mL) (メタノール)	神経刺激 10 ⁻⁵ g/mL 筋直接刺激 10 ⁻⁵ g/mL	神経刺激 10 ⁻⁴ g/mL 筋直接刺激 10 ⁻⁴ g/mL	神経刺激による筋収縮に対して10 ⁻⁴ g/mLで増強、続いて抑制が認められた。 10 ⁻⁶ 及び10 ⁻⁵ g/mLでは影響が認められなかった。 筋直接刺激による収縮は10 ⁻⁴ g/mLで有意な影響を受けなかった。
血液凝固系に及ぼす影響	ラット	♂ 5	経口 50, 500, 2500	2500	—	トロンビン時間、プロトロンビン時間及び部分活性トロンボプラスチン時間への影響は認められなかった。
溶血作用	ウサギ		0.0007, 0.007 (mg/mL) 生理食塩水	—	0.0007 (mg/mL)	用量依存的に溶血率は増加した。0.007mg/mLでの溶血率は0.89%であった。

* DNP : デスメディファム ** PMP : フェンメディファム

溶媒は経口投与及び腹腔内投与のいずれも0.5%CMC+0.04%Tween 80水溶液を用い、投与容量は経口投与の場合は10mL/kg体重、腹腔内投与の場合は2 mL/kg体重とした。

イヌを用いた混餌投与によるメトヘモグロビンに対する無影響量の検討

(毒性資料No. 原体-45)

試験期間：

報告書作成年：1991年[GLP]

本試験の目的は、デスメディファム原体をビーグル犬に混餌投与することにより生じるメトヘモグロビン形成について検討することにあつた。

検体純度：97.6%

試験動物：ビーグル犬、1群雌雄各2匹、6～7ヶ月齢

体重 雄9.7～10.5kg、雌7.6～9.0kg

試験期間：80日間（1989年8月15日～1989年12月7日）

試験方法：1群雌雄各2匹の3群に対し、それぞれ混餌濃度を変えて以下に示す日程で投与した。対照群には無処理飼料を与えた。

群	動物番号		投与期間 (日)	投与量 (ppm)
	雄	雌		
1 対照群	1、2	7、8	1-80	0
2 投与群	3、4	9、10	1-21	150
			22-42	200
			43-80	500
3 投与群	5、6	11、12	1-21	75
			22-40	300
			41-42	0
			43-80	1500

投与量の根拠として、2群及び3群の最初の濃度は試験委託者が選択した。

2群(150ppm)、3群(75ppm)とも21日までメトヘモグロビン生成を示さなかつたので、両方とも投与量をそれぞれ200及び300ppmに増加した。42日目でも影響が認められなかつたので、2群の投与量を500ppmに増加し80日まで継続した。3群は41及び42日目は投与を中止し、43日目から1500ppmに増加し80日まで継続した。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；中毒症状及び生死を毎日観察した。

死亡例はみられなかつた。2及び3群の動物の投与量を500及び1500ppmに増加した後、灰色尿が認められた。

摂餌量；毎日測定した。

投与に影響はみられなかつた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

体重変化；毎週測定した。

体重増加量に投与の影響は認められなかった。

検体摂取量；平均検体摂取量 (mg/kg/日) は以下の通りであった。

群	期間 (日)	濃度 (ppm)	雄	雌	雄+雌
1	1-80	0	0	0	0
2	1-21	150	5.1	4.3	4.7
	22-42	200	6.5	5.3	5.9
	43-80	500	15.5	15.7	15.6
3	1-21	75	2.5	2.5	2.5
	22-40	300	9.7	11.1	10.4
	41-42	0	0	0	0
	43-80	1500	45.0	49.2	47.1

血液学的検査；試験開始前2回、投与後1～4日目は投与後2、4、6、23時間目に採血した。

投与後5日目は投与後2、4、6時間目に採血した。投与後8日～78日目は投与後6時間目に採血した。以下の項目について検査した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、有核赤血球、ハイツ小体、メトヘモグロビン、赤血球形態。

毎日の最高メトヘモグロビン値の範囲を次表に示す。

最高メトヘモグロビン値の範囲 (平均)

群	動物 番号	試験前の 最高値	試験の1～21日	試験の22～42日	試験の43～78日	
雄	対照群		0	0	0	
	1	1	0.1	0.0～0.7(0.33)	0.0～0.6(0.31)	0.1～0.7(0.37)
		2	0.5	0.0～0.6(0.23)	0.0～0.8(0.30)	0.0～0.6(0.19)
	投与量(ppm)			150	200	500
	2	3	0.1	0.0～0.7(0.27)	0.0～0.8(0.31)	0.1～0.8(0.44)
		4	0.2	0.0～0.8(0.47)	0.2～0.9(0.57)	0.2～1.0(0.55)
	投与量(ppm)			75	300	1500
	3	5	0.3	0.0～0.7(0.38)	0.1～0.7(0.37)	0.6～1.1(0.85)
		6	0.1	0.0～0.8(0.17)	0.1～0.5(0.27)	0.4～1.2(0.85)
	雌	対照群		0	0	0
1		7	0.9	0.0～0.8(0.45)	0.6～0.9(0.75)	0.3～0.8(0.56)
		8	0.6	0.0～0.6(0.26)	0.0～0.6(0.23)	0.0～0.8(0.29)
投与量(ppm)			150	200	500	
2		9	0.2	0.0～0.8(0.30)	0.0～0.6(0.37)	0.2～1.4(0.74)
		10	0.0	0.0～0.5(0.17)	0.0～0.5(0.19)	0.2～1.0(0.55)
投与量(ppm)			75	300	1500	
3		11	0.7	0.2～1.0(0.55)	0.3～0.8(0.55)	0.6～1.2(0.93)
		12	0.4	0.0～0.8(0.39)	0.2～0.5(0.36)	0.5～1.3(1.01)

メトヘモグロビン血症

供試したイヌ間の変動による偏りを消去するため、個々のイヌの結果を含む評価が必要である。デスメディファム原体のイヌに対するメトヘモグロビン血症の発症が、いずれの投与量によるかを評価する基準は下記によった：

- 1) メトヘモグロビン値の変動範囲の上限と下限が投与量の増加によって増えるかまたは、
- 2) 毎日の最高メトヘモグロビンの平均値が投与量の増加に伴って増加するか？

1群（対照群）のメトヘモグロビン値に日動変動が認められたが、概して同じ範囲にあった。イヌ相互間の変動が比較的大きく、試験前の値は必ずしも動物の“正常値”を示してはいなかった。

上記の基準により、3群の1500ppmでは雌雄に、500ppmでは雌にメトヘモグロビン血症を増加させるものと考えられた。

300ppmの投与では影響は認められなかった。

その他の項目に変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与終了後、全動物を剖検した。

2群の雌1匹及び3群の雌雄各1匹の脾臓にうっ血が認められた。

病理組織学的検査；骨髓塗抹標本及び骨髓組織について顕微鏡検査を行った。

対照群及び投与群に有意な差は認められなかった。3群の雄1匹に赤血球の増加が認められた。対照群及び投与群の全動物に核左方移動が認められたが、これは反復採血によるものと考えられた。

以上の結果、デスメディファム原体は1500ppmの用量で雌雄に、500ppmの用量では雌にメトヘモグロビン血症を起こした。300ppmの用量では雌雄いずれも増加はみられないことから、300ppmがメトヘモグロビンに対する無毒性量と判断される。

9. 原体混在物及び代謝物の毒性

原体混在物及び代謝物EHPCの細菌を用いた復帰変異性試験

(毒性資料No. 代謝物)

試験機関：

報告書作成年：1990年

供試化合物：混在物及び代謝物EHPC

(EHPC)

検体の純度：99.1%w/w

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535 及びTA1537) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。

検体をアセトンに溶解した。予備試験の結果、試験菌株に対して抗菌性を示さなかった5000 μ g/プレートを最高用量とした。試験濃度は10~5000 μ g/プレートの範囲で5用量とした。同様な処理による試験を2回行った。

陽性対照としてS-9mixの非存在下ではアジ化ナトリウム (NaN_3)、4-NOPD (4-nitro-o-phenylene-diamine) 及び S-9mix の存在下では2-AA (2-aminoanthracene) を用いた。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

2回の試験とも5000 μ g/プレートの濃度でも、またS-9mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、混在物及び代謝物EHPCは代謝活性化を含む本試験条件下で、復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

試験1. (平均値：n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537
陰性対照		—	80	5	15	4
溶媒対照 (アセトン)		—	75	5	15	4
EHPC	10.0	—	73	4	12	3
	100.0	—	75	3	11	4
	333.3	—	74	4	17	3
	1000.0	—	82	4	8	3
	5000.0	—	34	1	6	1
陽性対照 NaN_3 4NOPD	10	—	1042	821		
	50	—			1491	20
陰性対照		+	88	10	20	4
溶媒対照 (アセトン)		+	88	9	19	4
EHPC	10.0	+	89	7	24	4
	100.0	+	88	5	19	4
	333.3	+	85	4	15	3
	1000.0	+	103	4	17	2
	5000.0	+	48	1	16	2
陽性対照 2-AA	10	+	1432	80	1629	388

試験2. (平均値：n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537
陰性対照		—	77	6	15	5
溶媒対照 (アセトン)		—	75	5	15	5
EHPC	10.0	—	79	5	16	5
	100.0	—	76	5	14	4
	333.3	—	74	5	13	5
	1000.0	—	48	6	8	3
	5000.0	—	16	3	4	2
陽性対照 NaN_3 4NOPD	10	—	758	931		
	50	—			1350	173
陰性対照		+	98	7	16	4
溶媒対照 (アセトン)		+	88	5	15	4
EHPC	10.0	+	87	8	12	5
	100.0	+	107	7	11	3
	333.3	+	69	7	14	4
	1000.0	+	90	8	10	4
	5000.0	+	42	3	2	2
陽性対照 2-AA	10	+	1759	50	2005	346

EHPC：エチル-N-(3-ヒドロキシフェニル)-カルバマート

NaN_3 :(sodium azide)

4NOPD:(4-nitro-o-phenylene-diamine)、

2-AA:(2-aminoanthracene)

ラットを用いたベタブロード乳剤の急性経口毒性試験

(毒性資料No. 製剤-1)

試験機関： [GLP]

報告書作成年：1990年

検体の純度：デスメディファム・フェンメディファム乳剤

組成

デスメディファム 3%

フェンメディファム 13%

有機溶剤、活性剤等 84%

試験動物：Wistar系ラット、8～10週齢、1群雌雄各5匹

開始時体重 雄184～286g、雌153～203g

試験期間：15日間観察

試験方法：検体を稀釈せずに強制経口投与した。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重を投与直前、8及び15日目に測定した。死亡例及び試験終了時に全生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2500、3000、3500、4200、5000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 4921 (4156～11292) ♀ 3261 (-*)
死亡開始時間 及び終了時間	♂ 2日 ♀ 2日～4日
症状発現及び 消失時間	♂ 投与直後～2日 ♀ 投与直後～11日
毒性徴候の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	♂ - ♀ -
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	♂ 4200 ♀ -

*計算せず。

症状として嗜眠、立毛、運動失調及び反応の欠如が頻繁に観察された。全生存動物は4日目には回復した。

死亡動物の肉眼的検査では、暗赤色の肺、胸腺の出血、腺胃の出血／赤色部、蒼白色の腎臓、蒼白／黄色の肝臓及び小さな脾臓が見られた。

終了時の剖検では異常は認められなかった。

マウスを用いたベタブロード乳剤の急性経口毒性試験

(毒性資料No. 製剤-2)

試験機関： [GLP]

報告書作成年：1990年

検体の純度：デスメディファム・フェンメディファム乳剤

組成

デスメディファム 3%

フェンメディファム 13%

有機溶剤、活性剤等 84%

試験動物：CD-1マウス、5週齢、1群雌雄各5匹

開始時体重 雄24~33g、雌20~24g

試験期間：15日間観察

試験方法：検体を稀釈せずに強制経口投与した。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重を投与直前、8及び15日目に測定した。試験終了後、全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2500、3000、3500、4200、5000
LD50値 (mg/kg) (95%信頼限界)	♂4316(-*) ♀3820(3498~6309)
死亡開始時間 及び終了時間	♂2日 ♀2日
症状発現及び 消失時間	♂投与直後~15日 ♀投与直後~4日
毒性徴候の認められなかつた 最高投与量(mg/kg)	♂ - ♀ -
死亡例の認められなかつた 最高投与量(mg/kg)	♂ 3000 ♀ 3000

* 計算不能

嗜眠、昏睡、立毛、運動失調、反応の欠如、横臥位及び過剰な瞬きなどが観察され、5000mg/kg群は12日目、その他の群では5日目までに回復した。

死亡動物の肉眼的検査では、異常は認められなかった。

生存例の剖検では各群の動物に前胃上皮に不規則な灰/白色部、腎臓表面は粗造、剖面混濁、脾臓頭部の狭窄及び子宮水腫等が認められた。

ラットを用いたベタブロード乳剤の急性経皮毒性試験

(毒性資料No. 製剤-3)

試験機関： [GLP]

報告書作成年：1990年

検体の純度：デスメディファム・フェンメディファム乳剤
組成

デスメディファム	3%
フェンメディファム	13%
有機溶剤、活性剤等	84%

試験動物：Wistar系ラット、雌雄各5匹、約9週齢

開始時体重 雄221～258g、雌178～194g

試験期間：15日間観察

試験方法：検体を刈毛した背部皮膚（5cm×7cm）に処理し、伸縮包帯で被い固定した。
処理後24時間目に包帯を取り、残った検体を湿った紙で除去した。

観察項目：処理部位の皮膚の観察と共に、中毒症状及び生死を15日間観察した。処理開始前、8及び15日目に体重を測定した。試験終了時に剖検した。

試験結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	4000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂ > 4000 ♀ > 4000
死亡開始時間及び終了時間	♂♀とも死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	♂ 2.1時間～2日 ♀ 投与直後～2日
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂ - ♀ -
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂ 4000 ♀ 4000

主な中毒症状として嗜眠が観察された。これらの動物は3日目までに回復した。試験5日目に一部の動物の処理部位に鱗屑が認められた。剖検による肉眼的異常は認められなかった。

(4) ベタブロード乳剤のラットを用いた急性吸入毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-4)

試験成績の提出除外

本薬についての吸入毒性試験成績は、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「第4 試験成績の提出の除外について」(2)③のイの規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本剤はくん蒸剤、くん煙剤等当該農薬の成分物質を気化させて使用する農薬以外の農薬である。

このようなことから、急性吸入毒性試験の提出は不要であると判断した。

ウサギを用いたベタブロード乳剤の皮膚一次刺激性試験

(毒性資料No. 製剤-5)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：1990年

検体の純度：デスメディファム・フェンメディファム乳剤

組成

デスメディファム 3%

フェンメディファム 13%

有機溶剤、活性剤等 84%

試験動物：New Zealand White系ウサギ、雌6匹

約13～17週齢、体重 2561～2975g

試験期間：7日間観察

試験方法：検体0.5mLを含むガーゼパッチ(2cm×2cm)を刈毛した背部皮膚に処理した。

反対側部には検体を含まないパッチを対照として処理した。暴露時間を4時間とし半閉塞包帯下で固定した。暴露終了後、包帯と処理部位の残った検体を取り除いた。

観察項目：検体除去後55分、24、48、72時間、7日目に処理部位の刺激性変化を観察した。

試験結果：観察した刺激性変化の評価は下表の通りである。(判定基準はDraize法による。)

極めて軽度ないし明らかに識別できる紅斑及び極く軽度の浮腫がみられたが、全例とも7日目には消失した。

結果の概要

動物 番号	項 目	最高 評点	暴露後時間				
			1時間	24時間	48時間	72時間	7日
1	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	2	1	1	1	0
	浮腫	4	1	1	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	1	1	2	1	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2	0
	浮腫	4	1	1	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	8	7	8	7	0
	浮腫	24	6	2	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	1.33	1.17	1.33	1.17	0
	浮腫	4	1	0.33	0	0	0

以上の結果から、ベタブロード乳剤はウサギの皮膚に対し軽度の刺激性を示すと考えられた。

2. 眼及び皮膚に対する刺激性

ウサギを用いたベタブロード乳剤の眼粘膜一次刺激性試験

(毒性資料No. 製剤-6)

試験機関： [GLP]

報告書作成年：1990年

検体の純度：ベタブロード乳剤

組成

デスメディファム 3%

フェンメディファム 13%

有機溶剤、活性剤等 84%

試験動物：New Zealand White系ウサギ、12～16週齢雌9匹（非洗眼群6匹及び洗眼群3匹）、
体重2270～2882g

試験期間：14日間観察

試験方法：検体0.1mLを点眼し、約1秒間軽く閉じた。他方の眼を対照とした。9匹中6匹を
そのままに、残り3匹は点眼3分後に微温湯で約30秒洗眼した。点眼後1、24、48、
72時間目及び7日目に角膜、虹彩及び結膜に生じた刺激反応を観察した。

試験結果：観察した刺激性変化の評価は下表の通りである。(判定基準はDraize法による。)

非洗眼群、洗眼群とも角膜、虹彩及び結膜に影響が認められた。非洗眼群では
角膜混濁及び結膜の刺激は7日以内、虹彩の充血は48時間以内に回復した。

洗眼群でも非洗眼群と同様な変化であったが、結膜の刺激は1匹が14日までに
消失した。

以上の結果から、ベタブロード乳剤はウサギの眼粘膜に対し中等度の刺激性を有すると
考えられた。

結果の概要

項目			最高 評点	適用後時間						
				1時間	24時間	48時間	72時間	7日目	14日目	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	
			面積	4	0	2	1	0	0	
		虹彩			2	1	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	3	3	2	0	
			浮腫	4	2	1	1	0	0	
		分泌物			3	0	1	1	0	0
	動物 番号 2	角膜	混濁	4	0	0	1	0	0	
			面積	4	0	2	1	3	0	
		虹彩			2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	3	3	2	0	
			浮腫	4	2	1	1	0	0	
		分泌物			3	0	1	1	0	0
	動物 番号 3	角膜	混濁	4	0	1	1	1	0	
			面積	4	2	2	3	2	0	
		虹彩			2	0	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	3	3	2	0	
			浮腫	4	2	1	1	0	0	
		分泌物			3	0	1	1	0	0
	動物 番号 4	角膜	混濁	4	0	1	1	1	0	
			面積	4	2	2	2	2	0	
		虹彩			2	0	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	3	3	2	0	
			浮腫	4	2	1	1	0	0	
		分泌物			3	0	0	1	0	0
動物 番号 5	角膜	混濁	0	0	1	1	1	0		
		面積	0	2	2	3	3	0		
	虹彩			2	1	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2	3	3	3	0		
		浮腫	4	2	1	1	0	0		
	分泌物			3	0	1	1	1	0	
動物 番号 6	角膜	混濁	0	0	1	1	0	0		
		面積	0	0	1	1	1	0		
	虹彩			2	0	1	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2	3	3	2	0		
		浮腫	4	3	2	1	0	0		
	分泌物			3	0	1	1	1	0	
合計			660	60	115	110	65	0		
平均			110	10.0	19.2	18.3	10.8	0		
洗眼群 (3匹平均)	角膜	混濁	4	0	0.7	0.7	0.7	0	0	
		面積	4	1.7	1.7	2.3	1.7	0	0	
	虹彩			2	0	1	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2	3	3	2.7	0.3	0	
		浮腫	4	2.7	2	1	0	0	0	
	分泌物			3	0	1	1	0.3	0	
	合計			330	28	71	50	38	2	0
	平均			110	9.3	23.7	16.7	12.7	0.7	0

モルモットを用いたベタブロード乳剤の皮膚感作性試験 (毒性資料No. 製剤-7)

試験機関: [GLP]

報告書作成年: 1990年[GLP対応]

検体の純度: ベタブロード乳剤

組成

デスメディファム	3%
フェンメディファム	13%
有機溶剤、活性剤等	84%

試験動物: Himalayan系モルモット、処理群雌20匹、対照群雌10匹、体重327~433g

試験期間: 48時間観察

試験方法: [Buehler法]

5匹を用いて予備刺激試験を行った。

用量設定根拠として1匹に滅菌蒸留水で50%濃度に調製した検体0.5mLを左側腹部に貼付処理し、次に4匹に5、10、25及び50%濃度の検体を貼付後閉塞処理し、皮膚刺激性を検討した。1匹に体重減少がみられた以外には毒性症状はみられず、皮膚反応を認めなかったことから、本試験に用いる濃度を50% (w/w) とした。

陽性対照の試験は本試験と同時には行っていないが、本試験機関では定期的に0.5%ホルムアルデヒドを用いて実施している。

感 作:

刈毛した左側肩甲骨部の皮膚に滅菌蒸留水で50%濃度(w/w)に調製した検体0.5mLを貼付し、6時間閉塞処置した。処置は3週間の間に9回行った(1、3、5、8、10、12、15、17及び19日)。対照群は賦形剤のみを同様に処置した。最終処置後、皮膚反応を評価した。

惹 起:

最後の感作から10日目に処理群及び対照群の右側腹部(5cm×5cm)の刈毛した部分に50%濃度の検体及び賦形剤の0.5mLをそれぞれ6時間貼付した。包帯除去後24及び48時間目の皮膚反応を下記の評価基準(OECD/EECガイドライン)に従って評価した。

皮膚反応なし	0
散在性赤色斑点	1
中等度だが融合性の紅斑	2
紅斑及び腫張	3
著しい紅斑及び腫張	4

試験結果：感作の結果を下表に示す。

検体を貼付した試験群では評点1から4まで皮膚反応がみられたが、対照群では紅斑及び浮腫とも認められなかった。

	動物数		評 点				
			0	1	2	3	4
試験群	20	紅 斑	0	1	4	2	13
		浮 腫	0	3	11	6	0
対照群	10	紅 斑	0	0	0	0	0
		浮 腫	0	0	0	0	0

惹起後24及び48時間の結果を下表に示す。

	動物数	24時間					48時間					陽 性動物数		
		評 点					陽性反応 動物計*	評 点					陽性反応 動物計*	
		0	1	2	3	4		0	1	2	3			4
試験群	20	0	15	2	3	0	5/20	0	12	1	3	4	8/20	10/20
対照群	10	0	1	0	0	0	0/10	0	5	0	0	0	0/10	0/10

*評点2以上を陽性反応とした。

惹起後24及び48時間の観察時点のいずれかで評点2以上を示した動物を感作性が陽性であったと判断した。その結果、試験群20匹中10匹が感作性陽性であった。従って、感作率は50%であった。

対照群では陽性反応は認められなかった。

陽性対照として用いた0.5%ホルムアルデヒドの感作率を下表に示す。

陽性対照における感作率は35%であった。

	動物数	陽性動物数	感作率 (%)	蒸留水
試験群	20	7	35	0
対照群	10	0	0	0

以上の結果、ベタブロード乳剤は感作性を示すものと判断された。

IX. 動物及び土壌等における代謝分解
 <代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試 動物等	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁
運命 1 GLP	動物代謝 排泄 代謝物同定 組織内分布 (M-11)	ラット 5 及び2	フェニル(P) 標識 単回 5mg/kg 体重 アミノフェキシ(AP) 標識 単回 5mg/kg 体重	・両標識体とも速やかに排泄され、主要排泄経路は尿であった。 ・組織中残留濃度は、概してP標識体の方がAP標識より高く、また雌の方が高かった。 ・AP標識体の尿、糞中の主要代謝物としてEHPCが検出され、P標識体では4-AAPが検出された。	1990年	運命 -7
運命 2 GLP	動物代謝 排泄、分布 (M-16)	ラット 5	P標識 単回 1000 反復 5 AP標識 単回 5、1000 反復 5	・両標識体とも速やかに排泄され、低用量群では主要排泄経路は尿であった。高用量群では糞への排泄が増加した。 ・排泄はAP標識体の方が速やかで、かつ完全であった。 ・放射能の臓器及び組織への選択的な蓄積は認められなかった。組織内の残留放射能は雄より雌の方が高かった。	1993年	運命 -14
運命 3 GLP	動物代謝 代謝物同定 (M-17)	ラット 5	P標識 単回 1000 反復 5 AP標識 単回 5、1000 反復 5	AP標識体の主要代謝物はEHPCであり、次いで3-AAP、3-APが検出された。 P標識体の糞の主要代謝物はPMCで、尿の主要代謝物は4-AAPであった。 未変化の親化合物は尿中には認められなかったが、糞中には検出された。	1993年	運命 -22
運命 4 GLP	動物代謝 組織内分布 (経時的) (M-9)	ラット 18	P標識 単回 5、1000	・低用量、高用量とも組織内残留放射能は経時的に着実に消失した。 ・最高残留濃度は両用量群とも肝臓に認められ、また最高残留分布率はカーカスであった。 ・組織中残留濃度は雌の方が雄より高かった。	1993年	運命 -30

下線を付した試験成績は平成11年食品衛生調査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・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
運命 5	植物代謝 代謝物の分布と同定 (M-10/2)	てんさい	P標識、AP標識とも 葉面散布 2.5 μg/株	・根部に移行しない。 ・主要代謝物は親化合物の糖抱合体であり、次いでEHPC及びその糖抱合体であった。 ・未変化の親化合物は経時的に変化した。	1989年	運命-38
運命 6-1 及び 6-2 GLP	植物代謝 代謝物の分布と同定 (M501/502)	てんさい	P標識、AP標識とも 葉面散布 1kg原体/ha (1倍量処理) 及び 5kg原体/ha (5倍量処理)	・親化合物の代謝経路は、極性の高い代謝物が生成され、最終的に植物内組織との不溶性共役(結合)残渣となった。 ・主要代謝物は親化合物の硫酸化糖抱合体であった。 ・1倍量処理した成熟期根部の総放射能残留は、0.011 ppm(DMP換算値)であった。	1995年	運命-47
運命 15 GLP	植物代謝	てんさい	P標識 散布処理 518g a. s. /ha	根部の放射能残留量は低く、0.115mg/kgであったが、デスメディファム-グリコシドサルフェートが主代謝物(茎葉で52.5%、根部で7.5%)であった。アニリンは認められなかった。糖等の生体成分に放射能が認められ、同化されたものと考えられた。	2014年	運命-58-1
運命 16 GLP	植物代謝	てんさい	AP標識 散布処理 494g a. s. /ha	根部の残留量は0.143mg/kgと低く、デスメディファム-グリコシドサルフェートが主代謝物(茎葉で31.9%)であった。また、EHPC及びEHPCグリコシドは茎葉のみで主代謝物であった。	2014年	運命-58-8
運命 7 GLP	土壌代謝 (好気条件、 15℃、25℃) (W-51)	砂土	容器内 5ppm アミノフェノキシ(AP)標識	・経時的に抽出可能放射能は減少し、抽出残渣中の結合放射能は増加した。 ・炭酸ガスの発生量は25℃の方が15℃より多かった。 ・15℃、25℃とも代謝物としては未変化のDMPとEHPCが検出された。	1985年	運命-59

下線を付した試験成績は平成11年食品衛生調査会で評価済みである。

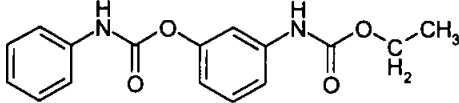
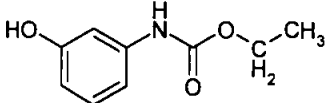
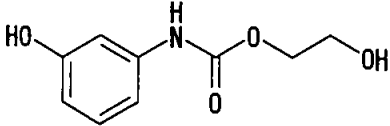
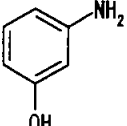
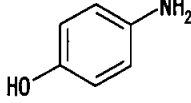
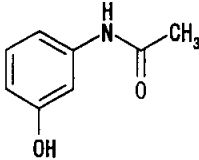
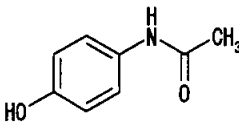
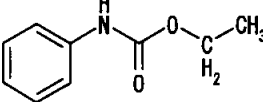
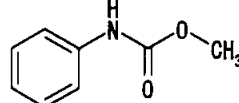
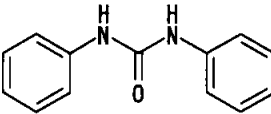
資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁										
運命 8 GLP	土壌代謝 (好気条件、15℃、25℃)	壤質砂土	容器内 5 ppm アミノフェノキ (AP) 標識	<ul style="list-style-type: none"> ・砂土と同様に経時的に抽出可能放射能が減少し、残渣中の結合放射能が増加した。残渣中放射能の増加は砂土より多かった。 ・炭酸ガスの発生量は25℃の方が15℃より多かった。 ・15℃、25℃とも代謝物として未変化のDMPとEHPCが検出された。 	1985年	運命 -64										
運命 9	土壌代謝 (嫌気条件、24℃) (W-24)	壤質砂土	容器内 5 ppm フェニル (P) 標識 アミノフェノキ (AP) 標識	<ul style="list-style-type: none"> ・経時的に抽出可能放射能は減少し、抽出残渣中の結合放射能及びフミン酸+フルボ酸画分が増加した。 ・通常施用量のP標識でDMP及びPECと推定される物質が、AP標識でDMP、EHPCが認められた。 ・代謝物単離・同定のための過剰施用量 (P標識のみを用いた) ではPEC、DPUが認められた。 ・半減期は4.3日と推定された。 	1982年	運命 -69										
運命 10	加水分解運命 (W-39) (W-40)	緩衝液	濃度 7mg/L	<ul style="list-style-type: none"> ・それぞれのpHにおける半減期 (時間) pH 5 1676 pH 7 19.6 pH 9 0.17 ・加水分解生成物として3点の分解物が同定された。 	1982年	運命 -73										
運命 11 GLP	加水分解運命	緩衝液	pH 4, 5, 7, 9 濃度 3.5mg/L 25℃ アミノフェノキ (AP) 標識	<ul style="list-style-type: none"> 各pHにおける半減期を以下に示す。 <table border="1" data-bbox="699 1446 932 1623"> <thead> <tr> <th>pH</th> <th>DT₅₀</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>248 日</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>39 日</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>12 時間</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>7 分</td> </tr> </tbody> </table> 代謝物としてEHPCが同定された。 	pH	DT ₅₀	4	248 日	5	39 日	7	12 時間	9	7 分	2003年	運命 -75
pH	DT ₅₀															
4	248 日															
5	39 日															
7	12 時間															
9	7 分															
運命 12	水中光分解運命 (W-135)	滅菌緩衝液、自然水	濃度 3ppm、pH 4	<ul style="list-style-type: none"> 光分解半減期 (キノンアーク灯) 滅菌緩衝液：半減期求められず 合成自然水：106.6時間 	1994年	運命 -82										

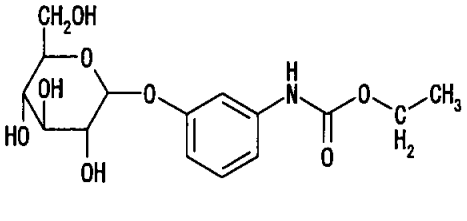
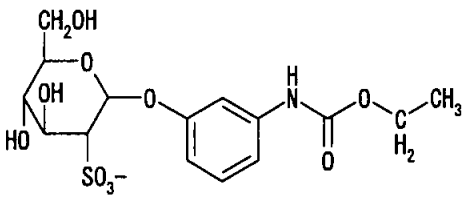
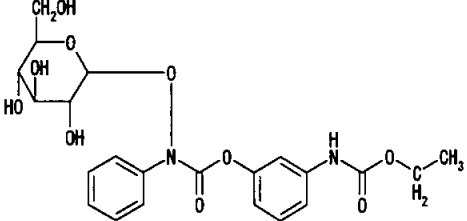
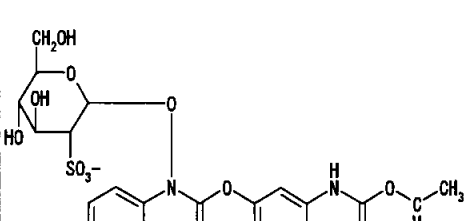
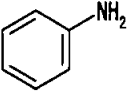
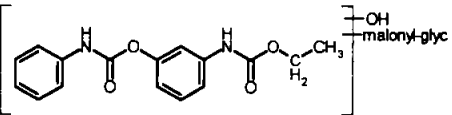
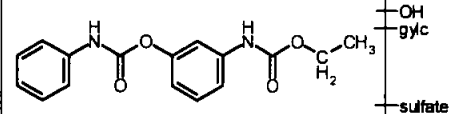
下線を付した試験成績は平成11年食品衛生調査会で評価済みである。

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁																							
運命 13 GLP	水中光分解 運命	自然水	濃度1ppm 25°C (pH 8.2)	<p>デスマテイアムはEHPCへ速やかに分解し、EHPCは比較的速やかに光分解された。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3"></th> <th colspan="4">半減期</th> </tr> <tr> <th colspan="2">デスマテイアム</th> <th colspan="2">EHPC</th> </tr> <tr> <th>照射</th> <th>暗照</th> <th>照射</th> <th>暗照</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>実験条件下</td> <td>0.17時間</td> <td>0.27時間</td> <td>29.7時間</td> <td>安定</td> </tr> <tr> <td>東京換算</td> <td>0.05日</td> <td>-</td> <td>9.2日</td> <td>安定</td> </tr> </tbody> </table>		半減期				デスマテイアム		EHPC		照射	暗照	照射	暗照	実験条件下	0.17時間	0.27時間	29.7時間	安定	東京換算	0.05日	-	9.2日	安定	2004年	運命 -84
	半減期																												
	デスマテイアム		EHPC																										
	照射	暗照	照射	暗照																									
実験条件下	0.17時間	0.27時間	29.7時間	安定																									
東京換算	0.05日	-	9.2日	安定																									
運命 14 GLP	吸着 (W-59/2)	砂土 壤質 壤土 砂壤土 (2種)	25°C : 24 時間振盪 AP標識	<p>・pH5.0以上の土壌スラリー中では検体は速やかに分解し、吸着平衡が求められなかった。従って、本剤は既存のガイドラインによる吸着・脱着試験による吸着係数は求められない。</p> <p>(本剤の土壌吸着性については、別途水溶解度など物理化学的データから推定した。)</p> <p>分解物EHPCの吸着係数は以下のとおり。</p> <p>$K_{F^{ads}}$: 2.65, 11.17, 1.62 $K_{F^{ads}oc}$: 558, 579, 164</p>	1994年	運命 -92																							

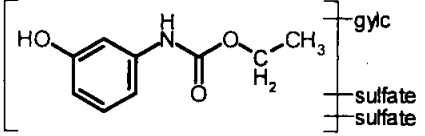
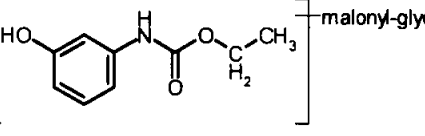
下線を付した試験成績は平成11年食品衛生調査会で評価済みである。

<代謝分解物一覧表>

コード	由来	名称(略称)	化学名	構造式
A	親化合物	DMP AE B038107	Ethyl 3-phenylcarbamoyloxy carbanilate	
B	動物 植物 土壌 加水 光	EHPC	N-(3-hydroxyphenyl) ethyl carbamate	
C	動物	E(OH)EHPC	N-(3-hydroxyphenyl) hydroxyethyl carbamate	
D	動物	3-AP AE F051242	3-aminophenol	
E	動物	4-AP AE 0171358	4-aminophenol	
F	動物	3-AAP AE F157469	3-acetoamidophenol N-(3-hydroxyphenyl) acetamide	
G	動物	4-AAP AE C426745	4-acetoamidophenol 4'-hydroxyacetamide	
H	土壌	PEC	N-(phenyl)ethyl carbamate	
I	動物	PMC AE C625221	N-(phenyl)methyl carbamate	
J	土壌 加水	DPU	1,3-diphenylurea	

コード	由来	名称(略称)	化学名	構造式
K	植物	EHPC 糖抱合体	Ethyl 3-(β -D-glucopyranosyloxy)-phenylcarbamate	
L	植物	EHPC 糖サルフェート	1-[N-(3-ethoxycarbonylamino-phenoxy)]- β -D-glucopyranos-2-yl sulfate	
M	植物	DMP 糖抱合体	3-Ethoxycarbonylaminophenyl-N-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-methylphenyl carbamate	
N	植物	DMP 糖サルフェート	1-[N-(3-ethoxycarbonylamino-phenoxy)-3-methylphenylaminoxy]- β -D-glucopyranos-2-yl-sulfate	
O	加水	アニリン	aniline	
P	植物	デスマテイファム -マロニル-グリコ シト		
Q	植物	デスマテイファム -グリコシトサル フェート		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

コード	由来	名称(略称)	化学名	構造式
R	植物	EHPC-グルコシ ト-ジ-サルフェ- ト		 <p>The structure shows a repeating unit in square brackets. On the left, a benzene ring with a hydroxyl group (HO-) at the para position is attached to a nitrogen atom (N). This nitrogen is part of an amide group (-NH-) that is linked to a carbonyl group (C=O). The carbonyl carbon is also bonded to an oxygen atom (O), which is further bonded to a methylene group (-CH₂-) and a methyl group (-CH₃). To the right of the methylene group, there are two vertical lines representing sulfate groups, labeled 'sulfate' and 'sulfate'. The entire unit is labeled 'glyc' on the right side.</p>
S	植物	EHPC-マロニル- グルコシト		 <p>The structure shows a repeating unit in square brackets. On the left, a benzene ring with a hydroxyl group (HO-) at the para position is attached to a nitrogen atom (N). This nitrogen is part of an amide group (-NH-) that is linked to a carbonyl group (C=O). The carbonyl carbon is also bonded to an oxygen atom (O), which is further bonded to a methylene group (-CH₂-) and a methyl group (-CH₃). The entire unit is labeled 'malonyl-glyc' on the right side.</p>

1. 動物体内運命に関する試験

(1) ^{14}C 標識デスメディファムのラットにおける代謝試験 (資料No.運命-1)

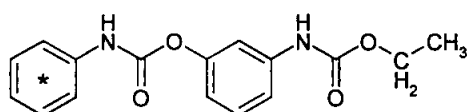
試験機関:

報告書作成年: 1990年

供試標識化合物:

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

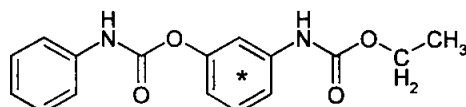
(1) ^{14}C -フェニル環標識デスメディファム (P標識)



比放射能: 59.1 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 97%以上

(2) ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



比放射能: 61.6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 99.7%以上

供試動物: SD系ラット、1群 雌雄5匹及び2匹、体重 雄130~164g、雌133~150g

試験方法: 5匹からなる群は排泄及び分布の検討に用い、2匹からなる群は代謝物の同定に供した。

(A) P標識デスメディファム;

P標識及び非標識デスメディファムをポリエチレングリコールに溶解し、比放射能を24.53mCi/gとし、この投与溶液を用いて5 mg/kgを投与した。さらに、別の1群(雌雄各2匹)には、比放射能59.1 mCi/gで同量を投与した。

(B) AP標識デスメディファム;

AP標識及び非標識デスメディファムをポリエチレングリコールに溶解し、比放射能を23.61mCi/gとし、この投与溶液を用いて5 mg/kgを投与した。さらに、別の1群(雌雄各2匹)には、比放射能61.6 mCi/gで同量を投与した。

試料の採取；投与後4日間毎日、尿糞を集めた。その都度、蒸留水を用いてケージを洗浄し、これを洗浄液とした。投与後4日に屠殺し、下記の臓器及び組織を採取した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、卵巣／精巣、甲状腺、眼、副腎、骨、腎脂肪、下垂体、血液及び血漿、並びにカーカス（この場合、10MNaOHを用いて直ちに可溶化した）。

尚、別途高い放射能を投与した雌雄各2匹は、投与後24時間ガラス製代謝ケージの中に入れ、尿及び糞を採集し、これを代謝物の同定に供した。

試料の調製；各試料は下記のように適宜処理した。

(a) 血漿、尿及びケージ洗浄液

各々の1部（0.1～1.0mL）を取り、ScintranあるいはOptiphase Scintillantに直接溶解した。

(b) 血液及び骨

骨は0.1～2.0gを秤取し、血液は0.1～0.25mLを取り、オキシダイザーを用いて燃焼し、生ずる¹⁴C0₂をCarbosorb/permafluorで捕集した。

(c) 下垂体、甲状腺、副腎、眼、筋肉、脂肪

小臓器は全体を、その他の臓器あるいは組織は1部を秤取し、可溶化剤を添加した。

超音波浴で加熱・溶解し、次いで塩酸酸性とし、(a)と同様にその1部試料をScintranあるいはOptiphase Scintillantに溶解した。

(d) 糞及びその他の臓器並びに組織

全試料に、蒸留水を約10% (w/v) となるように添加後、磨砕し、その1部（0.5～1.0mL）を採り、可溶化した。その後の操作は(c)と同様に行った。

(e) ¹⁴C0₂の捕集液

その1部（5mL）にScintranを添加した。

上記のように、各試料を調製後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

代謝物の分析；

(a) 酵素による加水分解

尿：酢酸緩衝液（pH5.0）に尿の1部を加え、酵素液（*Helix pomatia*）と37℃で1夜反応させた。反応液を直接TLCあるいはHPLCで分析した。また、C18カラムクロマトグラフィーで精製後、同様にTLCあるいはHPLCで分析した。

糞：糞磨砕液を遠心分離して、繊維物質を除去し、その上澄液を酵素液と37℃で48時間反応させた。一方、繊維物質はメタノール

でソックスレー抽出した後、この抽出液を上記と同様、酵素液と反応させた。これらの試料は、尿試料の場合と同様にTLCもしくはHPLCで分析した。

試験結果：

排泄；下表にP標識及びAP標識デスメディファムの尿糞中への経時的排泄の推移を示す。

(a) P標識

(単位：処理放射能に対する割合%)

試料	性別	投与後経過時間				計
		24	48	72	96	
尿	雄	62.33	2.43	1.08	0.71	66.54
	雌	62.62	2.74	1.49	1.03	67.88
糞	雄	15.94	1.09	0.19	0.13	17.35
	雌	14.74	1.97	0.61	0.20	17.53
ケージ洗淨液	雄	2.98	—	—	0.25	3.24
	雌	3.82	—	—	0.38	4.19
カーカス	雄	—	—	—	2.58	2.58
	雌	—	—	—	3.24	3.24

—：測定せず

(b) AP標識

(単位：処理放射能に対する割合%)

試料	性別	投与後経過時間				計
		24	48	72	96	
尿	雄	75.93	2.01	0.57	0.34	78.85
	雌	83.80	1.89	0.26	0.29	86.24
糞	雄	10.97	0.47	0.17	0.07	11.68
	雌	10.24	0.25	0.14	0.05	10.67
ケージ洗淨液	雄	6.21	—	—	0.37	6.58
	雌	4.12	—	—	0.29	4.41
カーカス	雄	—	—	—	1.49	1.49
	雌	—	—	—	0.83	0.83

—：測定せず

P標識及びAP標識化合物を投与した場合、両者とも速やかに尿糞中に排泄され、投与後24時間における排泄割合は、前者では大略77%及び後者では86~94%程度であった。

両標識化合物共に、その主要経路は尿排泄であり、P標識化合物の場合における投与後96時間内の排泄は、雄で66.54%、雌で

67.88%であった。糞中には雄で 17.35%及び雌で 17.53%が排泄され、またカーカスには雄で 2.58%及び雌で 3.24%が検出された。

AP 標識化合物の場合における投与後 96 時間内の排泄は、尿中に雄で 78.85%、雌で 89.24%であった。糞中には雄で 11.68%及び雌で 10.67%が排泄され、またカーカスには雄で 1.49%及び雌で 0.83%が検出された。呼気中への $^{14}\text{CO}_2$ 排泄は、両標識化合物とも極めて少なかった。

組織内分布；下表に投与後96時間のP標識及びAP標識デスメディファムの主要臓器の組織内分布を示す。

(単位：mgデスメディファム換算/kg)

	標識		標識	
	雄	雌	雄	雌
血液	0.49	0.69	N/D	0.01
血漿	0.38	0.61	N/D	N/D
肝臓	0.13	0.16	N/D	N/D
腎臓	0.15	0.24	N/D	N/D
肺	0.18	0.23	N/D	N/D
腎脂肪	0.13	0.19	N/D	N/D
脾臓	0.11	0.14	N/D	N/D
筋肉	0.08	0.12	N/D	N/D
カーカス	0.13	0.17	0.08	0.07
副腎	0.15	0.21	N/D	N/D
骨	N/D	0.03	N/D	N/D
脳	N/D	0.06	N/D	N/D
眼	0.05	0.07	N/D	N/D
心臓	0.14	0.20	N/D	N/D
下垂体	N/D	N/D	N/D	N/D
腎脂肪	0.13	0.19	N/D	N/D
精巣	0.06	-	N/D	-
卵巣	-	0.24	-	N/D
甲状腺	N/D	0.25	N/D	N/D

N/D：検出されず

P 標識化合物投与における組織内残留放射能濃度は低く、最も高い濃度を示したのは血液であり、雄では 0.49mg/kg、雌では 0.69 mg/kg であった。次いで、血漿中濃度が高かった。その他の臓器及び組織の残留濃度は 0.24mg/kg 以下であった。最も低い残留濃度を示した臓器は、脳、眼、骨、下垂体、甲状腺及び精巣であり、その濃度は 0.1mg/kg 未満であった。全体として、雄よりも雌の

方が相対的に高い傾向がみられた。

AP標識化合物の場合には、P標識化合物投与に比べて、いずれの臓器及び組織においても、その残留濃度は低く、血液及びカーカスを除いて検出限界以下であった。

尚、P標識化合物投与における雌の残留濃度が、わずかながら高い傾向がみられたが、2種の標識化合物における排泄経路及び組織内残留に有意な性差はないものと考えられた。

代謝物の同定；

(a) P標識

尿試料を酵素により加水分解した後TLC及びHPLC分析を行った。主要成分として4-アセトアミドフェノール（代謝物G）が検出され、その他により極性の高い物質及び4-アミノフェノール（代謝物E）と推定される物質が検出された。HPLC分析結果も同様であった。

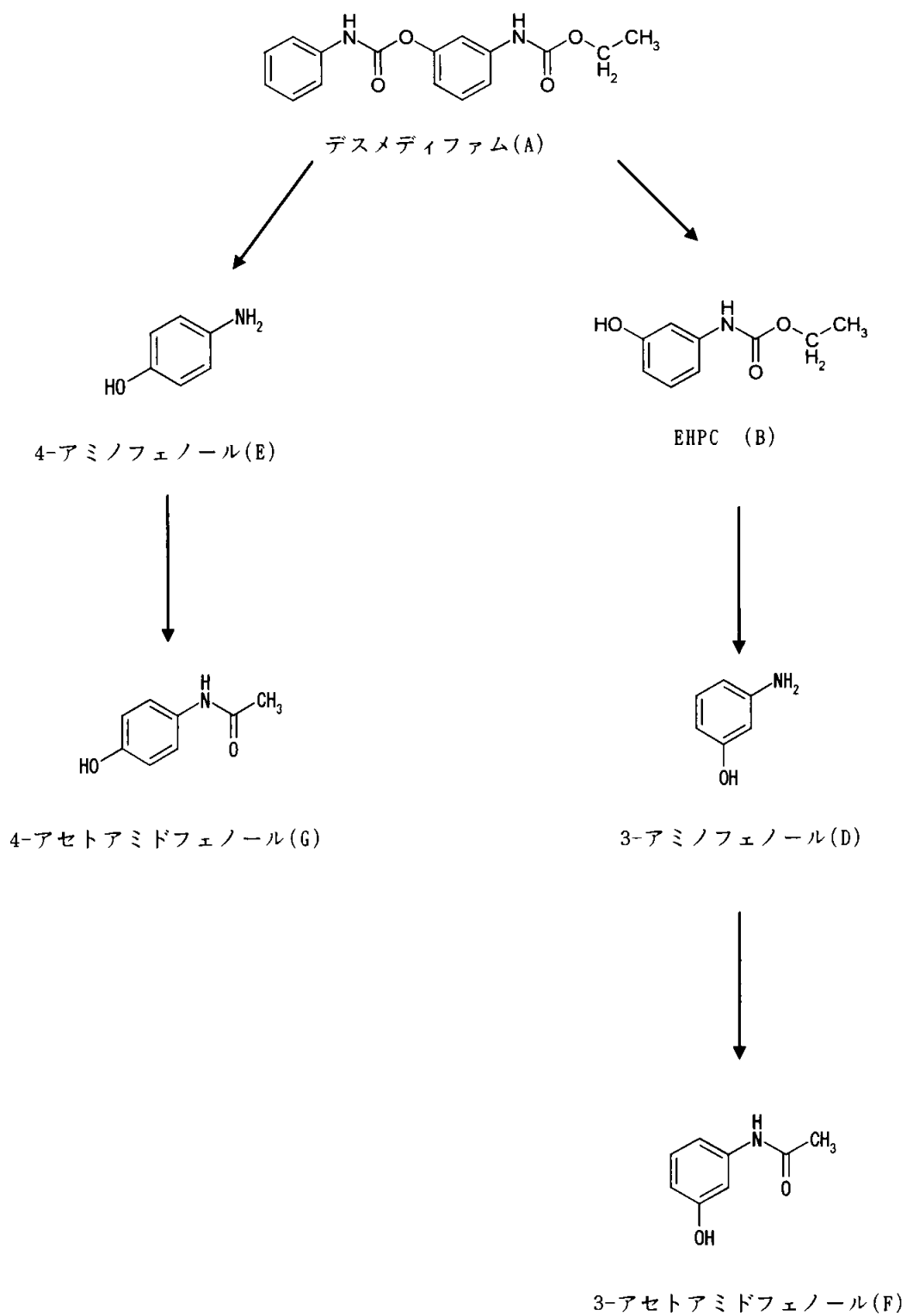
糞試料の場合、TLC及びHPLC分析を行い、少量の4-アセトアミドフェノール（代謝物G）及び未変化デスメディファムを検出したが、大部分の放射能は酵素によって加水分解されない極性物質として存在することが判明した。

(b) AP標識

酵素により加水分解した尿試料をTLC分析したところ、主要代謝物としてEHPC：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート（代謝物B）が同定された。少量の3-アセトアミドフェノール（代謝物F）及び痕跡程度であるが、3-アミノフェノール（代謝物D）と推定される物質が検出された。一方、同様にHPLC分析を行ったところ、主要代謝物としてEHPC：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート（代謝物B）を検出し、その量は尿中放射能の約63%であった。3-アセトアミドフェノール（代謝物F）は約18%、また3-アミノフェノール（代謝物D）は少量の未同定代謝物群を含めて約3%であった。

酵素により加水分解した糞試料中にも同様な代謝物が検出された。この場合、糞中への放射能の排泄は、投与放射能の約11%であり、極性の高い未同定代謝物の量は極めて少なかった（4%以下）。HPLC分析により主要代謝物が、EHPC：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート（代謝物B）及び3-アセトアミドフェノール（代謝物F）であることが確認されたが、精製後でも多くの夾雑物が存在しており、定量は困難であった。

デスメディファムのラットにおける推定代謝経路



1. 動物体内運命に関する試験

- (2) ^{14}C デスメディファムのラットにおける代謝試験 (資料No. 運命-2)
(5及び1000mg/kg単回経口投与及び5mg/kg 14日間連続経口投与後の排泄及び分布)

試験機関:

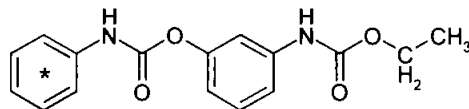
報告書作成年: 1993年

本試験では、資料No. 運命1の試験(低用量、単回投与)に加えて、両標識化合物を用い、高用量の単回投与及び低用量の反復投与後の主として吸収、排泄、組織内残留の検討を行った。

供試標識化合物:

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

- (1) ^{14}C -フェニル環標識デスメディファム (P標識) +

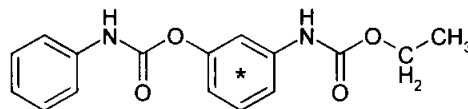


* ^{14}C 標識位置

比放射能: $59.1 \mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 98%以上

- (2) ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識) ++



* ^{14}C 標識位置

比放射能: $17.2 \mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 98%以上

+ 原報ではPC標識と記載されている

++ 原報ではEPC標識と記載されている

供試動物: CD (SD) BR系ラット (6~8週齢)

1群 雌雄各5匹、体重範囲 150~220g (1試験のみ169~274g)

方法:

飼育管理: 標識化合物を投与した後、動物は尿及び糞を分離採取できる代謝ケージに収容し、飼料と水は自由に摂取させた。

投与: 標識及び標識したデスメディファムを1%トラガカントゴム水溶液にそれぞれ懸濁し、投与溶液を調製し下記により経口投与した。

試験の名称	標識位置	投与量 (mg/kg)	投与方法
A (91173A)		5	単回
B (92192)		1000	単回
C (91172B)		5	非標識化合物を14日間反復投与した後、標識化合物を単回
D (92193)		1000	単回
E (91172AR)		5	非標識化合物を14日間反復投与した後、標識化合物を単回

投与量はデスメディファムの無作用量(NOEL)である5mg/kgと、実用上投与し得る最高投与量として1000mg/kgを選択した。

試料採取：各試験について、下記のように経時的に尿、糞の試料を採取し、またケージの洗浄を行った。

試験 A：尿、糞の試料0～6、6～24、24～30時間の3回

試験 B：尿、糞の試料24時間毎に96時間まで4回

試験 C：尿、糞の試料0～6、6～24、24～30時間の3回

試験 D：尿、糞の試料24時間毎に96時間まで4回

試験 E：尿、糞の試料24時間毎に96時間まで4回

投与終了後、動物を屠殺し以下の組織を採取した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、生殖腺（精巣／卵巣）、眼、副腎、脂肪（腎周辺）、骨、胃腸管及びカーカス。

放射能の測定：試料別に下記のように処理し、液体シンチレーション計数した。

- (1) 尿：適宜蒸留水で希釈後、その一部に直接Scintran FHVを加えた。
- (2) 骨及び血液：骨試料を秤量し、また血液の一部をオキシダイザーを用いて燃焼し、生ずる $^{14}\text{CO}_2$ をCarbsorb/permafluorで捕集した。
- (3) 副腎、眼、卵巣、筋肉及び脂肪：小臓器は全体あるいは秤量した組織の一部を50°Cで2日間可溶化剤で可溶化後、Scintran FHVを加えた。
- (4) 胃腸管及びカーカス：強アルカリ溶液で溶解後、均質化した。これに塩酸を加えて酸性とした後、Scintran FHVを加えた。
- (5) 糞、ケージ洗浄液及び上記以外の組織：全試料を蒸留水で磨砕均質化後（但し、糞の場合には適宜希釈した）、その一部を採取して可溶化後、(3)と同様処理した。

結果：

(1) 試験A：AP標識、5mg/kg、単回投与

尿・糞中への排泄に関する結果を下表に示す。

(投与放射能に対する割合%)

時間 (hrs)	雄					雌				
	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計
0～6	76.62	0.19	6.62	—	83.43	66.88	0.10	10.51	—	77.49
6～24	6.13	7.24	—	—	13.37	10.30	8.62	—	—	18.92
24～30	0.41	0.08	1.70	0.42	2.61	0.41	0.08	2.40	0.31	3.20
計	83.16	7.51	8.32	0.42	99.41	77.59	8.80	12.91	0.31	99.61

—：測定せず

投与された放射能は速やかに吸収・排泄された。そして、放射能は投与後30時間以内に雌雄とも尿糞中に99%以上が排泄された（尿による汚れが原因と考えられるケージ洗浄液中放射能を含む）。投与後6時間では尿中に雄で76.62%及び雌で66.88%であり、試験終了時での合計では雄で83.16%及び雌で77.59%であった。糞中への排泄合計は雄で7.51%及び雌で8.80%であり、主要排泄径路は尿中であった。

次に組織中への分布を下表に示す。

(ppm：デスメディファム換算)

性別	組織 (ppm)															
	血液	血漿	肝臓	腎臓	副腎	肺	脾臓	筋肉	心臓	脂肪	骨	脳	眼	生殖	胃腸	カーカス
雄	0.01	0.01	0.02	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.04	0.03
雌	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.05	0.02

nd：検出せず

各組織中放射能は極めて低く、大部分の組織では検出限界以下であった。放射能が検出された組織は、雌雄の肝臓、腎臓、胃腸管及びカーカス並びに雌の副腎であった。この中で放射能の最も高い組織は胃腸管であった。血液及び血漿中には放射能が雌雄とも0.01ppm検出された。

(2) 試験B：AP標識、1000mg/kg、単回投与

尿・糞中への排泄に関する結果を下表に示す。

(投与放射能に対する割合%)

時間 (hrs)	雄					雌				
	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計
0~24	33.85	45.83	6.01	—	85.69	35.32	46.78	5.74	—	87.84
24~48	7.64	4.70	—	—	12.34	8.47	3.59	—	—	12.06
48~72	0.47	0.09	—	—	0.56	0.57	0.25	—	—	0.82
72~96	0.16	0.03	0.58	0.40	1.17	0.21	0.04	0.46	0.38	1.09
計	42.12	50.65	6.59	0.40	99.76	44.57	50.66	6.20	0.38	101.81

—：測定せず

投与された放射能は投与後24時間で、尿糞中に雄85.69%及び雌87.84%（但し、尿による汚れが原因と考えられるケージ洗浄液中放射能を含む）が排泄された。

投与後96時間での尿糞中への排泄合計は、雌雄とも99%以上であった。前述の試験(1)における主要排泄径路は尿中であつたが、本試験では雌雄とも大略等分に排泄され、低投与量の場合と異なることが認められた。

次に組織中への分布を下表に示す。

(ppm：デスメディファム換算)

性別	組 織 (ppm)															
	血液	血漿	肝臓	腎臓	副腎	肺	脾臓	筋肉	心臓	脂肪	骨	脳	眼	生殖	胃腸	カーカス
雄	3.71	0.55	3.29	2.48	0.81	1.11	0.90	0.77	3.61	1.24	0.50	nd	nd	0.24	0.61	3.88
雌	4.74	0.73	3.60	2.78	2.02	1.30	1.34	0.79	1.70	1.18	0.63	nd	nd	0.49	0.91	4.05

nd：検出せず

多くの組織への放射能の分布が認められた。最高濃度は血液に認められ、雄3.71ppm及び雌4.74ppmであった。

ついでカーカス、心臓、肝臓、腎臓及び副腎の順であった。

(3) 試験C: 非標識化合物を5mg/kgの用量で14日間反復投与した後、AP標識化合物を同用量で単回投与

尿・糞中への排泄に関する結果を下表に示す。

(投与放射能に対する割合%)

時間 (hrs)	雄					雌				
	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計
0~6	69.23	0.02	9.30	—	78.55	66.45	0.01	13.64	—	80.10
6~24	11.27	9.21	—	—	20.48	12.99	5.16	—	—	18.15
24~30	0.45	0.06	1.65	0.21	2.37	0.59	0.10	1.66	0.46	2.81
計	80.95	9.29	10.95	0.21	101.40	80.03	5.27	15.30	0.46	101.06

—: 測定せず

14日間5mg/kg連続投与した場合、最終投与後24時間で尿糞中に雄99.03%及び雌98.25% (但し、尿による汚れが原因と考えられるケージ洗浄液中放射能を含む) が排泄された。

糞中への排泄合計は雄で9.29%及び雌で5.27%であり、主要排泄径路は尿中であつた。

本試験における尿糞中の排泄割合及び主要排泄径路は試験(1)の単回経口投与試験の場合と同様であつた。

次に組織中への分布を下表に示す。

(ppm: デスメディファム換算)

性別	組 織 (ppm)															
	血液	血漿	肝臓	腎臓	副腎	肺	脾臓	筋肉	心臓	脂肪	骨	脳	眼	生殖	胃腸	カーカス
雄	0.01	0.01	0.02	nd	0.05	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	nd	0.05	0.02	0.03	0.01
雌	0.02	0.01	0.04	nd	0.06	nd	nd	nd	nd	nd	0.02	nd	0.03	0.03	0.20	0.03

nd: 検出せず

最高濃度を示した組織は胃腸管で雄0.03ppm及び雌0.20ppmであり、次いで副腎、眼及び肝臓の順であつた。

各組織中放射能濃度は低く、試験(1)の単回経口投与試験の場合とよく類似していたが、雌ではより高い濃度が認められた。

(4) 試験D: 標識、1000mg/kg、単回投与

尿・糞中への排泄に関する結果を下表に示す。

(投与放射能に対する割合%)

時間 (hrs)	雄					雌				
	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計	尿	糞	ケージ 洗浄液	カーカス	計
0~24	23.97	44.90	2.54	—	71.41	21.49	40.98	2.75	—	65.22
24~48	6.48	10.09	—	—	16.57	9.96	13.90	—	—	23.86
48~72	1.39	0.56	—	—	1.95	1.92	1.23	—	—	3.15
72~96	0.90	0.10	0.40	3.63	5.03	0.86	0.14	0.89	3.45	5.34
計	32.74	55.65	2.94	3.63	94.96	34.23	56.25	3.64	3.45	97.57

—: 測定せず

投与された放射能は投与後 24 時間で、尿糞中に雄 71.41%及び雌 65.22% (ケージ洗浄液中放射能を含む) が排泄された。投与後 96 時間での尿糞中への排泄合計は、雄 91.33%及び雌 94.12% (ケージ洗浄液中放射能を含む) であった。

資料No. 運命1におけるP標識デスメディファム5mg/kg単回経口投与での結果では主要排泄径路は尿中であつたが、1000mg/kg投与では糞中への排泄が主要径路と考えられた。このことはAP標識デスメディファムでみられた現象と同様であつた。

次に組織中への分布を下表に示す。

(ppm : デスメディファム換算)

性別	組 織 (ppm)															
	血液	血漿	肝臓	腎臓	副腎	肺	脾臓	筋肉	心臓	脂肪	骨	脳	眼	生殖腺	胃腸管	カーカス
雄	122.9	100.3	23.19	39.94	15.94	52.89	32.08	23.55	37.41	17.05	19.23	6.12	15.87	15.29	11.05	41.76
雌	170.9	119.7	28.59	50.55	28.48	59.82	39.66	27.44	47.13	21.73	19.91	9.03	14.84	35.12	12.63	42.14

測定した全ての組織で放射能が検出されたが、最高濃度を示した組織は血液で、雄122.9ppm及び雌で170.9ppmであつた。次いで、血漿、肺、腎臓、カーカス及び心臓の順であつた。

また、組織中放射能濃度は雄に比べ雌の方が全ての組織 (但し、眼を除く) で高かつた。このことは資料No. 運命1におけるP標識デスメディファム5mg単回経口投与の結果と同様であつた。

(5) 試験E : 非標識化合物を5mg/kgの用量で14日間反復投与した後、P標識化合物を同用量で単回投与

尿・糞中への排泄に関する結果を下表に示す。

(投与放射能に対する割合%)

時 間 (hrs)	雄					雌				
	尿	糞	ケージ洗浄液	カーカス	計	尿	糞	ケージ洗浄液	カーカス	計
0~24	76.58	9.73	4.07	—	90.38	62.70	18.39	5.24	—	86.33
24~48	1.65	1.97	—	—	3.62	2.81	1.42	—	—	4.23
48~72	0.68	0.73	—	—	1.41	1.17	0.15	—	—	1.32
72~96	0.48	0.12	0.49	1.91	3.00	1.02	0.12	0.74	3.53	5.41
計	79.39	12.55	4.56	1.91	98.41	67.70	20.08	5.98	3.53	97.29

— : 測定せず

14日間5mg/kg連続投与後に投与された放射能は、投与後24時間で尿糞中に雄90.38%及び雌86.33% (ケージ洗浄液中放射能を含む) が排泄された。

糞中への排泄合計は雄で12.55%及び雌で20.08%であり、主要排泄径路は尿中であつた。

本試験における尿糞中の排泄割合及び主要排泄径路は資料No. 運命1の場合とほぼ同様であつた。

次に組織中への分布を下表に示す。

(ppm : デスメディファム換算)

性別	組 織 (ppm)															
	血液	血漿	肝臓	腎臓	副腎	肺	脾臓	筋肉	心臓	脂肪	骨	脳	眼	生殖	胃腸	カーカス
雄	0.66	0.43	0.16	0.19	0.19	0.19	0.19	0.07	0.19	0.11	0.08	0.05	0.05	0.07	0.05	0.12
雌	1.03	0.76	0.24	0.34	0.26	0.35	0.30	0.14	0.30	0.15	0.11	0.07	0.07	0.25	0.11	0.21

組織中放射能濃度は、雄に比べて雌の方が全組織において高かった。最高濃度を示した組織は血液で、雄0.66ppm及び雌1.03ppmであり、次いで血漿、肺、腎臓、脾臓、心臓及び副腎の順であった。本試験における組織中への分布程度は資料No. 運命1とほぼ同様であった。

(6) 標識位置の比較

上記の5試験の排泄パターン及び全排泄量の比較は以下のように要約される。

A 排泄経路による排泄パターン

試験内容	標識位置	全排泄放射能の分布			
		尿 (ケージ洗液含)		糞	
		雄	雌	雄	雌
単回 5mg	AP	91.48	90.50	7.51	8.80
	P*	69.78	72.07	17.35	17.53
単回 1000mg	AP	48.71	50.77	50.65	50.77
	P	35.68	37.87	55.65	56.25
反復 5mg	AP	91.90	95.33	9.29	5.27
	P	83.95	73.68	12.55	20.08

* 資料No. 運命1から引用

両標識位置のデスメディファムとも、低用量の単回投与及び低用量の非標識化合物を14日間反復投与後、標識化合物を投与した場合、主要排泄経路は尿であった。一方、高用量の単回投与ではAP標識化合物は糞、尿にほぼ同量が排泄されたが、P標識では糞が主要な排泄経路であった。

B 標識位置による全排泄量の比較

試験内容	標識位置	屠殺時間 (hrs)	全排泄放射能 (%)	
			雄	雌
単回 5mg	AP	30	98.99	99.30
	P*	96	87.13	89.60
単回 1000mg	AP	96	99.36	101.54
	P	96	91.33	94.12
反復 5mg	AP	30	101.19	100.60
	P	96	96.50	93.76

* 資料No. 運命1から引用

いずれの投与方法の場合もAP標識化合物の排泄の方が完全であった。

(7) 吸収率の推定（申請者による）

被験物質の水に対する溶解度が低く（9ppm、25℃）、静脈内投与試験の実施が不可能なため、被験物質の排泄率の経口投与／静脈投与の比から吸収率を推定することはできなかった。

本試験及び資料No. 運命1の試験から低用量（5mg/kg）の単回投与後の尿中への被験物質の排泄率（ケージ洗浄液も含む）は以下のように求められている。

当試験	AP標識	雄	91.48%
		雌	90.49%
資料No. 運命1の試験	AP標識	雄	85.43%
		雌	90.65%
	P標識	雄	69.78%
		雌	72.07%

これらの経口投与後の高い尿中排泄率の数値から、被験物質の吸収率は少なくとも約70～90%と推定される。

以上のことからデスメディファムの¹⁴C-標識位置及び投与量の多少、並びに投与方法の相違により、尿糞中への排泄割合が変化することを除いて、いずれの場合も投与放射能は速やかに吸収・排泄された。単回投与の場合、低用量と高用量の排泄経路、排泄速度に性差は認められなかった。また、放射能の臓器及び組織への選択的な蓄積は認められなかった。なお、組織内放射能は雄よりも雌の方が高い傾向が認められた。

1. 動物体内運命に関する試験

- (3) ^{14}C 標識デスメディファムのラットにおける代謝試験 (資料No. 運命-3)
(代謝物の分離同定)

試験機関:

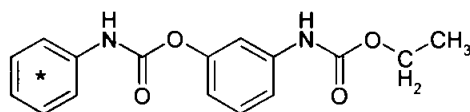
報告書作成年: 1993年

本試験では、主として資料No. 運命2の試験、即ち分子の2つの位置を別々に標識したデスメディファムの低用量と高用量の単回経口投与及び低用量の反復投与後に得られた排泄物中の代謝物の同定を行った。

供試標識化合物:

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

- (1) ^{14}C -フェニル環標識デスメディファム (P標識) +

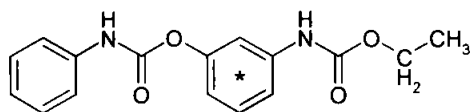


* ^{14}C 標識位置

比放射能: 59.1 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 98%以上

- (2) ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識) ++



* ^{14}C 標識位置

比放射能: 17.2 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: 98%以上

+ 原報ではPC標識と記載されている

++ 原報ではEPC標識と記載されている

供試動物: CD (SD) BR系ラット (6~8週齢) ; 資料No.運命2の試験と同じ

方法:

飼育管理、投与方法は資料No. 運命2に記載。

同定及び定量法: 各試料中の放射能の定性及び定量は次の機器及び操作条件で分析した。

- (1) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

展開溶媒

A: ジクロロメタン: ジエチルエーテル (7:3)

B: トルエン: 酢酸エチル (2:1)

C: トルエン: アセトン (85:15)

D: クロロホルム: メタノール: 酢酸 (95:5:1)

E : ヘキサン : 酢酸エチル (5 : 1)

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

カラム : Hypersil 5 ODS (250×4.6mm)

Hypersil 50 ODS (250×10mm)

展開溶媒

A : 90%メタノール、10%8mMウラリル硫酸Na水溶液及び0.2%酢酸

B : 10%メタノール、90%8mMウラリル硫酸Na水溶液及び0.2%酢酸

展開は濃度勾配法で次の通り行った。

濃度勾配(1) : 95%Bで12分間、次いで18分間で直線勾配で5%Bに下げ、続いて5%Bで10分間展開した後、5分間で初期の条件に戻す。

濃度勾配(2) : 95%Bから18分間で直線勾配で5%Bに下げ、そのまま5%Bで10分間展開した後、5分間で初期の条件に戻す。

濃度勾配(3) : 80%Bで12分間、次いで10分間で直線勾配で5%Bに下げ、続いて5%Bで10分間展開した後、10分間で初期の条件に戻す。

濃度勾配(4) : 95%Bで10分間、次いで20分間で直線勾配で5%Bに下げ、そのまま5%Bで10分間展開した後、5分間で初期の条件に戻す。

(3) FID付ガスクロマトグラフィー (GLC)

カラム : DB-5MS、30m、内径0.53mm

昇温条件 : 初期温度130°Cとし、毎分10°Cで250°Cまで昇温

(4) 酵素による加水分解

尿試料の一部に酢酸緩衝液 (pH5.0) 及びカタツムリ消化液 (Helixpo
matia) を加え、少なくとも16時間37°Cで反応させた。

なお、フェノールフタレイングルクロン酸抱合体及びカテコール硫酸塩を基質として用いて、カタツムリ消化液中のβ-グルクロニダーゼ活性及びアリルスルファターゼ活性を確認した。

尿及び糞試料の処理 :

(1) 尿試料

代謝物の同定には、少なくとも3種の異なる展開溶媒系を用いてTLCを行った。同定代謝物の定量は、TLCで代謝物を確認するとともに、HPLCで行った。また、尿試料を酵素を用いて加水分解し、上記と同様TLC及びHPLCで分析した。

(2) 糞試料

糞磨砕液を調製し、遠心分離して上澄液及び沈殿物に分離後、各々別々に分析した。上澄液は尿と同様に酵素加水分解し、TLC及びHPLCで分析し

た。

沈殿物を凍結乾燥後、メタノールを用いて一晚ソックスレー抽出した。抽出残渣は分析しなかった。メタノール抽出液をTLC及びHPLCで分析した。

結果：

(1) 試験A： 標識デスメディファム、5mg/kg、単回経口投与

排泄物中の代謝物：

(投与放射能に対する百分率%)

	尿		糞		合計	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
DMP (親化合物)	—	—	0.92	0.92	0.92	0.92
EHPC (代謝物B)	62.30	65.80	2.33	2.99	64.63	68.79
3-AAP (代謝物F)	8.28	10.90	0.47	0.42	8.75	11.32
未知物質 4点	4.81	6.67	—	—	4.81	6.67
					79.11	87.70

尿糞の両者における主要代謝物はEHPC (N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート) (代謝物B) であり、糞では遊離の形で、尿ではグルクロン酸及びサルフェートの抱合体として存在する。微量の親化合物が糞に検出されたが、尿中には認められなかった。糞中に構造未知の4つのピークが認められたが、いずれも処理放射エネルギーの0.5%以下であったので、以降の検討は行わなかった。尿中の構造未知物質は、尿を酵素加水分解後、高用量群 (1000mg) のそれとHPLCで比較した結果、同じ代謝物であろうと推定された。

(2) 試験B： AP標識デスメディファム、1000mg/kg、単回経口投与

排泄物中の代謝物：

(投与放射能に対する百分率%)

	尿		糞		合計	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
DMP (親化合物)	—	—	38.35	34.25	38.35	34.25
EHPC (代謝物B)	24.32	30.60	11.73	13.21	36.05	43.81
3-AAP (代謝物F)	8.44	7.43	0.10	0.05	8.54	7.48
3-AP (代謝物D)	1.81	2.16	—	—	1.81	2.16
未知物質 U1	0.67	0.50	—	—	0.67	0.50
未知物質 U2	4.24	2.34	—	—	4.24	2.34
未知物質 U3	1.55	2.07	—	—	1.55	2.07
極性物質	0.92	0.72	—	—	0.92	0.72
					92.13	93.33

尿、糞の両者における主要代謝物はEHPC (代謝物B) で、糞では遊離の形で、尿ではグルクロン酸及びサルフェートの抱合体として存在した。親化合物は糞にのみ検出され、尿には認められなかった。尿中には相当量の3-AAP (3-アセトアミドフェノール) (代

謝物F) と痕跡量の3-AP (3-アミノフェノール) (代謝物D) が検出された。尿中代謝物として、3-AAP (代謝物F) とEHPC (代謝物B) の間に溶離されたピークは雄で約4%、雌で約2%を占めたが、このピークは以降の検討の結果、EHPC : N-(3-ヒドロキシフェニル)-ヒドロキシエチルカルバマート (代謝物B) と推定された。

- (2) 試験C: 非標識デスメディファム、5mg/kgを14日間反復経口投与した後、
標識デスメディファムの同用量を単回投与

排泄物中の代謝物 :

(投与放射能に対する百分率%)

	尿		糞		合計	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
DMP (親化合物)	—	—	0.81	0.81	0.81	0.81
EHPC (代謝物B)	67.77	65.71	4.05	2.20	71.82	67.91
3-AAP (代謝物F)	7.47	12.41	0.06	0.03	7.53	12.44
3-AP (代謝物D)			0.06	0.07	0.06	0.07
未知物質 U1	} 6.21	} 7.89	0.39	0.25	} 7.37	} 8.47
未知物質 U2			0.77	0.33		
未知物質 U3						
極性物質			0.23	0.03	0.23	0.03
					87.82	89.73

尿、糞の両者における主要代謝物はEHPC (代謝物B) で、糞では遊離の形で、尿ではグルクロン酸及びサルフェートの抱合体として存在した。親化合物は糞にのみ微量検出された。相当量の3-AAP (代謝物F) が尿中に認められた。本試験の尿を酵素加水分解したものと、試験Bの尿を加水分解したものをHPLCを用いて比較した結果、加水分解尿中の未知物質は同じであることが確認された。

- (4) 試験D : 標識デスメディファム、1000mg/kg、単回経口投与

排泄物中の代謝物 :

(投与放射能に対する百分率%)

	尿		糞		合計	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
DMP (親化合物)	—	—	29.01	31.47	29.01	31.47
EHPC (代謝物B)	—	—	—	—	—	—
3-AAP (代謝物F)	0.76	1.33	—	—	0.76	1.33
4-AAP (代謝物G)	10.36	11.63	—	—	10.36	11.63
PMC (代謝物I)	—	—	23.18	18.20	23.18	18.20
3-AP (代謝物D)	1.55	0.75	—	—	1.55	0.75
4-AP (代謝物E)	1.39	0.99	—	—	1.39	0.99
極性物質	3.40	8.87	1.68	2.13	5.08	11.00
					71.33	75.37

糞中代謝物として未変化の親化合物とPMC (N-(フェニル)メチルカルバマート) (代謝物I) 及び微量の極性代謝物質が検出、定量された。糞の主要代謝物はPMC (代謝物I) であったが、これは尿からは検出されなかった。尿の主要代謝物は4-AAP (4-アセトアミドフェノール) (代謝物G) であった。これ以外に、少量の3-AAP (代謝物F)、3-AP (代謝物D)、4-AP (代謝物E) も検出された。

雌の尿に多く存在した極性物質は酸による加水分解を行って検討した結果、その一部は酵素加水分解されなかった4-AP (代謝物E) あるいは3-AP (代謝物D) のN-グルクロナイドと推定された。

- (5) 試験E: 非標識デスメディファム、5mg/kgを14日間反復経口投与した後、標識デスメディファムの同用量を単回投与

排泄物中の代謝物：

(投与放射能に対する百分率%)

	尿		糞		合計	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
DMP (親化合物)	—	—	1.97	3.06	1.97	3.06
3-AAP (代謝物F)	—	—	0.01	0.22	0.01	0.22
4-AAP (代謝物G)	67.62	52.56	0.57	0.52	68.19	53.08
PMC (代謝物I)	—	—	2.80	2.64	2.80	2.64
3-AP (代謝物D)	—	—	0.09	0.48	0.09	0.48
4-AP (代謝物E)	—	—	0.10	0.02	0.10	0.02
未知物質 U1	—	2.92	—	—	—	2.92
極性物質	1.66	5.64	0.68	1.6	2.34	7.24
					75.50	69.66

糞中代謝物として未変化のDMPの他、PMC (代謝物I)、3-AAP (代謝物F)、4-AAP (代謝物G)、3-AP (代謝物D)、4-AP (代謝物E) が検出されたが、主要代謝物はPMCと判断された。尿中には酵素加水分解後、多量の4-AAPが検出された。

代謝物のまとめ

上記の5試験で検出された代謝物を標識別、用量別、性別にまとめた結果は以下の通りである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

		親化合物		代謝物 B		代謝物 I		代謝物 F		代謝物 D		代謝物 G		代謝物 E		極性物質		排泄割合		
		DMP		EHPC		PMC		3-AAP		3-AP		4-AAP		4-AP		未同定等		(% of dose)		
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
A 群 AP; 5, S	糞	12.3 (0.9)	10.4 (0.9)	31 (2.3)	34 (3.0)			5.8 (0.4)	4.8 (0.4)											
	尿			70 (62.3)	70 (65.8)			9.3 (8.3)	11.6 (10.9)							5.4 (4.8)	7.1 (6.7)	(89)	(94)	
B 群 AP; 1000, S	糞	75.3 (38.4)	67.3 (34.3)	23 (11.7)	25.9 (13.2)			0.2 (0.1)	0.1 (0.1)										(51)	(51)
	尿			57.9 (24.3)	68 (30.6)			20.1 (8.4)	16.5 (7.4)	4.3 (1.8)	4.8 (2.2)					17.6 (7.4)	12.5 (5.6)	(42)	(45)	
C 群 AP; 5, R	糞	8.7 (0.8)	15.6 (0.8)	43.6 (4.7)	42.4 (2.2)			0.7 (0.1)	0.5 (-)	0.7 (0.1)	1.4 (0.1)					15.1 (1.4)	11.7 (0.6)	(9.3)	(5.2)	
	尿			75.3 (67.8)	69.9 (65.7)			8.3 (7.5)	13.2 (12.4)							6.9 (6.2)	8.4 (7.9)	(90)	(94)	
D 群 P; 1000, S	糞	51.8 (29.0)	56.2 (31.5)			41.4 (23.2)	32.5 (18.2)												(56)	(56)
	尿							2.3 (0.8)	3.9 (1.3)	4.7 (1.6)	2.2 (0.7)	30.3 (10.0)	33 (11.2)	4.2 (1.4)	2.9 (1.0)	10.3 (3.4)	26.1 (8.9)	(33)	(34)	
E 群 P; 5, R	糞	15.2 (2.0)	15.3 (3.1)			21.5 (2.8)	13.2 (2.6)	0.1 (-)	1.1 (0.2)	0.7 (0.1)	2.4 (0.5)	4.4 (0.6)	2.6 (0.5)	0.8 (0.1)	0.1 (-)	5.2 (0.7)	8.1 (1.6)	(13)	(20)	
	尿											85.6 (67.6)	77.3 (52.6)			2.1 (1.7)	12.6 (8.6)	(79)	(68)	

AP : アミノフェノキシ標識 P : フェニル標識 S : 単回投与 R : 反復投与

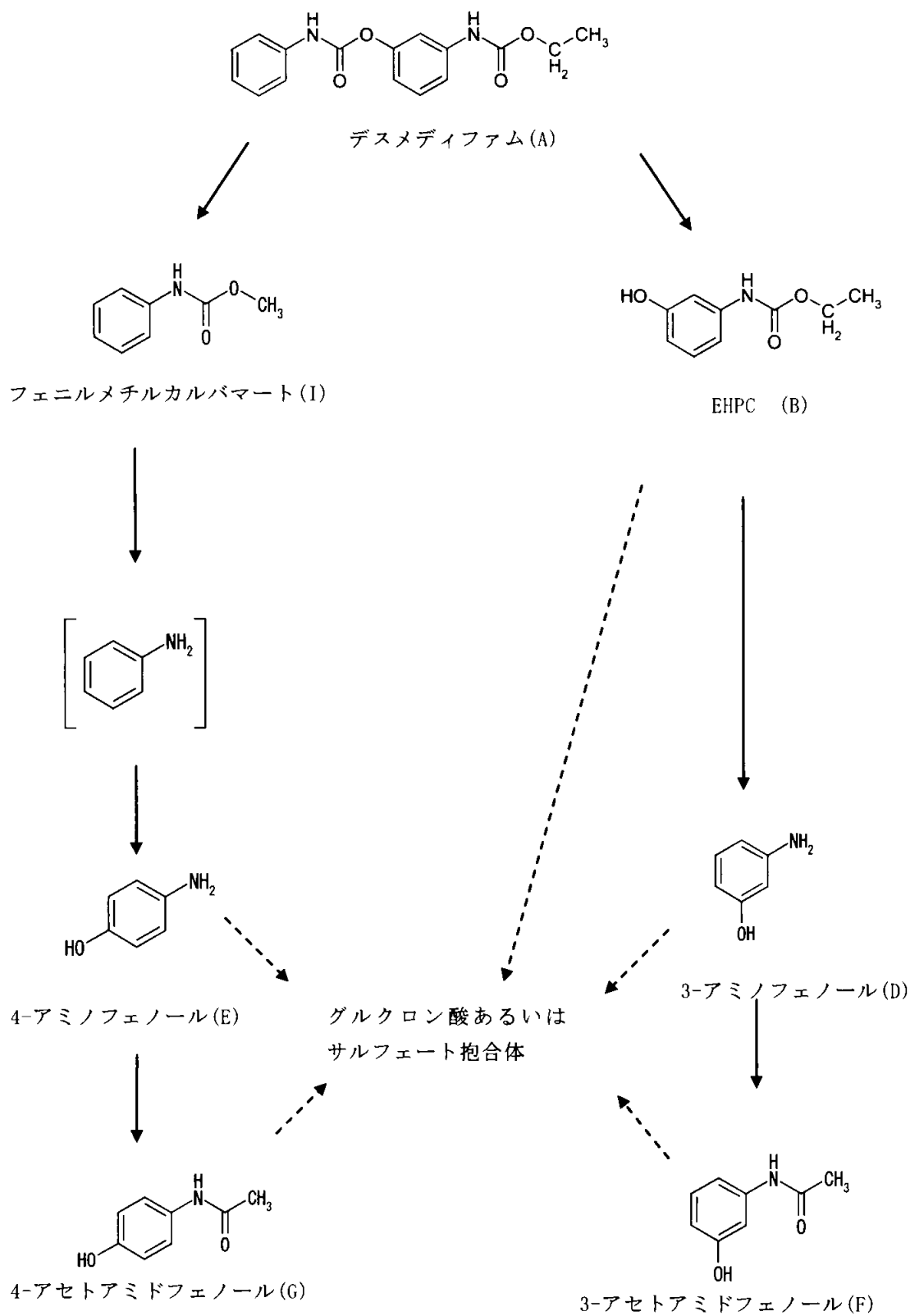
3-AAP : 3-アセトアミトフェノール 4-AAP : 4-アセトアミトフェノール 3-AP : 3-アミノフェノール 4-AP : 4-アミノフェノール

上記の各試験の結果は以下のように要約される；

- (1) デスメディファムの代謝の最初の段階は2つの環の間のカーバマート結合の加水分解である。
- (2) AP標識デスメディファムの主要代謝物はEHPC(N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート) (代謝物B) であり、糞では遊離の形で、尿ではグルクロン酸及びサルフェートとの抱合体の形で存在した。
- (3) AP標識のデスメディファムの他の主要代謝物は、3-AAP(3-アセトアミドフェノール) (代謝物F) であり、これには微量の3-AP(3-アミノフェノール) (代謝物D) を伴っていた。両者は主としてサルフェート及びグルクロン酸の抱合体として存在した。
- (4) P標識デスメディファムの糞の主要代謝物はPMC(N-(フェニル)メチルカルバマート) (代謝物I) であり、これは尿中には認められなかった。
- (5) P標識デスメディファムの尿の主要代謝物は4-AAP(4-アセトアミドフェノール) (代謝物G) であり、主としてグルクロン酸及びサルフェートの抱合体として存在した。
- (6) P標識デスメディファムのマイナーな代謝物は4-AP(4-アミノフェノール) (代謝物E) 、3-AP(3-アミノフェノール) (代謝物D) 及び3-APP (代謝物F) であり、これらは主としてグルクロン酸及びサルフェートの抱合体として存在した。
- (7) 親化合物のデスメディファムは尿中には排泄されなかったが、実施したすべての試験で糞から検出された。
- (8) AP標識デスメディファムの投与前に、非標識化合物を14日間反復投与した場合、尿中代謝物には差は認められなかったが、糞中の親化合物量が減り、EPHCの量が増加した。

次頁に推定代謝経路を示す。

デスメディファムのラットにおける推定代謝経路



1. 動物体内運命に関する試験

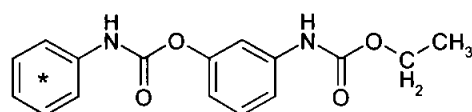
- (4) ^{14}C 標識デスメディファムのラットにおける代謝試験 (資料No. 運命-4)
(低用量(5mg/kg)と高用量(1000mg/kg)を経口投与した後の組織内分布)

試験機関:

報告書作成年: 1993年

供試標識化合物:

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート
フェニル環標識デスメディファム (P標識)



* ^{14}C 標識位置

本試験の被験物質の標識については、以前に実施した試験(資料No. 運命2)で、フェニル環標識(P標識)デスメディファムの排泄速度が、アミノフェノキシ標識(AP標識)デスメディファムよりも遅いことが認められているので、排泄速度の遅い(残留期間が長いと考えられる)P標識を選択した。

比放射能: 157 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 、5.80mBQ/mg

放射化学的純度: 100%及び97.31%

供試動物: CD (SD) BR系ラット (6~8週齢)

体重範囲 124~148g

雌雄各18匹 (低用量群、高用量群とも)

方法:

飼育管理: 標識化合物を投与した後、動物は尿及び糞を分離採取できる代謝ケージに収容し、飼料と水は自由に摂取させた。

投与: P標識したデスメディファムを1%トラガカントゴム水溶液にそれぞれ懸濁して投与溶液を調製し、低用量(5mg/kg)と高用量(1000mg/kg)の投与量で経口投与した。投与量はデスメディファムの無作用量(NOEL)である5mg/kg(低用量)と実用上投与し得る最高用量としての1000mg/kgを選択した。

投与: P標識したデスメディファムを1%トラガカントゴム水溶液にそれぞれ懸濁して投与溶液を調製し、低用量(5mg/kg)と高用量(1000mg/kg)の投与量で経口投与した。投与量はデスメディファムの無作用量(NOEL)である5mg/kg(低用量)と実用上投与し得る最高用量と

しての1000mg/kgを選択した。

試料採取：雌雄各3匹ずつを投与後下記の時間に屠殺し、血液を採取した後臓器を摘出、採取した。

低用量群：2、8、24、72、120、168時間

高用量群：12、24、36、72、144、216時間

採取した臓器

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、生殖腺、眼、副腎、骨、腎脂肪、胃腸管、カーカス、甲状腺

放射能の測定：

- i) 副腎、眼、卵巣、甲状腺、筋肉、脂肪；全臓器あるいは秤量した一部の臓器をSHTで可溶化し、塩酸酸性としScintran FHVシンチラントと混合。
- ii) 胃腸管とカーカス；水酸化ナトリウム（10M）を用い、室温で4週間かけて軟化した後、ホモジェネートを調製し、Scintran FHVと混合。
- iii) 骨と血液；試料をサンプルオキシダイザー中で燃焼させ、発生した¹⁴CO₂をCarbosorb/Permafluorで吸収、捕集。
- iv) 血漿；試料を直接Scintran FHVシンチラントに混合。

上記のようにして調製した試料を液体シンチレーション計数した。

組織内分布率の計算：残留放射能の組織内分布率は下式を用いて計算した。

$$\frac{\text{臓器／組織（全重量）中の放射能 dpm}}{\text{ラットに投与した全放射能 dpm}}$$

なお、血液、血漿、筋肉、脂肪の重量は、既存の公表データに基づき、それぞれ体重の7%、4%、45.5%及び7.1%として計算した。

結 果：

(1) 臓器／組織中の残留放射能濃度の経時的変化

低用量 (5mg/kg) 群

単位：mg (デスメディファム換算) /kg組織

臓 器	性	投与後経過時間					
		2時間	8時間	24時間	72時間	120時間	168時間
副 腎	雄	0.57	0.27	0.17	0.10	0.09	0.06
	雌	1.02	0.52	0.26	0.17	0.15	0.12
血 液	雄	2.60	1.64	0.98	0.64	0.37	0.24
	雌	3.71	2.94	1.47	0.82	0.59	0.60
脳	雄	0.19	0.06	0.03	BLQ	BLQ	BLQ
	雌	0.33	0.13	0.05	0.03	0.02	0.02
カーカス	雄	0.66	0.43	0.24	0.16	0.09	0.07
	雌	0.90	0.55	0.33	0.21	0.15	0.15
眼	雄	0.18	0.09	0.05	0.04	0.02	0.02
	雌	0.21	0.17	0.06	0.04	0.05	0.04
胃腸管	雄	15.97	3.37	0.19	0.05	0.02	0.02
	雌	22.54	8.15	0.46	0.08	0.05	0.04
心 臓	雄	0.86	0.48	0.27	0.18	0.09	0.06
	雌	1.01	0.77	0.39	0.18	0.14	0.12
腎 臓	雄	2.87	0.99	0.37	0.21	0.09	0.05
	雌	3.36	1.67	0.55	0.29	0.15	0.15
肝 臓	雄	2.68	0.97	0.28	0.17	0.10	0.06
	雌	4.46	1.74	0.55	0.27	0.15	0.10
肺	雄	0.90	0.54	0.33	0.25	0.11	0.07
	雌	1.35	0.95	0.49	0.28	0.16	0.19
筋 肉	雄	0.36	0.20	0.14	0.10	0.05	0.04
	雌	0.70	0.30	0.19	0.12	0.08	0.08
血 漿	雄	2.08	1.60	0.97	0.54	0.23	0.08
	雌	2.31	2.23	1.23	0.57	0.33	0.22
腎脂肪	雄	1.02	0.44	0.19	0.09	0.05	0.02
	雌	0.97	0.51	0.25	0.09	0.06	0.05
脾 臓	雄	0.69	0.37	0.20	0.13	0.09	0.06
	雌	1.13	0.72	0.37	0.21	0.15	0.15
精 巢	雄	0.45	0.25	0.15	0.12	0.03	0.01
甲状腺	雄	0.49	0.35	0.21	0.14	0.07	0.08
	雌	0.57	0.60	0.25	0.13	0.13	0.17
卵 巢	雌	0.82	0.60	0.31	0.15	0.11	0.10

BLQ：定量限界以下

高用量 (1000mg/kg) 群

単位：mg (デスメディファム換算) /kg組織

臓器	性	投与後経過時間					
		12時間	24時間	36時間	72時間	144時間	216時間
副腎	雄	34.32	15.68	17.41	7.66	4.12	3.29
	雌	48.30	35.11	30.97	14.61	7.16	4.13
血液	雄	165.92	115.65	101.13	69.84	41.20	28.89
	雌	218.44	249.33	179.20	95.90	56.96	40.62
脳	雄	13.86	5.36	4.72	3.34	2.05	1.60
	雌	15.79	12.78	7.98	4.51	3.10	2.04
カーカス	雄	35.51	30.10	27.03	19.66	11.82	9.39
	雌	54.69	64.80	47.80	24.45	16.12	9.30
眼	雄	10.38	6.32	6.44	4.75	3.80	3.56
	雌	10.76	12.30	8.40	5.90	4.60	3.02
胃腸管	雄	1519.54	210.37	30.54	9.32	3.34	2.86
	雌	2321.18	960.95	124.16	8.53	4.53	2.48
心臓	雄	50.30	32.79	31.73	17.83	8.57	6.96
	雌	63.22	62.93	46.35	22.99	12.58	10.11
腎臓	雄	75.47	42.86	30.50	24.09	10.26	7.52
	雌	86.82	101.39	57.33	34.07	15.98	8.52
肝臓	雄	95.72	24.23	21.52	13.58	6.98	3.58
	雌	82.34	78.47	38.95	15.95	7.88	4.30
肺	雄	59.10	42.64	40.05	25.50	13.29	9.13
	雌	72.67	82.52	64.05	28.42	20.44	11.98
筋肉	雄	24.91	16.31	19.91	11.44	6.42	4.72
	雌	26.25	28.79	24.86	14.44	8.75	5.39
血漿	雄	126.12	120.14	107.72	61.40	19.58	8.33
	雌	134.04	191.99	154.53	69.39	22.53	7.06
腎脂肪	雄	55.34	16.61	14.12	8.86	4.94	3.05
	雌	46.27	42.00	22.75	9.24	6.03	2.04
脾臓	雄	43.45	22.37	20.61	13.28	6.41	5.37
	雌	52.69	50.59	36.23	20.27	12.12	5.29
精巣	雄	23.49	18.26	17.30	10.03	3.77	1.85
甲状腺	雄	27.74	19.11	27.83	13.31	7.03	7.64
	雌	30.49	32.74	33.01	13.13	9.85	5.64
卵巣	雌	47.43	49.59	48.84	14.71	8.12	4.60

(2) 臓器／組織中の残留放射能分布率の経時的変化

低用量 (5mg/kg) 群；表中の数値は $\frac{\text{各組織中の放射能量}}{\text{投与した放射能量}} \times 10^4$

臓器	性	投与後経過時間					
		2時間	8時間	24時間	72時間	120時間	168時間
副腎	雄	0.33	0.18	0.10	0.07	0.03	0.03
	雌	0.81	0.35	0.26	0.12	0.09	0.08
血液	雄	355.20	228.75	133.59	87.19	50.98	33.43
	雌	508.25	413.13	199.52	112.58	77.65	83.63
脳	雄	3.78	1.34	0.62	0.44	BLQ	BLQ
	雌	7.33	3.11	1.25	0.69	0.43	0.55
カーカス	雄	939.40	633.20	366.88	286.04	159.40	142.27
	雌	1292.63	831.05	517.75	351.04	246.73	282.97
眼	雄	0.46	0.27	0.14	0.11	0.06	0.05
	雌	0.57	0.59	0.19	0.14	0.11	0.12
胃腸管	雄	4521.59	1124.17	55.58	14.54	8.88	6.89
	雌	5554.59	2089.78	127.40	23.71	11.81	13.06
心臓	雄	7.34	4.33	2.44	1.82	0.99	0.57
	雌	8.52	7.00	3.62	1.80	1.36	1.13
腎臓	雄	51.38	19.17	7.21	4.68	2.17	1.37
	雌	60.61	32.01	11.18	6.30	3.12	3.08
肝臓	雄	184.12	82.81	37.88	21.42	13.97	8.85
	雌	323.79	134.87	62.72	33.08	16.23	13.23
肺	雄	10.35	6.15	3.83	3.52	1.58	0.99
	雌	16.60	12.07	6.10	4.25	2.47	2.69
筋肉	雄	321.58	182.82	119.53	88.85	41.90	32.14
	雌	626.26	274.49	167.67	107.43	68.39	70.72
血漿	雄	162.20	127.67	75.45	42.25	18.53	5.89
	雌	180.52	178.65	94.80	44.89	24.19	17.50
腎脂肪	雄	141.70	62.94	25.83	11.62	7.08	3.11
	雌	134.83	72.94	34.75	12.20	8.45	6.81
脾臓	雄	4.15	1.87	1.44	0.94	0.69	0.51
	雌	6.34	3.99	2.21	1.36	0.96	0.92
精巣	雄	10.38	5.53	3.96	1.67	1.04	0.41
甲状腺	雄	0.34	0.06	0.08	0.06	0.02	0.02
	雌	0.31	0.07	0.09	0.07	0.03	0.04
卵巣	雌	1.62	0.98	0.48	0.24	0.17	0.20

BLQ：定量限界以下

高用量 (1000mg/kg) 群 ; 表中の数値は $\frac{\text{各組織中の放射能量}}{\text{投与した放射能量}} \times 10^4$

臓器	性	投与後経過時間					
		12時間	24時間	36時間	72時間	144時間	216時間
副腎	雄	0.10	0.06	0.04	0.02	0.01	0.01
	雌	0.16	0.20	0.10	0.05	0.03	0.02
血液	雄	118.87	81.78	71.41	49.27	26.76	20.70
	雌	150.34	175.16	123.46	66.44	41.76	27.74
脳	雄	1.41	0.54	0.50	0.36	0.21	0.18
	雌	1.72	1.37	0.87	0.52	0.35	0.25
カーカス	雄	263.46	242.40	205.70	176.15	110.17	111.62
	雌	408.05	501.09	362.40	208.16	152.48	89.70
眼	雄	0.13	0.09	0.08	0.06	0.05	0.06
	雌	0.14	0.18	0.11	0.09	0.07	0.04
胃腸管	雄	2437.27	284.50	40.55	13.52	5.88	5.82
	雌	3242.50	1274.64	150.22	12.22	8.67	3.57
心臓	雄	2.09	1.53	1.40	0.90	0.43	0.44
	雌	2.85	2.95	2.08	1.05	0.67	0.57
腎臓	雄	7.66	4.45	3.08	2.82	1.18	1.02
	雌	8.97	9.90	5.49	3.42	1.89	0.96
肝臓	雄	48.31	16.84	14.05	8.99	4.45	3.09
	雌	36.01	45.54	20.77	10.21	5.59	2.63
肺	雄	4.16	2.60	2.85	1.81	1.02	0.74
	雌	4.65	5.82	4.16	1.97	1.52	0.90
筋肉	雄	116.18	75.00	91.32	52.48	27.14	22.02
	雌	117.66	131.72	111.33	64.95	41.63	23.87
血漿	雄	51.61	48.52	43.43	24.75	7.21	3.43
	雌	52.73	77.20	60.84	27.45	9.69	2.75
腎脂肪	雄	40.23	11.92	10.10	6.34	3.20	2.22
	雌	32.34	29.96	15.90	6.49	4.43	1.41
脾臓	雄	1.48	0.60	0.58	0.46	0.37	0.40
	雌	1.51	1.58	1.08	0.63	0.54	0.33
精巣	雄	2.87	2.11	2.17	1.35	0.52	0.33
甲状腺	雄	0.02	0.04	0.06	0.03	0.01	0.02
	雌	0.03	0.07	0.04	0.03	0.02	0.01
卵巣	雌	0.36	0.36	0.32	0.10	0.06	0.04

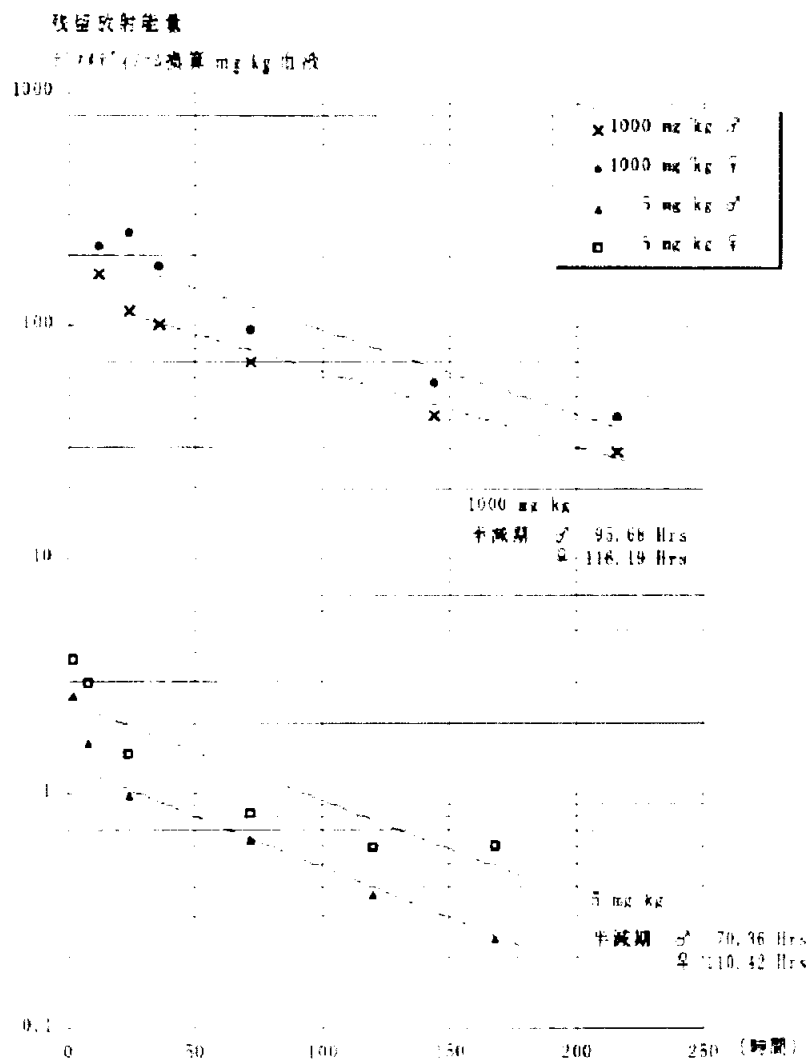
(3) 血液中の被験物質の薬動学的解析

予備試験（低用量群、高用量群とも雌雄各2匹*）のデータから、デスマディファムを経口投与した後の血液中の薬動学的パラメータは下記のように求められた。

* 低用量群の雌1匹はデータ欠。

動物番号	用量 (mg/kg)	T max (時間)	C max ($\mu\text{g/g}$)
1	5	2.32	1.53
2	5	1.50	1.47
4	5	2.50	3.31
5	1000	16.5	146
6	1000	9.08	136
7	1000	21.1	283
8	1000	17.8	200

血液中のデスマディファムの経時的消長



前図のデータから最小二乗法による回帰直線を求めて算出した血液中の最終半減期、及びその他のパラメータは以下の通りである。

投与量 (mg/kg体重)		5		1000	
性別		雄	雌	雄	雌
全血	Tmax (hr)	2	2	12	24
	Cmax ($\mu\text{g eq./g}$)	2.60	3.71	165.92	218.44
	T1/2 (hr)	70.36	110.42	95.68	116.19
	AUC 0-168 (hr \cdot $\mu\text{g eq./g}$)	114	176	13584	20656
血漿	Tmax (hr)	2	2	12	24
	Cmax ($\mu\text{g eq./g}$)	2.08	2.31	126.12	191.99
	T1/2 (hr)	39.03	58.55	48.33	40.49
	AUC 0-216 (hr \cdot $\mu\text{g eq./g}$)	95.8	122	10566	13244

(4) 主要臓器における残留放射能の最終半減期

肝臓及び腎臓中の残留放射能の最終半減期は次表の通りであった。

臓器	最終半減期 (時間)			
	低用量 (5mg/kg) 群		高用量 (1000mg/kg) 群	
	雄	雌	雄	雌
肝臓	63.60	59.43	69.69	76.14
腎臓	50.08	73.04	84.17	66.31

(5) 組織中の残留放射能濃度と分布率のまとめ

i) 低用量 (5mg/kg)、高用量 (1000mg/kg) の両投与群とも、組織中の残留放射能は経時的に着実な消失を示した。低用量群では投与後168時間、高用量群では投与後9日で、組織中残留量は極めて微量となった。

ii) 低用量群では、胃腸管を除いて最も高い放射能残留が認められた臓器は、投与2時間の肝臓であり、高用量群でも最も高い残留の認められた臓器は肝臓であったが、いずれも着実に消失した。

iii) 残留放射能の分布率の高かった臓器は、低用量群、高用量群とも胃腸管を除きカーカスであったが、いずれも経時的に速やかに消失した。

iv) 組織中の残留放射能濃度は、低用量群より高用量群の方が高く、また一貫して雌の方が雄より高かった。

2. 植物体内運命に関する試験

(1). ^{14}C 標識デスメディファムのでんさいにおける代謝試験 (資料No. 運命-5)

試験機関:

報告書作成年: 1989年

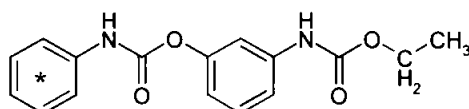
[申請者註]

デスメディファム (DMP) は、既に日本でも登録、上市されているフェンメディファム (PMP) と化学構造が極めて類似しているビス-カルバマート系化合物である。両化合物の物理化学的性質、植物における生理学的性質は極めて類似しているので、デスメディファムの代謝試験を実施するにあたり、フェンメディファムの代謝試験で既に確認されている所見を一部利用した。即ち、適切な試験方法の決定などは、既に得られているフェンメディファムの知見に基づいて行った。さらにフェンメディファムについて詳細に検討された抱合体の構造決定を参考に、デスメディファムの極性代謝物-抱合体-については、その構造を推定した。

供試標識化合物:

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

(1) ^{14}C -フェニル環標識デスメディファム (P標識)

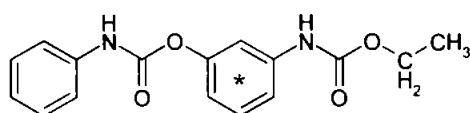


* ^{14}C 標識位置

比放射能: $64.8 \mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: $>98\%$

(2) ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



* ^{14}C 標識位置

比放射能: $59.2 \mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: $>98\%$

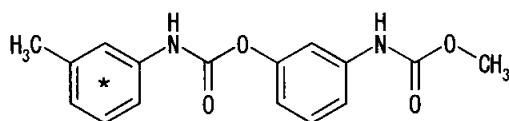
なお、本試験の実施にあたり、参考あるいは比較に供したフェンメディファムのでんさいにおける代謝試験には、デスメディファムと同様に両標識位置をそれぞれ標識した下記の2つの化合物を用いた:

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバマート

(1) ^{14}C -トリル標識フェンメディファム (T標識)

比放射能: $62.7 \mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度: $>98\%$

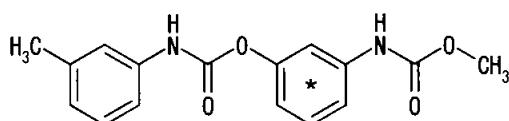


* ¹⁴C標識位置

(2) ¹⁴C-アミノフェノキシ標識フェンメディファム (AP標識)

比放射能 : 58.9 μ Ci/mg

放射化学的純度 : >98%



* ¹⁴C標識位置

予備試験として、上記の4化合物を用いて標識位置の差による代謝の挙動の差について検討した。すなわち、4つの標識化合物を葉面に処理し、5日後にメタノールの抽出を行い、代謝物のTLC分析、さらに一部の代謝物について加水分解を行い、加水分解生成物のTLC分析などを行った。標識位置の差による代謝パターンの差は認められず、またデスメディファムとフェンメディファムは同様な代謝パターンを示すことが認められた。これらの知見に基づき、以降の試験は主として 標識化合物のみを使用して実施した。

供試植物 : てんさい (Beta vulgaris L)

温室内で、水耕栽培で生育させた植物を用いた。

試験方法 :

処 理: AP標識したデスメディファムを4葉期のてんさいの苗に1株当たり有効成分で2.5 μ gを含む製剤を葉面に滴下処理した。

代謝物の同定を行うため、大量の処理試料を必要とする場合には、別にヒポコチル処理を行った植物の茎葉部を用いた。

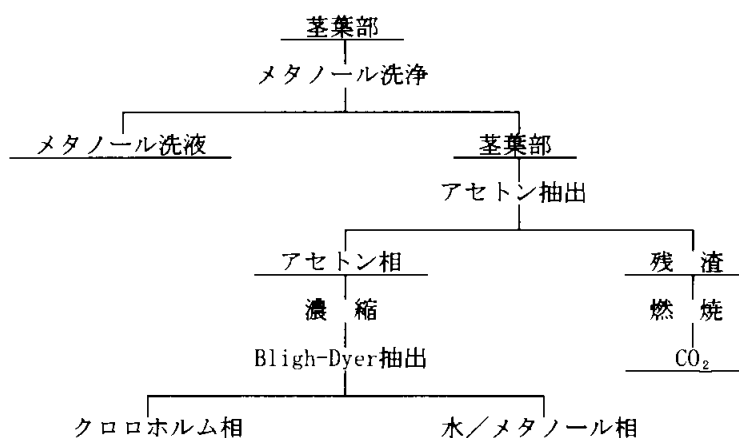
収 穫: 処理後4、7、15及び30日に植物を収穫した。植物を茎葉部と根部に分け、以降の抽出、代謝物の同定は茎葉部のみについて行った。フェンメディファムを用いた試験で、茎葉部に処理した検体は下表の通り経時的に根部へ移行しないことが確認されていることによる :

フェンメディファムの試験 ; (% : 処理放射能に対する百分率)

処理後 日 数	茎葉部			根部	合 計 (回収率)
	洗浄液	抽出可能	抽出残		
4	23.8	75.1	6.7	—	105.6
15	6.6	84.3	3.2	—	96.7
60	2.0	90.3	10.6	—	100.9

抽出／クリーンアップ：

(1) 収穫した茎葉部は、下記のフローシートに従って抽出し、経時的な放射能の各画分への分布を検討した。まず葉面に残っている放射能を測定するため、メタノール洗浄し、次いでアセトン抽出し、抽出残渣は乾燥し燃焼させて放射能を測定し、物質収支を求めた。アセトンは濃縮し、Bligh-Dyer抽出でクロロホルムと水／メタノールに分配した。



(2) 代謝物の同定を行うための抽出／クリーンアップは、対象とする代謝物の物性（極性、非極性）によって適切な抽出方法を選択した。

代謝物の同定：同定の対象とする代謝物の物性（極性、非極性）に応じ、種々の操作を組み合わせて同定を行った。

薄層クロマトグラフィー（TLC）：上記（抽出-1）の抽出で得たクロロホルム相は、溶剤系1を用いて第1の方向に、溶剤系2を用いて第二の方向に、また水相は溶剤系3を用いて両方向に展開した。

溶剤系1：クロロホルム／酢酸エチル 7：3
溶剤系2：クロロホルム／酢酸エチル／n-ブタノール 100：30：1.5
溶剤系3：n-プロパノール／クロロホルム／水 6：2：1
代謝物の標準品とのコクロマトグラフィー、フェンメディファムの代謝パターンとの類似性の確認に使用した。

加水分解：極性代謝物は、下記の加水分解に供した。

- (1) 酸による加水分解：6N塩酸を用い、95℃で2時間；窒素気流中
- (2) 酵素による加水分解（フェンメディファムの代謝物についてのみ実施）
 β -グルコシダーゼ：酢酸緩衝液中、4時間、38℃

誘導体化／ガスクロマトグラフィー：代謝物のTBDMS-誘導体を、t-ブチルジメチルクロロシラン／イミダゾール／ジメチルホルムアミド試薬を用いて誘導体化し、この反応物をガスクロマトグラフィーにかけ、該当するピークを分離した。

ガスクロマトグラフィー／質量分析：誘導体化した代謝物と標準品の誘導体

化したものをガスクロマトグラフィー／質量分析にかけ、そのスペクトラムの比較を行った。

その他：フェンメディファムの極性代謝物については、赤外分光分析、フーリエ変換分光法、フィールド・デソープション質量分析の手法を用いて同定した。

試験結果：

1. 代謝のパターン

経時的に抽出を行い、各画分を薄層クロマトグラフィーにかけた。

a) メタノール洗浄液

処理30日後に、2つの微量の未同定のスポットが認められた以外は、大部分は親化合物であり、また微量のN-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート (EHPC) が検出された。

b) クロロホルム相

ここでも大部分は親化合物であり、処理30日後の抽出液には微量のEHPCと未同定の3つのスポットが認められた。

c) 水／メタノール

この抽出液から得られた薄層クロマトグラムの代謝物のスポットと、同様に処理したフェンメディファムの代謝物のスポットは類似したものであった。(処理7日後、溶剤系：n-プロパノール／クロロホルム／水 6：2：1) 二次元のクロマトグラフィーで、デスメディファムの代謝パターンがフェンメディファムに極めて類似していることが確認された。

2. 経時的な放射能の各画分への分布

処理後、経時的に試料(茎葉部)を採取し、処理放射能の各画分への分布を検討した。

(%：処理放射能に対する百分率)

収穫日	メタノール洗液	クロロホルム相 (有機相)	水／メタノール相 (水相)	燃焼部	各画分の 百分率の合計
4	9.2	57.3	19.4	12.1	98.0
7	5.5	43.8	27.6	15.8	92.7
15	1.7	25.9	43.2	17.3	88.1
30	5.2	16.4	42.2	22.1	85.9

有機相は植物体に吸収されたが概して未代謝の放射能を示し、水相は代謝された抽出可能な極性代謝物を示し、燃焼部は抽出残渣を示す。

表から、葉面の遊離のデスメディファムは、経時的に多くが植物体内に取り込まれるため徐々に減少した。一方、体内に取り込まれたデスメディファムは代謝され、水相中の放射能が増加し、また抽出残渣は増加した。さらに、各画分をクリーンアップし、放射能の分布について検討した。

画分	収穫日	回収率 (1) [%]	画分中の放射能の相対分布 ⁽²⁾													画分中に検出された放射能の相対分布の合計 [%]
			DMP*及びその抱合物			EHPC**及びその抱合物			未知物質							
			DMP* (3) [%]	U3 [%]	U6 [%]	EHPC (3) [%]	U2 [%]	U5 [%]	M1 [%]	M2 [%]	M3 [%]	M4 [%]	U1 [%]	U4 [%]	原点 滞留物 [%]	
メタノール 洗浄液	4	9.2	94.4	—	—	1.7	—	—	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	3.8	99.9
	7	5.5	94.6	—	—	3.1	—	—	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	2.3	100
	15	1.7	94.6	—	—	n. d.	—	—	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	5.4	100
	30	5.2	4.0	—	—	5.5	—	—	38.8	3.1	n. d.	n. d.	—	—	48.7	100.1
	Relative Rf-Values (4)		1/1	—	—	0.64 / 0.53	—	—	0.53 / 0.41	0.77 / 0.64	0.45 / 0.42	0.9 / 0.88	—	—	0/0	
クロロホルム 相	4	57.3	91	—	—	n. d.	—	—	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	9.0	100
	7	43.8	90.4	—	—	n. d.	—	—	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	9.6	100
	15	25.9	83.3	—	—	n. d.	—	—	n. d.	n. d.	1.3	n. d.	—	—	15.4	100
	30	16.4	66.4	—	—	5.1	—	—	2.1	n. d.	1.1	3.4	—	—	21.9	100
	Relative Rf-Values (4)		1/1	—	—	0.64 / 0.53	—	—	0.53 / 0.41	0.77 / 0.64	0.45 / 0.42	0.9 / 0.88	—	—	0/0	
水/ メタノール 相	4	19.4	16.6	n. d.	2.8	n. d.	59.3	12.9	—	—	—	—	8.4	n. d.	n. d.	100
	7	27.6	13.7	5.8	2.3	n. d.	54.8	14.5	—	—	—	—	4.8	4.1	n. d.	100
	15	43.2	7.8	18.8	2.9	n. d.	56.6	9.7	—	—	—	—	4.2	—	n. d.	100
	30	42.2	3.9	18.1	8.3	5.2	37.6	5.2	—	—	—	—	6.2	—	7.6	92.1
	Relative Rf-Values		1.00	0.48	0.85	0.96	0.30	0.77	—	—	—	—	0.19	0.54	0	
該当代謝物コード*			A	N	M	B	L	K	—	—	—	—	—	—	—	

- (1) 経時的抽出データより
 (2) 画分中に検出された放射エネルギーに対し
 (3) 標準品とクロマトグラフィーで確認
 (4) 分子：溶剤系1、分母：溶剤系2
- *：デスメディファム
 **：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート

メタノール洗液中の放射能の大部分は未変化のデスメディファムであり、それ以外に微量のN-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート (EHPC) が認められた。

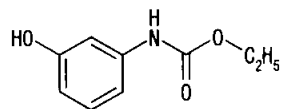
クロロホルム相中の放射能の大部分は未変化の親化合物であったが、経時的に原点の放射エネルギーが増加した。

水/メタノール相中のデスメディファムの量は比較的少なく放射能のほとんどは原点近くに分布していた。

3. 代謝物の同定

(1) 主として有機相から未変化のデスメディファムと主要代謝物のN-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート (EHPC) (代謝物B) が検出された。デスメディファムとEHPCは標品とのクロマトグラフィー及びEHPCはデスメディファム溶液の酸加水分解物の薄層クロマトグラフィー上の類似性で追認した。

主要代謝物 (EHPC) : N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート



植物体内から回収されたデスメディファムとEHPCの検出量を下表に示す (括弧内はメタノール洗浄液中の量)。

(% : 処理放射能量に対する百分率)

収穫日	デスメディファム	EHPC
4	64.0 (9.1)	0.16
7	48.6 (5.2)	0.17
15	26.1 (1.6)	—
30	12.8 (—)	3.32

(2) 極性代謝物

薄層クロマトグラフィー上の相対Rf値の相対的類似性から、デスメディファムの極性代謝物（抱合体）の構造はフェンメディファムの極性代謝物の構造から類推した。

フェンメディファム	化合物	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	相対Rf値	0.19	0.36	0.45	0.55	0.73	0.84	0.96	1.00
同定された化学構造	—	IA	—	2	3	4	MHPC ¹	PMP ²	
デスメディファム	化合物	U1	U2	U3	U4	U5	U6	EHPC ³	DMP ⁴
	相対Rf値	0.19	0.30	0.48	0.54	0.77	0.85	0.96	1.00
	推定される化学構造		L	N		K	M	B	A

¹ : メチル-N-(3-ヒドロキシフェニル)カルバマート ² : フェンメディファム

³ : 代謝物B

⁴ : デスメディファム

すなわち、デスメディファムの場合もフェンメディファムの極性代謝物（抱合体）と同様に、デスメディファム及びEHPCのそれぞれ糖抱合体、糖サルフェートが生成されるものと推定した。なお、代謝は糖抱合体を経て、最終的に糖サルフェートの生成に至るものと考えられる。

以下に、極性代謝物の経時的生成量を示す。

収穫日	デスメディファム		EHPC	
	糖抱合体	糖サルフェート	糖抱合体	糖サルフェート
4	0.54	—	2.50	11.50
7	0.63	1.60	4.00	15.12
15	1.25	8.12	4.19	24.45
30	3.50	7.64	2.19	15.87

デスメディファムの極性代謝物の推定構造と推定の根拠とした対応するフェンメディファムの極性代謝物の構造を併記する。なお、推定する代謝経路を図1に示した。

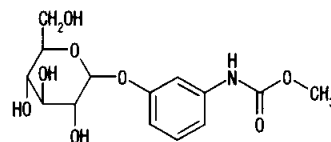
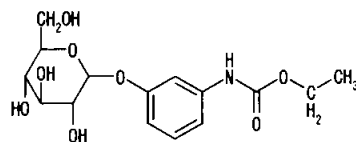
デスメディファムの
極性代謝物の推定構造

推定の根拠とした
フェンメディファムの極性代謝物の構造

代謝物K エチル-3-(β-D-グルコピラニルオキシ)-
フェニルカルバマート

代謝物3 メチル-3-(β-D-グルコピラニルオキシ)-
フェニルカルバマート

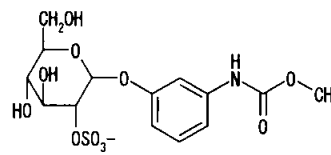
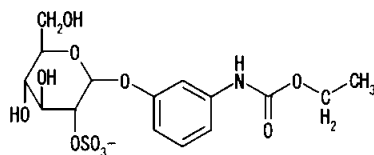
EHPCの
糖抱合体



代謝物L 1-[N-(3-エトキシカルボニルアミノフェノキシ)-
β-D-グルコピラノス-2-イル硫酸

代謝物1A* 1-[N-(3-メトキシカルボニルアミノフェノキシ)-
β-D-グルコピラノス-2-イル硫酸

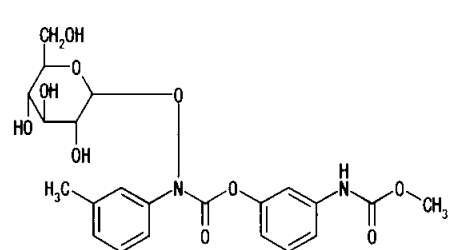
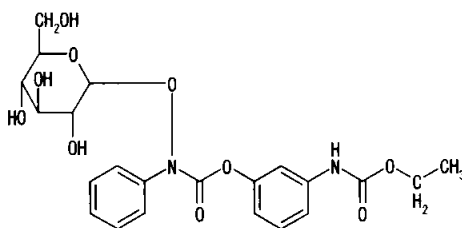
EHPCの
糖サルフェート



代謝物M 3-エトキシカルボニルアミノフェニル-N-(β-D-
グルコピラニルオキシ)-フェニルカルバマート

代謝物4 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(β-D-
グルコピラニルオキシ)-3-メチルフェニルカルバマート

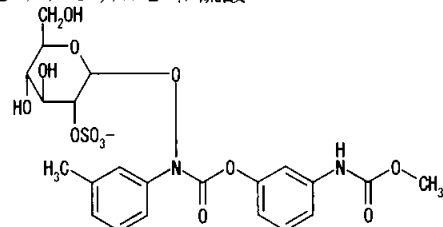
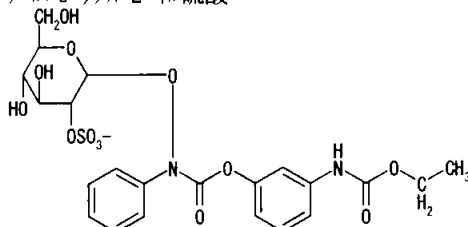
DMPの
糖抱合体



代謝物N 1-[N-(3-エトキシカルボニルアミノフェノキシ)-
カルボニル]-フェニルアミノキシ]-β-D-
グルコピラノス-2-イル硫酸

代謝物2* 1-[N-(3-メトキシカルボニルアミノフェノキシ)-
カルボニル)-3-メチルフェニルアミノキシ]-β-
D-グルコピラノス-2-イル硫酸

DMPの
糖サルフェート

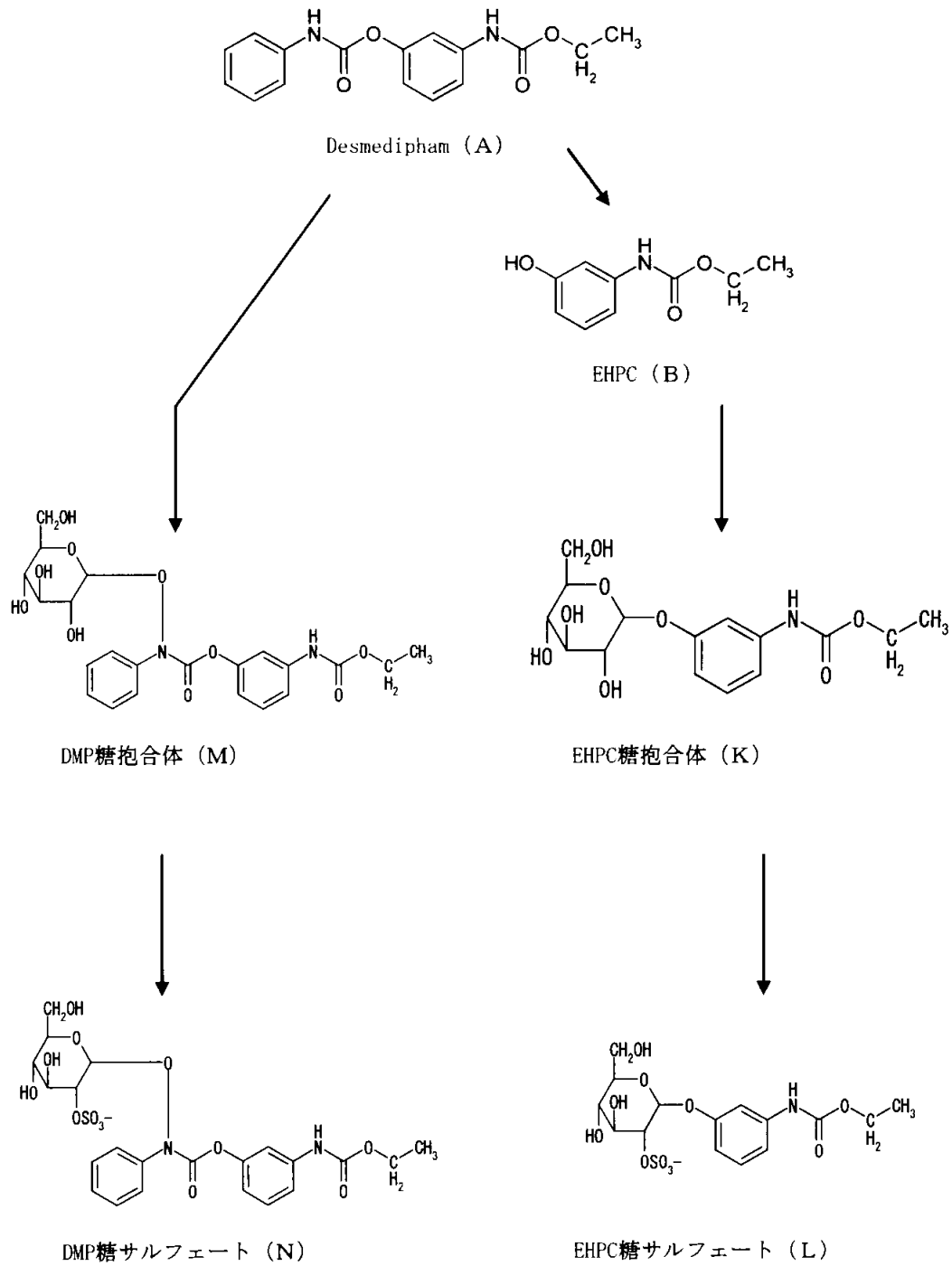


*: フェンメディファムの代謝物1A及び代謝物2は報告書中ではNa塩として同定されている。植物体中では

上記の結果から、デスメディファムのでんさいにおける代謝は次のように要約される。

1. 茎葉に処理されたデスメディファムは、可食部の根部へは移行しない。
2. 地上部（茎葉部）におけるデスメディファムの代謝は、主として未変化の親化合物の糖抱合体の生成であり、また少量ながらN-(3-ヒドロキシフェニル)カルバマート (EHPC)（代謝物B）への代謝及び生成されたEHPCの糖抱合体の生成である。
3. デスメディファムの極性代謝物（抱合体）の構造は、対応するフェンメディファムの極性代謝物（抱合体）から推定した。デスメディファムとフェンメディファムの化学構造の類似性、すなわちトリル基の代わりにフェニル基、側鎖のエチル基の代わりにメチル基などの差は、特定の生物系の代謝（ここでは、でんさい）において主要な変化を与えないものと考えられる。

図1. てんさいにおけるデスメディファムの代謝経路



2. 植物体内運命に関する試験

(2) ^{14}C -標識デスメディファムのでんさいにおける代謝試験及びその詳細調査

(資料No. 運命6-1及び6-2)

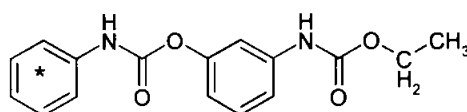
試験機関：

報告書作成年：1995年

供試標識化合物：

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

- (1) ^{14}C -フェニル環標識デスメディファム (P標識, 申請者註：原報ではB標識と記載)

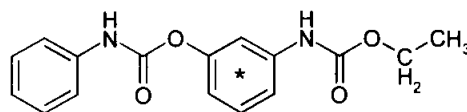


* ^{14}C 標識位置

比放射能：221.43 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：>97%

- (2) ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識, 申請者註：原報ではA標識と記載)



* ^{14}C 標識位置

比放射能：220.20 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：>97%

供試植物：てんさい (Beta vulgaris cv "Gala")

試験方法：

処 理： ^{14}C -標識デスメディファム製剤 (製剤の比放射能：24.98 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) を、てんさいの本葉が2枚完全に開いた時点で葉面に噴霧した。処理量は最大圃場処理率 (1kg原体/ha：以下、1倍量処理とする) 及び最大圃場処理率の5倍 (5kg原体/ha：以下、5倍量処理とする) となるよう設定した。また無処理の対照のほかに、生成した $^{14}\text{CO}_2$ の吸収 (再固定) を確認するため、同化対照を設けた。なお、5倍量処理では、初期の生育阻害が認められた。

収 穫：処理後0、7、28日及び成熟期 (処理後120日) に植物を収穫した。植物を茎葉部と根部に分割した。なお、5倍量処理及び同化対照の処理後0日は、採取しなかった。

各組織の放射能分布／洗浄液及び組織中の放射性成分の確認：

(1) 各組織の放射能分布

収穫した茎葉部及び根部組織は、次の方法で組織中放射能を測定した。

茎葉部：組織表面に残った放射能を測定するために、クロロホルム洗浄を行った。洗浄後の組織を裁断し、主サンプル及び副サンプルに分割した。茎葉部中に存在する放射能を測定するため、副サンプルを燃焼させ、生成した $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。また、クロロホルム洗浄液を液体シンチレーションカウンターにかけ、茎葉部組織表面の放射能を測定した。

根部：組織表面に残った放射能を測定するために、蒸留水で洗浄した。その後の手順については、茎葉部で記載されているとおり行った。

(2) 洗浄液及び組織中の放射性成分の確認

茎葉部表面洗浄液（クロロホルム）を高速液体クロマトグラフィーにかけ、放射性成分の確認を行った。

組織中の放射性成分の確認は次のとおり行った。

組織中の放射能濃度が低かった1倍量処理した根部組織を除き、主サンプルをクロロホルム/メタノール/塩酸（容量比 49.5:49.5:1）混液で2回抽出した。抽出液を遠心分離し、上澄液と残渣に分割した。得られた抽出上澄液を薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにかけた。なお、一部の抽出上澄液（1倍量処理：成熟期の茎葉部及び処理後28日の根部、5倍量処理：成熟期の茎葉部及び成熟期の根部）は二相に分離したため、水相及び有機相に分割し、クロマトグラフィーにかけた。

精製：それぞれの物性に合わせた適切な方法を用いて行った。

薄層クロマトグラフィー（TLC）：用いた溶媒系は次のとおりである。

溶媒系1：ジクロロメタン／メタノール（99：1）

溶媒系2：クロロホルム／ジエチルエーテル（7：3）

標準品：

非標識デスメディファム、エチル＝ヒドロキシフェニルカルバマート（EHPC）、2-アセトアミドフェノール、3-アセトアミドフェノール、4-アセトアミドフェノール、2-アミノフ

ェノール, 3-アミノフェノール, アニリン, アセトアニリ
ド及び4-ヒドロキシアニリン

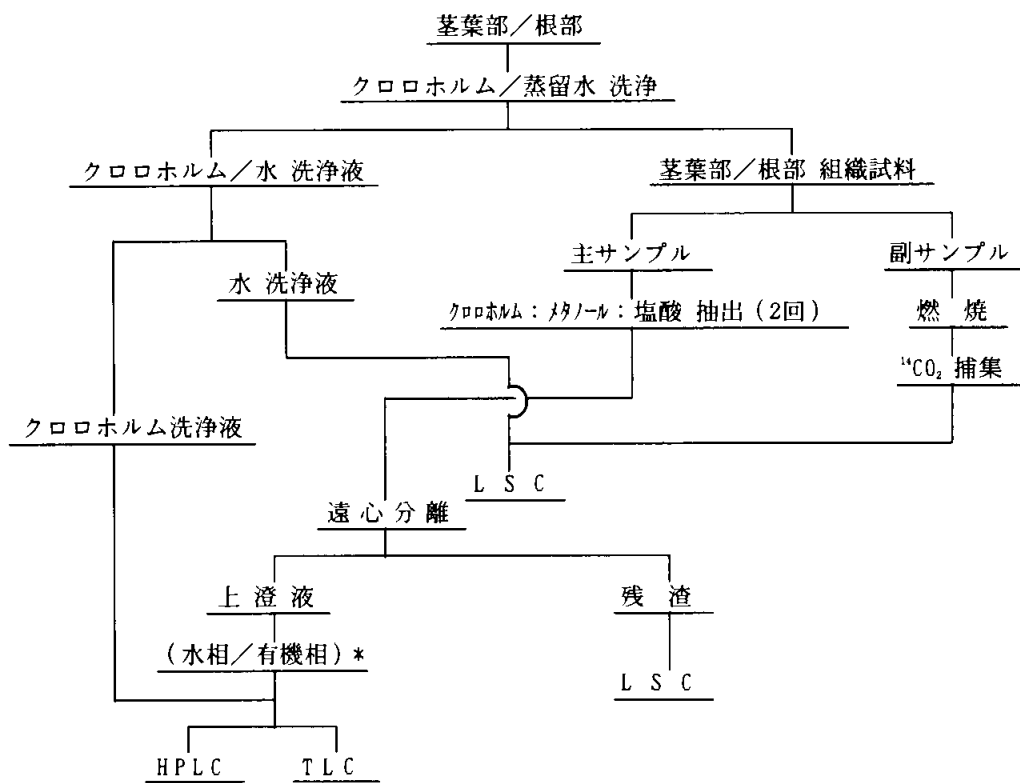
以上の標準品とともに上記溶媒系を用いて展開した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) : TLCで用いた各標準品ととも
に分析した。移動層は次の相を組み合わせた。

移動層A : 酢酸アンモニウム / アセトニトリル (9 : 1)

移動層B : 酢酸アンモニウム / アセトニトリル (2 : 8)

次に試験手順を経路図で示す。



註]

LSC : 液体シンチレーションカウンター

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

TLC : 薄層クロマトグラフィー

* : 1倍量処理では成熟期の茎葉部及び処理後28日の根部の上澄液が分離
5倍量処理では成熟期の茎葉部及び成熟期の根部の上澄液が分離

(3) 代謝物の構造解析

1倍量処理した処理後7日目の茎葉部組織中の主要代謝物について、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) を行った。

液体クロマトグラフィー：次の条件を用いた。

移動相A：酢酸アンモニウム／アセトニトリル (90：10)

移動相B：酢酸アンモニウム／アセトニトリル (20：80)

勾配条件：	時間	移動相A (%)	移動相B (%)
	0	100	0
	5	100	0
	30	0	100
	35	100	0
	40	100	0

質量分析：次の条件を用いた。

イオン化モード：APCI+及びESI+

走査温度： m/z 50-1000、走査時間1.9秒及び走査間時間0.1秒

源温度：120°C (APCI+) 及び160°C (ESI+)

プローブ温度 (APCI+)：400°C

(4) 未抽出放射性成分の加水分解

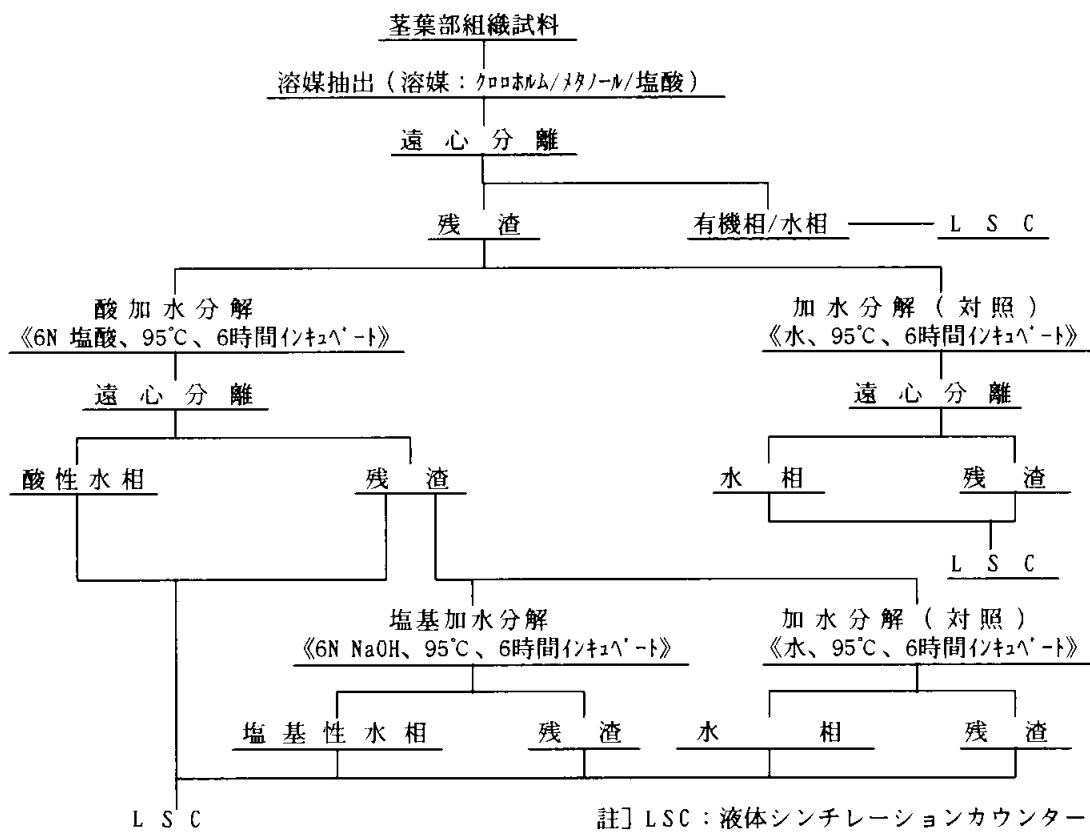
(2) において得られた1倍量処理した成熟期茎葉部の不溶性残渣から、更なる放射性成分の抽出をはかるため、次の酸加水分解試験を行った。

溶媒抽出後の残渣を6N 塩酸中に懸濁し、約95°Cで6時間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離し、酸性水相と残渣に分割し、放射能を測定した。対照として塩酸の代わりに水を用いて以下同様に分析した。

その後、酸加水分解後の一部の残渣を6N 水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液中で懸濁し、約95°Cで6時間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離し、塩基性水相と残渣に分割し、放射能を測定した。対照として水酸化ナトリウム溶液の代わりに水を用いて以下同様に分析した。

塩基性水相からの塩基性放射性成分の分離を固相抽出及び溶媒分割処理を用いて検討したが、極低濃度の放射能しか検出しかされなかったため、試験の続行はしなかった。

以下に加水分解手順を示す。



結 果：

(1) 各組織の放射能分布

各組織への放射能分布は次のとおりであった。

(単位： $\mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量, デスメディファム換算)

処 理 量	組 織	分析部位	収 穫 日			
			処理後0日	処理後7日	処理後28日	成 熟 期
1 倍量処理	茎葉部	洗浄液	208.208	65.496	0.941	0.004
		洗浄後組織	10.235	37.716	5.736	0.157
		合 計	218.442	103.212	6.677	0.161
	根部	洗浄液	0.560	0.069	0.055	0.001
		洗浄後組織	0.262	0.474	0.026	0.010
		合 計	0.822	0.543	0.081	0.011
5 倍量処理	茎葉部	洗浄液	未採取	628.834	3.771	0.008
		洗浄後組織	未採取	217.183	11.397	0.257
		合 計	—	846.017	15.168	0.265
	根部	洗浄液	未採取	2.675	0.657	0.009
		洗浄後組織	未採取	29.525	0.958	0.125
		合 計	—	32.200	1.616	0.134
対 照	茎葉部	洗浄液	0.008	0.001	0.000	0.000
		洗浄後組織	0.001	0.003	0.001	0.001
		合 計	0.009	0.004	0.001	0.001
	根部	洗浄液	0.003	0.000	0.002	0.000
		洗浄後組織	0.002	0.001	0.002	0.001
		合 計	0.005	0.001	0.004	0.001
同化対照	茎葉部	洗浄液	未採取	0.001	0.000	0.000
		洗浄後組織	未採取	0.002	0.003	0.003
		合 計	—	0.003	0.003	0.003
	根部	洗浄液	未採取	0.000	0.000	0.000
		洗浄後組織	未採取	0.001	0.006	0.001
		合 計	—	0.001	0.006	0.001

1倍量処理：茎葉部において、放射能は処理後0日の $218.442 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量から成熟期の $0.161 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量に減少した。また根部においては、処理後0日の $0.822 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量から成熟期の $0.011 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量に減少した。成熟期の根部において、洗浄により除去された割合は放射能の約10%であった。

5倍量処理：茎葉部において、放射能は処理後7日の $846.017 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量から成熟期の $0.265 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量に減少した。また根部においては、処理後7日の $32.200 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量から成熟期の $0.134 \mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量に減少した。

対照及び同化対照：

対照では、試験を通じて放射能濃度が極めて低かった。また同化対照でも放射能濃度が極めて低く、このことから生成した $^{14}\text{CO}_2$ の再固定がほとんどな

いことが確認された。

次に茎葉部及び根部組織中における放射能の存在比率（％）を示す。

処 理 量	組 織	収 穫 日			
		処理後0日	処理後7日	処理後28日	成 熟 期
1 倍量処理	茎葉部	99.88	99.96	99.67	79.41
	根 部	0.12	0.04	0.33	20.59
5 倍量処理	茎葉部	測定せず	99.13	98.43	34.51
	根 部	測定せず	0.87	1.57	65.49

申請者が原報より作成した。

処理後28日までは、茎葉部中での存在比率が根部より極めて高かった。成熟期においても1倍量処理の根部では約80%が茎葉部に存在した。しかしながら、根部の存在比率が上昇したことから放射性物質が若干、茎葉部から根部へ移行したか、もしくは根部が何らかの放射性を吸収したことが示唆された。5倍量処理の成熟期の根部では、根部中での存在比率が茎葉部中のそれを上回っていた。

(2)及び(3) 組織中の放射性成分の確認／代謝物の構造解析

薄層クロマトグラフィー(TLC)／高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析
各採取時点におけるTLC及びHPLCにおいて、供試した各標準品と同じパターンを示した成分はなかった。

次に、1倍量及び5倍量処理されたてんさいの各組織における検出された放射性成分及びその比率を次に示す。

1 倍量処理

採 取 日	総放射能残留に対する比率（％）													
	表 面 洗 浄 液**	デスメ ディフ アム	未 同 定 化 合 物								其 他 ***	不 溶 性 残 渣	合 計	
			A	B	C	D	E	F	G	H				
茎 葉 部	処理後0日	95.3	5.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8	101.2
	処理後7日	63.5	19.2	0.8	1.1	4.9	4.3	1.8	—	—	—	—	7.6	103.2
	処理後28日	14.1	29.1	—	4.7	12.0	—	—	2.9	4.4	3.8	—	22.5	93.6
	成 熟 期	2.1	38.3	—	3.3	15.5	—	—	—	—	—	—	38.5	97.7
	濃度(ppm)*	0.065		—	0.005	0.025	—	—	—	—	—	—	0.062	0.157
根 部	処理後0日	—	20.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	94.1	114.5
	処理後7日	—	4.8	—	28.4	—	—	—	—	—	—	—	57.7	90.9
	処理後28日	—	4.6	—	—	—	—	—	—	—	—	4.6	101.5	110.4
	成 熟 期	放射能が不十分であった為、クロマトグラフィー分析せず											—	
	濃度(ppm)*	0.001	0.010										0.011	
HPLCにおける Rt		28.5	16.1	18.2	18.9	21.1	23.8	3.0	3.7	14.0				

* : デスメディファム換算

Rt : 保持時間 (分)

** : 放射性成分はデスメディファムのみ。*** : 抽出上澄液の水相部分から検出

茎葉部

表面洗浄液中の放射性成分はデスメディファムのみであった。
 茎葉部からはデスメディファムの他8種類（未同定化合物A～H）の未同定化合物が検出された。これら未同定化合物は、時間の経過とともに極性の高まる傾向にあったことが、高速液体クロマトグラム上の相対位置より示された。処理後7日及び28日で認められた未同定化合物Cを除き、総放射能残留の5%を越える未同定化合物はなかった。

根 部

処理後7日において、総放射能残留に対してデスメディファムが4.8%、未同定化合物Bが28.4%を占めていた。
 処理後28日において、総放射能残留に対してデスメディファムと判明したのは4.6%であり、残りは水相画分における極性物質及び不溶性残渣であった。
 成熟期においては、試料の放射能濃度が低かったため、放射性成分の性質の調査は行わなかった。

5 倍量処理

採取日	総放射能残留に対する比率 (%)																不溶性残渣	合計
	表面洗浄液**	デスメディファム	未同定化合物												不溶性残渣			
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		M		
茎葉部	処理後7日	74.3	17.8	0.2	0.9	1.0	0.3	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	6.8	101.6
	処理後28日	24.9	64.7	-	1.7	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.8	104.4
	成熟期	3.0	10.6	-	-	1.5	-	-	8.8	-	3.7	5.6	6.9	2.7	-	-	70.2	113.0
	濃度 (ppm)*	0.036		-	-	0.004	-	-	0.023	-	0.010	0.015	0.018	0.007	-	-	0.186	0.239
根部	処理後7日	-	4.0	-	-	1.5	-	3.2	-	1.0	-	-	-	-	3.0	-	71.8	84.5
	処理後28日	-	3.9	-	-	0.5	-	-	-	3.6	-	-	-	-	0.3	-	101.5	110.4
	成熟期	-	-	-	-	-	-	-	-	18.4	-	-	-	-	-	5.5	87.9	110.9
	HPLCにおける Rt		28.5	16.1	18.2	18.9	21.1	23.8	3.0	3.7	14.0	4.7	8.0	15.7	19.6	34.7		

* : デスメディファム換算

Rt : 保持時間 (分)

** : 放射性成分はデスメディファムのみ

茎葉部

試験を通じて、1倍量処理の結果と同様の分布パターンを示した。
 処理後7日において、デスメディファム及び1倍量処理でも認められた未同定化合物 (A～E) が検出された。総放射性残留に占めるデスメディファムの割合は1倍量処理よりも高かった。また、総放射性残留に占める各未同定化合物の割合は1倍量処理のものより低かった。
 処理後28日において、デスメディファム及び未同定化合物B及びCが認められた。総放射性残留に占めるデスメディファムの割合は1倍量処理よりも高かった。

成熟期において、デスメディファム及び未同定化合物(C, F, H, I, J及びK)が認められた。デスメディファムの総放射能残留に占める割合は、1倍量処理よりも低かった。1倍量処理で認められた未同定化合物Bは認められず、未同定化合物I, J及びKは5倍量処理で初めて認められた。

これらの結果は、5倍量処理時に起きた植物の生育遅延のために代謝発現が遅れたためと考えられた。しかしながら、代謝が開始されると1倍量処理よりも亢進したものと考えられた。

根 部

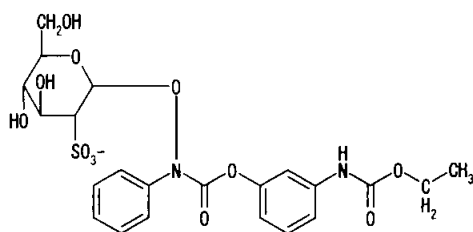
処理後7日において、デスメディファムの他4種類の未同定化合物(C, E, G及びL)が認められた。

処理後28日において、デスメディファムの他3種類の未同定化合物(C, G及びL)が認められた。

成熟期においては、未同定化合物Mの他、極性の高い未同定化合物Gが認められた。未同定化合物Mは溶媒系により生成したものであり、実際にはデスメディファムであった。

(3) 代謝物の構造解析

未同定化合物Cは、質量分析のESI+及びAPCI+モードの結果から、デスメディファムの硫酸化N-糖抱合体【代謝物コードN】と同定された。



未同定代謝物Aは、質量分析のESI+及びAPCI+モードの結果から、エチル=ヒドロキシフェニルカルバマート (EHPC) の糖抱合体【代謝物コードK】と推定された。

未同定代謝物Bは、質量分析のAPCI+モードの結果から、デスメディファムの抱合体と推定された。ESI+モードの結果から、分子量が581もしくは564のいずれかであると推定された。

未同定代謝物Eは、APCI+モードの結果から、エチル=ヒドロキシフ

ェニルカルバマート (EHPC) 抱合体と推定した。ESI+モードの結果からは同定について、これ以上の情報は得られなかった。

未同定化合物Dについては、質量分析による構造決定ができなかった。

(4) 未抽出放射性成分の加水分解

酸加水分解及び塩基加水分解処理における放射能回収率 (%) を次に示す。

a) 溶媒抽出

処理方法	初期試料		有機相		残 渣		合 計	
	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%
溶 媒 抽 出	1,569,551	100.0	840,250	53.5	981,558	62.5	1,821,808	116.1

b) 酸加水分解処理

処理方法	初期試料		酸性水相		残 渣		合 計	
	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%
6N HCl, 6時間, 95°C	319,942	100.0	83,100	26.0	191,071	59.7	274,171	85.7
対照(水)6時間, 95°C	39,701	100.0	13,500	34.0	17,314	43.6	30,814	77.6

6N 塩酸による酸加水分解処理により、試料中及び対照試料中放射能の各々26.0%及び 34.0%の放射能が抽出された。酸性条件下で放射能抽出率が低下したことは、試料の大きさに関連するものと考えられた。

b) 塩基加水分解処理

処理方法	初期試料		塩基性水相		残 渣		合 計	
	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%
6N NaOH, 6時間, 95°C	61,352	100.0	48,400	78.9	18,750	30.6	67,150	109.5
対照(水)6時間, 95°C	18,631	100.0	2,000	10.7	16,570	88.9	18,570	99.7

6N 水酸化ナトリウムによる塩基加水分解処理により、試料中及び対照試料中放射能の各々78.9%及び10.7%が放出された。対照試料からの放出率が低かったことから、加熱処理だけでは放出されないことが明らかになった。従って、塩基性水相に放出された放

射性成分は熱反応性かつ塩基反応性成分と考えられた。

次に各加水分解処理を通じた放射能回収率を示す。

初期試料		有機相		酸性水相		塩基性水相		残渣		合計	
d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%	d.p.m.	%
1,569,551	100.0	840,250	53.5	254,963	16.2	462,562	29.5	179,195	11.4	1,736,970	110.7

1倍量及び5倍量処理の結果から、デスメディファムのでんさいにおける代謝を次のように要約する。

- ・ デスメディファムの代謝経路は、一連の極性の高い代謝物が生成され、最終的に植物内組織との不溶性共役（結合）残渣となる。
- ・ 各時点で根部に認められるデスメディファムの相対的低残留及び高濃度の不溶性残渣から、代謝の発現が茎葉部で生じ、生成物が根部に移行し、そこで最終的に不溶性共役（結合）残渣となることを示唆している。
- ・ 薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー分析において、供試したアニリン、アミノフェノール及びアセトアミドフェノール等の分析用標準品と同一のクロマトグラムを示した未同定化合物はなかった。
- ・ 1倍量処理した成熟期の根部において認められた総放射能残留は0.011 ppmであるが、その約10%は表面洗浄により除去された。
- ・ 1倍量処理した成熟期の茎葉部において、総放射能残留に対して、デスメディファムが40.4% (0.065 $\mu\text{g}/\text{g}$)、デスメディファム硫酸化糖抱合体【代謝物コードN】が15.5% (0.025 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、デスメディファム換算)、熱反応性極性成分が10.9% (0.018 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、デスメディファム換算)、塩基反応性極性成分が19.9% (0.032 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、デスメディファム換算)を占めた。

・1倍量処理した成熟期の茎葉部及び根部における放射能分布を次に示す。

		1 倍 量 処 理 : 成 熟 期										
		表 面 洗 浄 液 *	デ ス メ デ ィ フ ァ ム	デ ス メ デ ィ フ ァ ム 抱 合 体	デ ス メ デ ィ フ ァ ム 硫 酸 化 糖 抱 合 体	E H P C 糖 抱 合 体	E H P C 抱 合 体	残 渣			合 計	
代謝物コード		A			N	K		熱反 応極 性成 分	塩基反 応極 性成 分	最 終 残 渣		
茎 葉 部	総放射能残留に対する%	2.1	38.3	3.3	15.5	—	—	10.9	19.9	7.7	97.7	
								合計 : 38.5				
根 部	組織内濃度 (ppm) **	0.065		0.005	0.025	—	—	0.018	0.032	0.012	0.157	
								合計 : 0.062				
根 部	総放射能残留に対する%	放射能が不十分であった為、クロマトグラフィー分析せず										—
	組織内濃度 (ppm) **	0.001	0.010									

* : 放射性成分はデスメディファムのみ、 ** : デスメディファム換算値

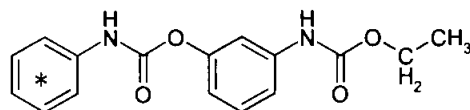
(3) フェニル環-¹⁴C 標識デスメディファムを用いたてんさいにおける代謝

(資料 No. 運命-15)

試験機関：

報告書作成年：2014 年 (GLP)

供試標識化合物： フェニル環-¹⁴C 標識デスメディファム



*：¹⁴C 標識位置

化学名：エチル 3'-フェニルカルバモイルオキシカルバニレート

比放射能量： 3.91MBq/mg (105.74 μCi/mg)

放射化学的純度：>99% (HPLC)

【方法】

温室内で栽培した 6~8 葉期のてんさい (品種：Kristallina) に対して、フェニル環-¹⁴C 標識フェンメディファム乳剤を水で希釈し、518g a. s./ha で 1 回散布処理した。

処理 15 日後に生育期試料として茎葉部を採取し、処理 63 日後に収穫期試料として茎葉部及び根部を採取した。採取した試料は 2 種の異なる抽出法 (①溶媒抽出、②工業的製糖法による抽出・精製) を用いて抽出した。溶媒抽出では、採取した試料をギ酸を添加して酸性としたアセトニトリル/水 (8/2) を用いて 3 回磨砕抽出し、HPLC-放射能検出器による定量及び HPLC-MS/MS による代謝物の同定を行い、また、アセチル化後にジクロロメタンと分配し特性化を行った。抽出残渣はセルラーゼ処理後に酢酸エチルと分配し、水層は濃縮して HPLC による分析を行った。

工業的な製糖方法に従った抽出・精製・製糖では、70℃の熱水で抽出し、石灰水処理、カーボネーション (二酸化炭素の添加)、加熱し、砂糖を沈殿させ、各画分の代謝物、放射能量を求め、通常抽出との比較を行った。更に抽出残渣はセルラーゼ処理、2N 塩酸/ジオキサソール処理後に酢酸エチルと分配し、残留物の特性化を行った。

【結果】

採取した試料の総残留量は、処理 15 日後の茎葉で約 10 mg/kg、63 日後の収穫期の茎葉で約 1.5 mg/kg、根部で約 0.12 mg/kg であった (表 1)。

表 1 てんさい試料中の総残留放射能量-フェニル環標識

試料	処理後日数	総残留量 (TRR) (mg/kg)
てんさい茎葉、生育期試料	15 日	10.066
てんさい茎葉、収穫期試料	63 日	1.497
てんさい根部、収穫期試料	63 日	0.115

溶媒抽出による抽出率は、生育期の茎葉で約 84%、収穫期の茎葉で約 72%、収穫期の根部で約 29%であった。抽出残渣はセルラーゼ処理を行ったが、放射能は主に抽出残渣に存在し、生育期の茎葉で 11.4% (1.145 mg/kg)、収穫期の茎葉で 19.7% (0.295 mg/kg)、収穫期の根部で 47.5% (0.055 mg/kg) であった (表 2)。

親化合物デスメディファムは生育期の茎葉で主要な残留物 32.4% (3.261 mg/kg) であった。収穫期の茎葉及び根部では少量 (両試料とも 1.4%) が認められた。

デスメディファム-グリコシドサルフェート [Q] が主要な代謝物として認められ、生育期茎葉で 39.4% (3.970 mg/kg)、収穫期茎葉で 52.5% (0.786 mg/kg)、収穫期根部で 7.5% (0.009 mg/kg) であった。少量代謝物としてデスメディファム-マロニル-グリコシド [P] が認められ、生育期の茎葉で 9.2%、収穫期の茎葉で 3.9%、収穫期の根部で 2.0% 認められた (表 3)。

通常抽出の極性代謝物はアセチル化後の分配特性から極性化合物として特性化した。この画分はアセチル化した糖と挙動が類似しており、生体成分への取り込みの可能性が示唆された。その他の未同定代謝物は最大でも TRR の 5.8% 以下であった。抽出物中にアニリン [O] は存在しないことが確認された (表 3)。

根部の残留物を更に特性化するため実施した工業的製糖法による抽出では、TRR の 34.4% が粗抽出液中に認められ、通常抽出による放射能量と類似していた。粗抽出液から結晶化した砂糖には TRR の 16.5% (0.016 mg/kg) が含まれており、この値は通常抽出の極性放射能量と類似しており、デスメディファムは二酸化炭素にまで分解し、生体成分へ同化されると考えられた。カーボネーション残渣中に 10.4% (0.010 mg/kg)、砂糖を結晶化した後の上澄み中に 7.5% (0.007 mg/kg) が認められた。抽出残渣をセルラーゼ処理して可溶化した液中には 15.7% (0.015 mg/kg) が認められ、酢酸エチルと分配すると大部分 (15.1%)

は水層中に分配された。セルラーゼ処理後の残渣は 2N 塩酸/ジオキサンで完全に可溶化され (0.048 mg/kg)、水相に 44.2%が、有機相に 5.6%が分配された (表 4)。水相中の放射エネルギーは、セルロース及びその他の構造物質 (例えばリグニン) への結合あるいは同化を示していると考えられる。

通常抽出の量と工業的製糖法の粗抽出液の放射エネルギーは類似しており、粗抽出液の大部分は糖として特性化され、通常抽出の極性物質の一部として特性化された。

以下の代謝経路が確認された。

- ヘキソース及び硫酸と抱合してデスメディファム-グリコシドサルフェート [Q] を生成する
- ヘキソース及びマロン酸と抱合してデスメディファム-マロニル-グリコシド [P] を生成する
- 親化合物が分解、無機化して、極性物質が生成し、大部分は糖などの生体物質に同化される。

推定代謝経路を図 1 に示した。

表2 てんさいの各抽出画分における残留量-フェニル環-¹⁴C 標識デスマディファム

	てんさい葉部 生育期試料 (溶媒抽出法)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)	
	TRR=10.066 mg/kg		TRR=1.497 mg/kg		TRR=0.115 mg/kg		TRR=0.096 mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
抽出液	84.0	8.455	72.4	1.084	29.2	0.034		
工業的製糖手法による粗抽出液							34.4	0.033
-希薄抽出液							24.0	0.023
-砂糖 (沈殿)							16.5	0.016
-上澄み							7.5	0.007
-カーボネーション残渣							10.4	0.010
セルラーゼ処理液	4.6	0.467	7.9	0.118	23.3	0.027	15.7	0.015
-水相	4.6	0.467	7.9	0.118	23.3	0.027	15.1	0.014
水相濃縮液					17.8	0.021		
濃縮後の沈殿物					5.5	0.006		
-有機相	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.	0.7	0.001
2N 塩酸/ジオキサン処理							49.8	0.048
-水相							44.2	0.042
-有機相							5.6	0.005
抽出 計	88.6	8.922	80.3	1.202	52.5	0.061	100.0	0.096
抽出残渣	11.4	1.145	19.7	0.295	47.5	0.055	n. d.	n. d.
総計	100.0	10.066	100.0	1.497	100.0	0.115	100.0	0.096

表3 てんさいにおける代謝物の分布-通常抽出-フェニル環-¹⁴C 標識デスメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (処理 15 日後) (溶媒抽出法)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (処理 63 日後) (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (処理 63 日後) (溶媒抽出法)	
	TRR=10.066 mg/kg		TRR=1.497 mg/kg		TRR=0.115 mg/kg	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
抽出液						
デスメディファム-マロニル-グリコシド[P]	9.2	0.928	3.9	0.059	2.0	0.002
デスメディファム-グリコシドサルフェート[Q]	39.4	3.970	52.5	0.786	7.5	0.009
デスメディファム	32.4	3.261	1.4	0.021	1.4	0.002
同定代謝物 計	81.1	8.159	63.7	0.954	10.8	0.012
極性放射能	0.5	0.051	n. d.	n. d.	17.0	0.020
未同定 1	n. d.	n. d.	4.0	0.059	n. d.	n. d.
未同定 2	0.5	0.045	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
未同定 3	n. d.	n. d.	5.8	0.087	n. d.	n. d.
未同定 4	1.5	0.149	4.7	0.071	n. d.	n. d.
未同定 5	0.5	0.050	n. d.	n. d.	1.4	0.002
セルラーゼ処理						
酢酸エチルと分配後の水相	4.6	0.467	7.9	0.118	---	---
酢酸エチルと分配後の水相及び HPLC 分析					17.8	0.021
水相濃縮後の沈殿					5.5	0.006
特性化した代謝物計	7.6	0.762	16.6	0.249	41.7	0.048
抽出計	88.6	8.922	80.3	1.202	52.5	0.061
抽出残渣	11.4	1.145	19.7	0.295	47.5	0.055
総計	100.0	10.066	100.0	1.497	100.0	0.115

表4 代謝物分析における通常抽出と工業的製糖法による抽出との比較

てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)	TRR=0.115 mg/kg		てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)	TRR=0.096 mg/kg	
	%	mg/kg		%	mg/kg
通常抽出	29.2	0.034	粗抽出液	34.4	0.033
-デスメディファム-マロニル-グリコシド[P]	2.0	0.002			
-デスメディファム-グリコシド-サルフェート[Q]	7.5	0.009			
-デスメディファム	1.4	0.002			
同定代謝物	10.8	0.012			
			-カーボネーション残渣	10.4	0.010
			-希薄抽出液	24.0	0.023
			-上澄み	7.5	0.007
-極性放射能*	17.0	0.020	-砂糖	16.5	0.016
特性化した画分	18.4	0.021		16.5	0.016
過酷抽出					
-セルラーゼ処理			-セルラーゼ処理	15.7	0.015
極性放射能#	17.8	0.021	水相	15.1	0.014
濃縮後水相の沈殿	5.5	0.006	有機相	0.7	0.001
有機相	n. q.	n. q.			
			-2N 塩酸/ジオキサン処理	49.8	0.048
			水相 (極性)	44.2	0.042
			有機相 (非極性)	5.6	0.005
抽出計	52.5	0.061	抽出計	100.0	0.096
抽出残渣	47.5	0.055	残渣	n. d.	n. d.
総計	100.0	0.115	総計	100.0	0.096

* 極性放射能はさらにアセチル化し酢酸エチルと分配して特性化した。

水相中の極性放射能はHPLC分析に基づき特性化した。

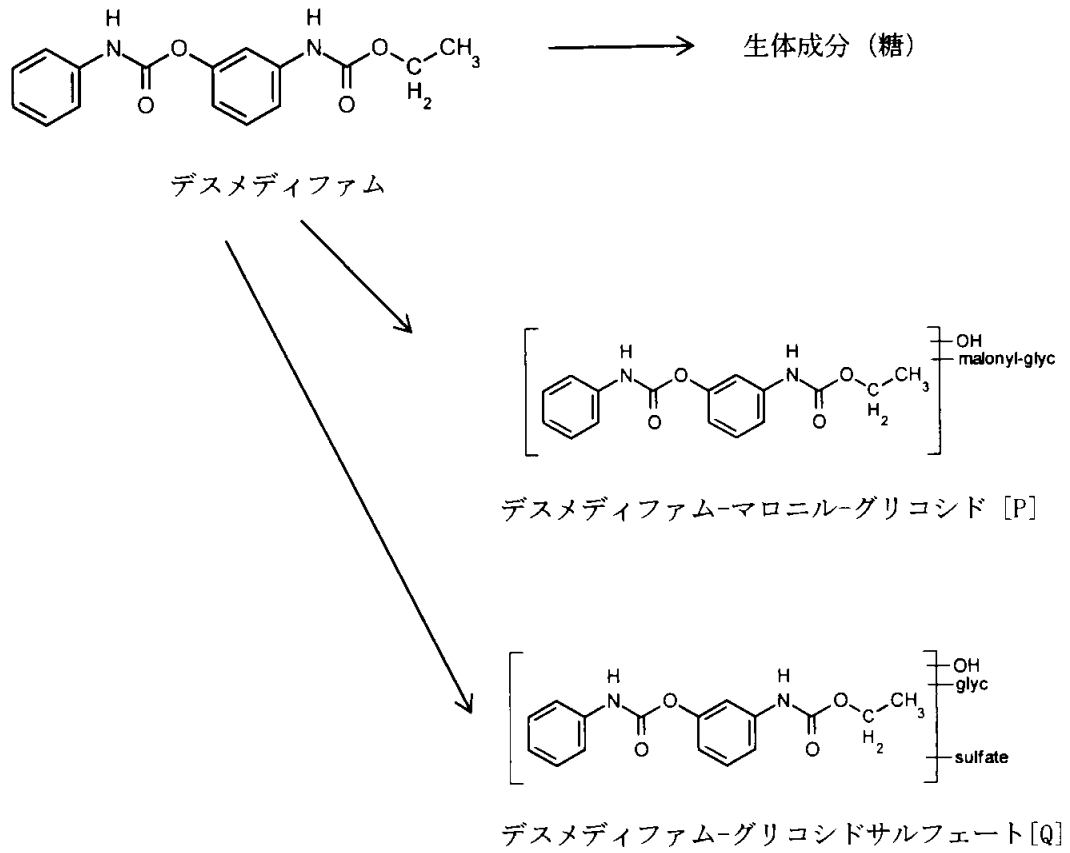


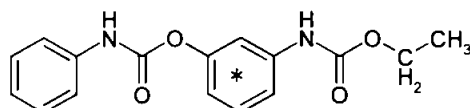
図1 フェニル環-¹⁴C 標識デスメディファムのでんさいにおける推定代謝経路

(4) アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファムを用いたてんさいにおける代謝
(資料 No. 運命 16)

試験機関：

報告書作成年：2014 年 (GLP)

供試標識化合物： アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファム



*：¹⁴C 標識位置

化学名：エチル 3'-フェニルカルバモイルオキシカルバニレート

比放射能量： 3.28MBq/mg (88.65 μCi/mg)

放射化学的純度：>99% (HPLC)

【方法】

温室内で栽培した6~8葉期のてんさい(品種：Kristallina)に対して、アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファム乳剤を水で希釈し、494 a. s./ha で1回散布処理した。

処理15日後に生育期試料として茎葉部を採取し、処理63日後に収穫期試料として茎葉部及び根部を採取した。採取した試料は2種の異なる抽出法(①溶媒抽出、②工業的製糖法による抽出・精製)を用いて抽出した。溶媒抽出では、採取した試料をギ酸を添加して酸性としたアセトニトリル/水(8/2)を用いて3回磨砕抽出し、HPLC-放射能検出器による定量及びHPLC-MS/MSによる代謝物の同定を行い、また、アセチル化後にジクロロメタンと分配し特性化を行った。抽出残渣はセルラーゼ処理後に酢酸エチルと分配し、水層は濃縮してHPLCによる分析を行った。

工業的な製糖方法に従った抽出・精製・製糖では、70℃の熱水で抽出し、石灰水処理、カーボネーション(二酸化炭素の添加)、加熱し、砂糖を沈殿させ、各画分の代謝物、放射能量を求め、溶媒抽出との比較を行った。更に抽出残渣はセルラーゼ処理、2N塩酸/ジオキサソール処理後に酢酸エチルと分配し、残留物の特性化を行った。

【結果】

採取した試料の総残留量は、処理 15 日後の茎葉で約 11 mg/kg、63 日後の収穫期の茎葉で約 1.9 mg/kg、根部で約 0.14 mg/kg であった（表 1）。

表 1 てんさい試料中の総残留放射能-アミノフェノキシ環標識デスメディファム

試料	処理後日数	総残留量 (TRR) (mg/kg)
てんさい茎葉、生育期試料	15 日	11.288
てんさい茎葉、収穫期試料	63 日	1.914
てんさい根部、収穫期試料	63 日	0.143

溶媒抽出による抽出率は、生育期の茎葉で約 88%、収穫期の茎葉で約 85%、収穫期の根部で約 30%であった。抽出残渣はセルラーゼ処理を行い、生育期の茎葉で 5.1%、収穫期の茎葉で 9.4%、収穫期の根部で 24.0%が可溶化された。抽出残渣中の放射能量は、生育期の茎葉で 6.6% (0.741 mg/kg)、収穫期の茎葉で 5.5% (0.104 mg/kg)、収穫期の根部で 45.6% (0.065 mg/kg) であった。

親化合物デスメディファムは生育期の茎葉では 15.5% (1.754 mg/kg) が認められ、収穫期の茎葉では 1.9%が認められ、収穫期の根部では検出されなかった。

デスメディファム-グリコシドサルフェート [Q] 及び EHPC の抱合体が代謝物として認められ、茎葉部の主要代謝物であった。生育期茎葉で約 60%、収穫期茎葉で約 80%を占めた。根部では、デスメディファム-グリコシドサルフェート [Q] (7.8%、0.011 mg/kg)、EHPC-グリコシドジサルフェート [R] (3.8%、0.005 mg/kg)、EHPC-グリコシドサルフェート [L] (1.2%、0.002 mg/kg) 及び EHPC-マロニル-グリコシド [S] (2.2%、0.003 mg/kg) が認められ、少量の EHPC [B] がセルラーゼ処理した収穫期根部で認められた。デスメディファム-マロニル-グリコシド [P] は生育期の茎葉で 8.6%、収穫期の茎葉で 2.5%が認められた。

極性放射能が溶媒抽出及び収穫期根部の可溶化液中にそれぞれ、15.4%及び 11.4%認められ、溶媒抽出の極性放射能はアセチル化後の分配挙動で特性化され、アセチル化した糖の挙動と類似しており、生体成分への同化の可能性を示唆した。

根部の残留物を更に特性化するため実施した工業的製糖法を模した抽出では、TRR の 54% (0.061 mg/kg) が粗抽出液中に認められ、溶媒抽出による放射能と類似していた。粗抽出液から結晶化した砂糖には TRR の 6.7% (0.008 mg/kg) が認められた。カーボネーション残渣中に 19.2% (0.0021 mg/kg)、砂糖を結晶化した後の上澄み中に 28.0% (0.032 mg/kg) が認められた。抽出残渣をセルラーゼ処理して可溶化した液中には 7.8% (0.009 mg/

kg) が認められ、酢酸エチルと分配すると大部分 (6.7%) は水層中に分配された。セルラーゼ処理後の残渣は 2N 塩酸/ジオキサンで完全に可溶化され (0.043 mg/kg)、水相に 32.9% が、有機相に 5.4% が分配された。水相中の放射能量は、セルロース及びその他の構造物質 (例えばリグニン) への結合あるいは同化を示していると考えられる。

以下の代謝経路が確認された。

- ヘキソース及び硫酸と抱合してデスメディファム-グリコシドサルフェート [Q] を生成する
- ヘキソース及びマロン酸と抱合してデスメディファム-マロニル-グリコシド [P] を生成する
- 親化合物が分解して、EHPC [B] が生成する。
- EHPC がヘキソース、硫酸、及びマロン酸と抱合して、EHPC-グリコシド [K]、EHPC-グリコシドサルフェート [L]、EHPC-グリコシドジサルフェート [R] 及び EHPC-マロニル-グリコシド [S] を生成する。
- 親化合物が分解及び無機化して、極性化合物となり、生体成分 (糖) へ同化される。

推定代謝経路を図 1 に示した。

表2 てんさいの各抽出画分における残留量-アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファム

	てんさい葉部 生育期試料 (溶媒抽出法)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)	
	TRR=11.288 mg/kg		TRR=1.914 mg/kg		TRR=0.143 mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
抽出液	88.4	9.976	85.2	1.630	30.3	0.043
セルラーゼ処理	5.1	0.570	9.4	0.180	24.0	0.034
-水相	5.1	0.570	9.4	0.180	---	---
水相濃縮液	---	---	---	---	17.6	0.025
濃縮後の沈殿物	---	---	---	---	6.4	0.009
-有機相	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.
抽出 計	93.4	10.547	94.5	1.810	54.4	0.078
抽出残渣	6.6	0.741	5.5	0.104	45.6	0.065
総計	100.0	11.288	100.0	1.914	100.0	0.143

表3 てんさいにおける代謝物の分布-溶媒抽出-アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (処理 15 日後) (溶媒抽出法)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (処理 63 日後) (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (処理 63 日後) (溶媒抽出法)	
	TRR=11.288 mg/kg		TRR=1.914 mg/kg		TRR=0.143 mg/kg	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
抽出液						
EHPC-グリコシドジサルフェート [R]	7.7	0.870	8.0	0.153	3.8	0.005
EHPC-グリコシド [K]	4.8	0.545	1.4	0.026	n. d.	n. d.
EHPC-グリコシドサルフェート [L]	7.2	0.816	8.0	0.153	1.2	0.002
EHPC-マロニル-グリコシド [S]	2.6	0.296	--	--	2.2	0.003
EHPC (B)	2.6	0.293	--	--	n. d.	n. d.
EHPC-マロニル-グリコシド [S] 及び EHPC [B]	--	--	29.1	0.557	--	--
デスメディファム-マロニル-グリコシド [P]	8.6	0.965	2.5	0.047	n. d.	n. d.
デスメディファム-グリコシドサルフェート [Q]	37.5	4.233	31.9	0.610	7.8	0.011
デスメディファム	15.5	1.754	1.9	0.036	n. d.	n. d.
同定代謝物 計	86.6	9.772	82.6	1.581	14.9	0.021
極性放射能	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	15.4	0.022
未同定 4	1.5	0.167	2.0	0.039	n. d.	n. d.
未同定 5	0.3	0.037	0.5	0.010	n. d.	n. d.
セルラーゼ処理						
酢酸エチルと分配後の水相	5.1	0.570	9.4	0.180	---	---
-極性放射能	---	---	---	---	11.4	0.016
-EHPC (B)	---	---	---	---	6.2	0.009
-水相濃縮後の沈殿	---	---	---	---	6.4	0.009
特性化した代謝物計	6.9	0.774	12.0	0.229	33.3	0.048
抽出計	93.4	10.547	94.5	1.810	54.4	0.078
抽出残渣	6.6	0.741	5.5	0.104	45.6	0.065
総計	100.0	11.288	100.0	1.914	100.0	0.143

表 4 溶媒抽出と工業的製糖法による抽出との比較-アミノフェノキシ環-¹⁴C 標識デスメディファム

てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)			てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)		
	TRR=0.143 mg/kg			TRR=0.113 mg/kg	
	%	mg/kg		%	mg/kg
溶媒抽出	30.3	0.043	粗抽出液	53.9	0.061
-EHPC-グリコシドジサルフェート [R]	3.8	0.005	-カーボネーション沈殿	19.2	0.021
-EHPC-グリコシドサルフェート [L]	1.2	0.002	-希薄抽出液	34.7	0.039
-EHPC-マロニル-グリコシド [S]	2.2	0.003	-上澄み	28.0	0.032
-デスメディファム-グリコシドサルフェート [Q]	7.8	0.011	-砂糖	6.7	0.008
-極性放射能*	15.4	0.022			
過酷抽出 (セルラーゼ処理後に酢酸エチルと分配)	24.0	0.034			
-EHPC [B]	6.2	0.009			
-極性放射能	11.4	0.016			
-濃縮後の沈殿	6.4	0.009			
同定代謝物計	21.1	0.030			
特性化代謝物計	26.8	0.038			
HPLC で分析せず	6.4	0.009			
抽出計	54.3	0.077			
抽出残渣	45.6	0.065	残渣	46.1	0.052
総計	100.0	0.143			
			過酷抽出		
			-セルラーゼ処理	7.8	0.009
			水相 (極性)	6.7	0.008
			有機相 (非極性)	1.1	0.001
			-2N 塩酸/ジオキサン処理	38.3	0.043
			水相 (極性)	32.9	0.037
			有機相 (非極性)	5.4	0.006
			抽出計	100.0	0.113
			抽出残渣	n. d.	n. d.
			総計	100.0	0.113

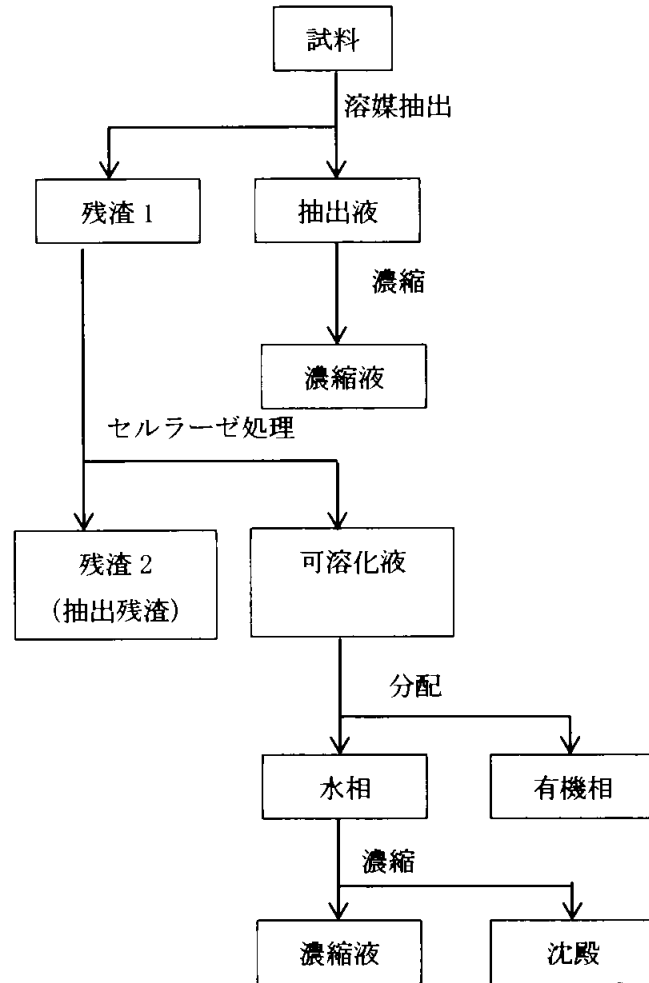


図1 溶媒抽出

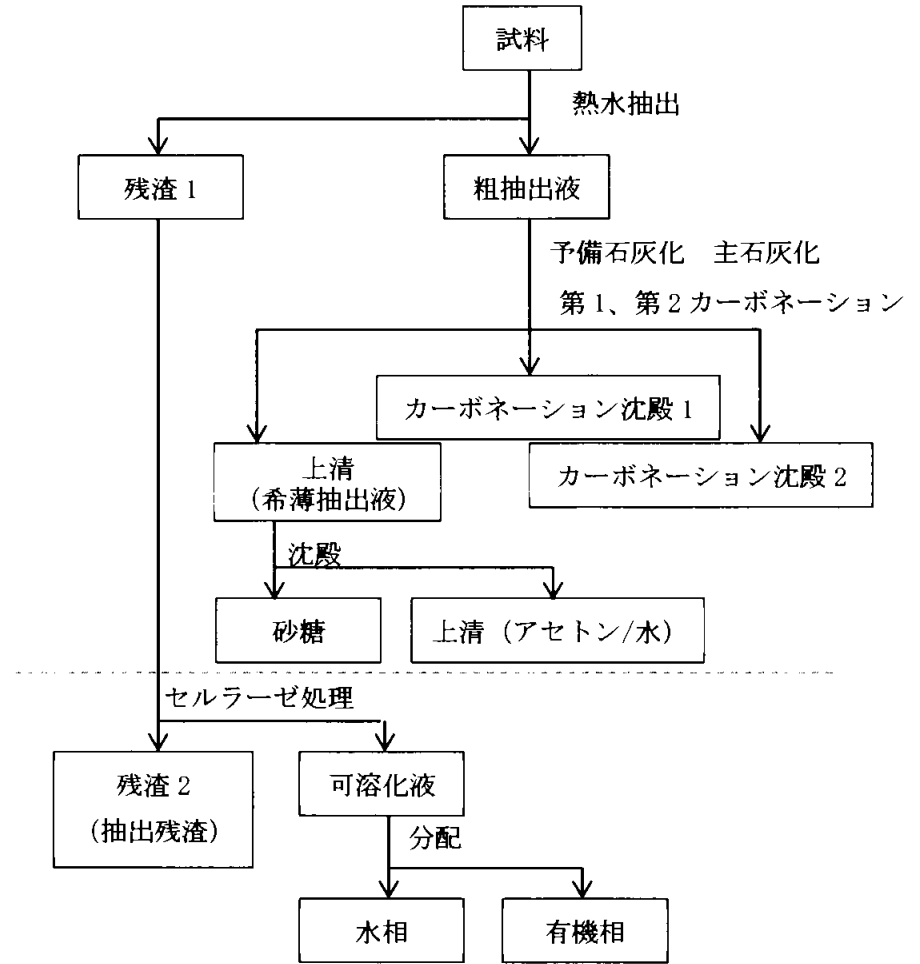


図2 工業的製糖法を模した抽出

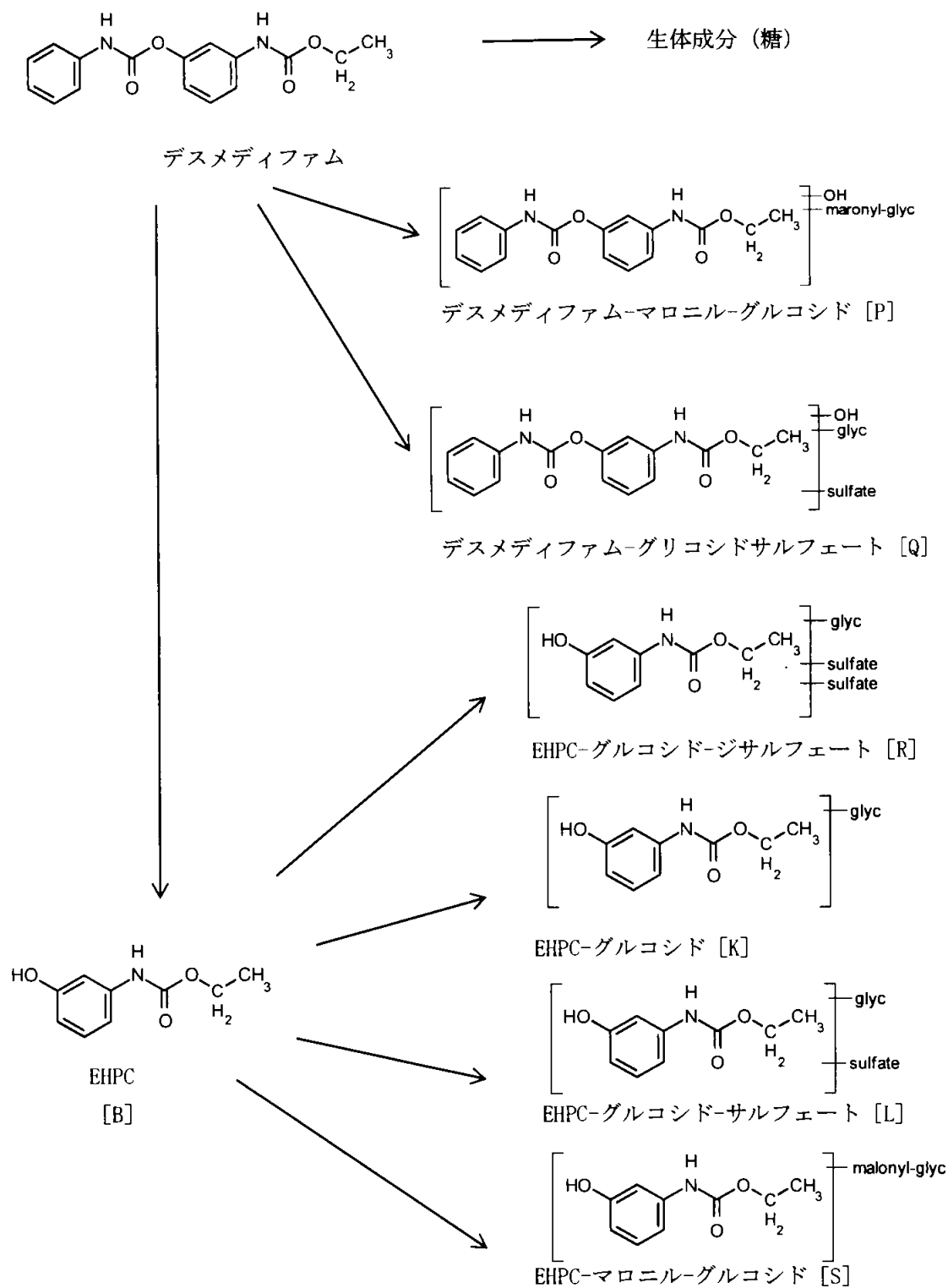


図1 アミノフェノキシ環-¹⁴C標識デスメディファムのてんさいにおける推定代謝経路

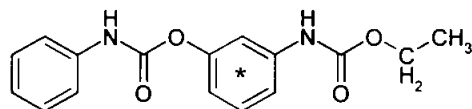
3. 土壤中運命に関する試験

- (1) ^{14}C 標識デスメディファムの土壤における代謝 (資料No.運命-7)
(砂土：好気条件)

試験機関:

報告書作成年：1985年

供試標識化合物： ^{14}C アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



* ^{14}C 標識位置

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

比放射能：64.86 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：95%以上

供試土壤：次表に示す土壤を用いた。

項目	土壤No.162
pH	7.1
有機物炭素含量 (%)	0.84
粘土含量 (%) < 2 μm	6.5
シルト (%) 2~20 μm	4.6
細砂 (%) 20~200 μm	18.2
粗砂 (%) 0.2~2mm	70.7
最大含水量 (g/100g)	19.4
嵩比重 (kg/.)	1.53
土壤型	砂土

試験方法：

処理： ^{14}C 標識及び非標識デスメディファムをアセトンに溶解し、土壤に5ppmになるように添加した後、バイオメーターフラスコに移した。土壤の最大含水量の75%になるように水を加えた。バイオメーターフラスコの側枝に0.1NのKOHを10mL充填してフラスコを密閉し、発生する炭酸ガスをKOH溶液に捕集した。一部を15°Cの暗所に、他の一部を25°Cの暗所に置き、インキュベートした。

試料の採取及び抽出：土壤試料は処理後0、1、3、7、14、30、44及び60日に採取し、メタノール/アセトン溶液を用いて振盪抽出した。続いて蒸留水を用いて超音波抽出を行い、濾過した後、メタノールを用いて24時間ソックスレー抽出を行った。各抽出段階で抽出画分中の放射能は、液体シンチレーションカウンターで測定した。さらに、抽出残渣を乾燥後細かく磨砕した。これを燃焼させ、発生する炭酸ガスを捕集し、

放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

また、別に有機溶媒及び水による抽出液は濃縮後、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分離、測定した。インキュベーション中に発生した炭酸ガスを捕集したKOH溶液は一部をpH2に調整し、イソオクタンを用いて分配した。水層及びイソオクタン層の両方を液体シンチレーションカウンターで測定した。

試験結果：次表に各画分中の放射能の経時変化を示す。

1) 温度条件：15℃

(単位：%処理放射能に対する割合)

画 分	処 理 後 日 数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
炭 酸 ガ ス	—	0.2	0.4	1.0	2.1	8.4	12.8	13.2
メタノール/アセトン画分	91.0	91.3	86.4	74.2	48.8	19.8	10.5	5.6
水 相 画 分	0.6	0.7	1.1	2.1	4.2	4.2	2.3	4.0
ソックスレー抽出画分	1.2	1.7	2.2	2.0	6.5	2.8	2.5	2.4
残 渣	0.7	1.5	3.9	10.2	22.2	43.5	44.0	49.2
合 計	93.5	95.3	94.1	89.4	83.7	78.7	72.0	74.3

2) 温度条件：25℃

(単位：%処理放射能に対する割合)

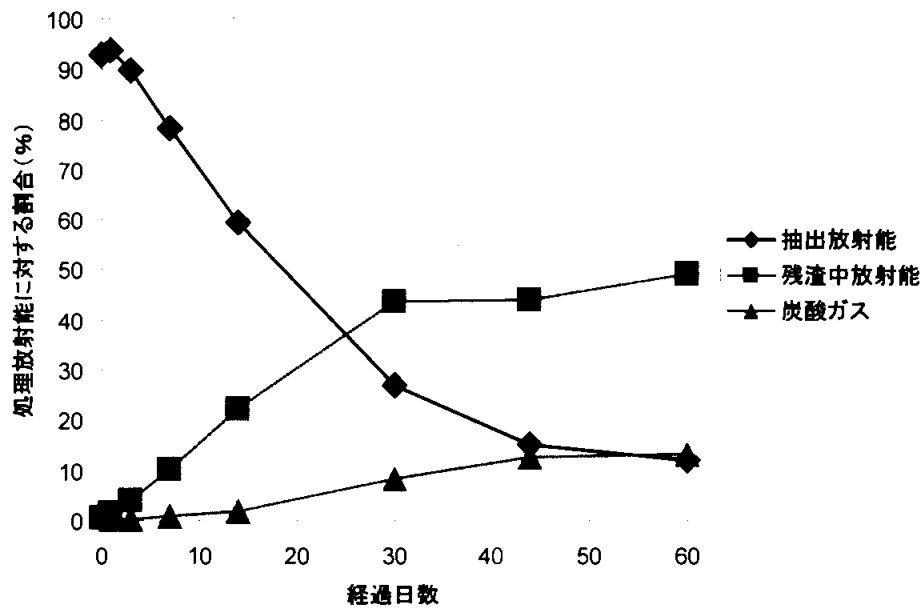
画 分	処 理 後 日 数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
炭 酸 ガ ス	—	0.2	1.4	4.2	7.1	14.0	16.7	18.8
メタノール/アセトン画分	91.0	87.6	69.4	40.1	26.2	3.7	2.1	1.7
水 相 画 分	0.6	0.8	2.5	4.2	3.0	3.7	2.3	3.0
ソックスレー抽出画分	1.2	1.7	3.2	3.3	4.7	2.2	2.1	1.7
残 渣	0.7	3.4	11.7	33.4	44.9	45.3	47.8	47.1
合 計	93.5	93.7	88.1	85.3	86.0	68.9	71.0	72.4

炭酸ガスの発生は、15℃の場合に比べ25℃の方が多く、処理後7日では15℃及び25℃で各々1.0及び4.2%であり、処理後60日では各々13.2及び18.8%であった。

一方、残渣（土壌結合）中放射能は、いずれの条件においても時間と共に増加し、15℃では30日、25℃では14日に処理放射能に対する割合が約45%に到達した。

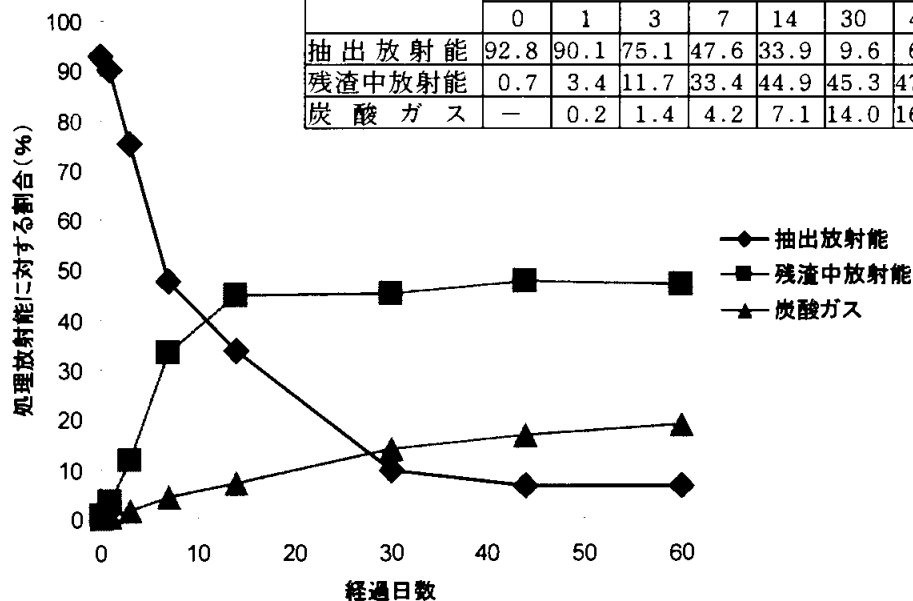
メタノール/アセトン抽出画分中放射能は時間経過と共に減少した。次に、メタノール/アセトン抽出画分、水相画分及びソックスレー抽出画分を用いて、薄層クロマトグラフィーにより分離、測定した結果を次表に示す。

画分	経過日数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
抽出放射能	92.8	93.7	89.7	78.3	59.5	26.8	15.3	12.0
残渣中放射能	0.7	1.5	3.9	10.2	22.2	43.5	44.0	49.2
炭酸ガス	—	0.2	0.4	1.0	2.1	8.4	12.8	13.2



砂土を用いた15°Cにおける好気条件下での放射能の消長
(抽出放射能、残渣中放射能、炭酸ガス)

画分	経過日数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
抽出放射能	92.8	90.1	75.1	47.6	33.9	9.6	6.5	6.4
残渣中放射能	0.7	3.4	11.7	33.4	44.9	45.3	47.8	47.1
炭酸ガス	—	0.2	1.4	4.2	7.1	14.0	16.7	18.8



砂土を用いた25°Cにおける好気条件下での放射能の消長
(抽出放射能、残渣中放射能、炭酸ガス)

3) 温度条件：15°C

(単位：%処理放射能に対する割合)

化合物	処理後日数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
デスメディファム	87.2	86.3	76.8	65.1	40.9	15.1	4.8	4.8
EHP C*	4.1	3.9	8.1	8.5	11.9	4.5	4.3	1.3
その他**	0.5	1.7	2.7	1.9	3.5	1.5	2.0	1.2
原点	1.3	1.8	2.0	2.8	3.2	5.5	4.3	4.7

*：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート：代謝物B

**：未同定化合物等

4) 温度条件：25°C

(単位：%処理放射能に対する割合)

化合物	処理後日数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
デスメディファム	87.2	78.3	56.5	30.3	23.0	2.7	1.0	1.4
EHP C*	4.1	8.2	13.8	12.0	6.2	1.6	1.0	0.7
その他**	0.5	1.7	2.5	3.0	2.1	0.6	1.4	1.2
原点	1.3	2.0	2.4	2.4	2.6	4.1	3.1	3.1

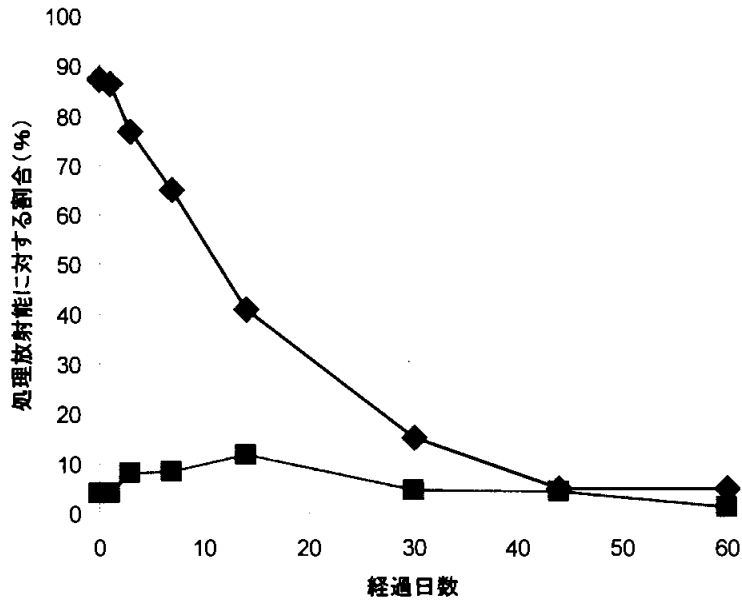
*：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート：代謝物B

**：未同定化合物等

温度条件の差による本質的な分解の差はなく、土壌中のデスメディファムは、代謝分解されてEHP C及びより極性の強い未同定化合物（上表中原点で示す）になるものと推定された。また、原点付近の放射能及びこれら以外（上表中その他で示す）で検出された放射能は、各々6%以下及び4%以下であった。

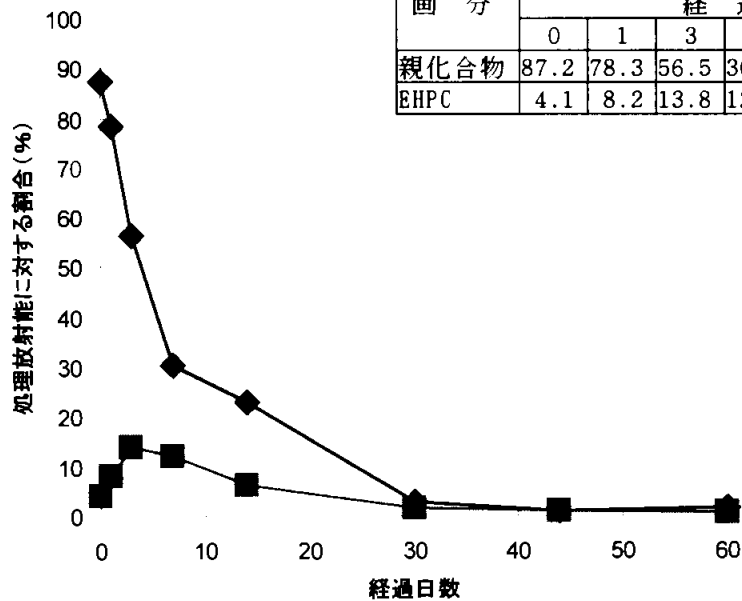
親化合物の15°C及び25°C条件下における半減期は、各々12.4日及び5.5日と計算された。また、分解物のEHP Cの場合、最大に到達後、半減するまでの期間は、15°Cでは21日及び25°Cでは9日と計算された。

画 分	経 過 日 数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
親化合物	87.2	86.3	76.8	65.1	40.9	15.1	4.8	4.8
EHPC	4.1	3.9	8.1	8.5	11.9	4.5	4.3	1.3



砂土を用いた15°Cにおける好気条件下での親化合物及び主要代謝物、EHPCの消長

画 分	経 過 日 数							
	0	1	3	7	14	30	44	60
親化合物	87.2	78.3	56.5	30.3	23.0	2.7	1.0	1.4
EHPC	4.1	8.2	13.8	12.0	6.2	1.6	1.0	0.7



砂土を用いた25°Cにおける好気条件下での親化合物及び主要代謝物、EHPCの消長

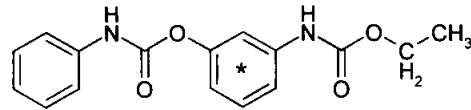
3. 土壤中運命に関する試験

(2) ^{14}C 標識デスメディファムの土壌における代謝 (資料No. 運命-8) (壤質砂土：好気条件)

試験機関：

報告書作成年：1985年

供試標識化合物： ^{14}C アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



* ^{14}C 標識位置

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

比放射能：64.86 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：95%以上

供試土壌：次表に示す土壌を用いた。

項目	土壌No.161
pH	7.2
有機物炭素含量 (%)	8.78
粘土含量 (%) < 2 μm	8.0
シルト (%) 2~20 μm	4.9
細砂 (%) 20~200 μm	52.4
粗砂 (%) 0.2~2mm	34.7
最大含水量 (g/100g)	約 85
嵩比重 (kg/.)	約 0.8
土壌型	壤質砂土

試験方法：

処理： ^{14}C 標識及び非標識デスメディファムをアセトンに溶解し、土壌に5ppmになるように添加した後、バイオメーターフラスコに移した。土壌の最大含水量の約65%になるように水を加えた。バイオメーターフラスコの側枝に0.1NのKOHを10mL充填してフラスコを密閉し、発生する炭酸ガスをKOH溶液に捕集した。一部を15°Cの暗所に、他の一部を25°Cの暗所に置き、インキュベートした。

試料の採取及び抽出：試料は処理後0、1、3、7、14、30、44、59及び90日に採取し、メタノール/アセトン溶液を用いて振盪抽出した。続いて蒸留水を用いて超音波抽出を行い、濾過した後、メタノールを用いてソックスレー抽出した。各抽出段階で得られた抽出画分中の放射能は、液体シンチレーションカウンターで測定した。さらに、抽出残渣を乾燥後細かく磨砕した。これを燃焼させ、発生する炭酸ガスを捕集し、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

また、別に有機溶媒及び水による抽出液は濃縮後、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分離、測定した。インキュベーション中に発生した炭酸ガスを捕集したKOH溶液は一部をpH2に調整し、イソオクタンを用いて分配した。水層及びイソオクタン層の両方を液体シンチレーションカウンターで測定した。

試験結果：次表に各画分中の放射能の経時変化を示す。

1) 温度条件：15°C

(単位：%処理放射能に対する割合)

画 分	処 理 後 日 数								
	0	1	3	7	14	30	44	59	90
炭 酸 ガ ス	—	0.2	0.6	1.2	2.8	6.0	9.3	11.4	14.3
メタノール/アセトン画分	96.2	94.9	90.0	84.5	70.3	41.2	25.9	16.8	6.1
水 相 画 分	0.3	0.1	0.2	0.3	0.4	0.7	1.5	0.7	1.8
ソックスレー抽出画分	0.8	0.9	1.7	2.0	2.2	3.3	2.4	3.9	1.8
残 渣	0.8	2.2	5.0	9.1	21.2	41.4	50.3	54.8	64.0
合 計	98.0	98.3	97.5	97.0	97.0	92.7	89.4	87.7	88.0

2) 温度条件：25°C

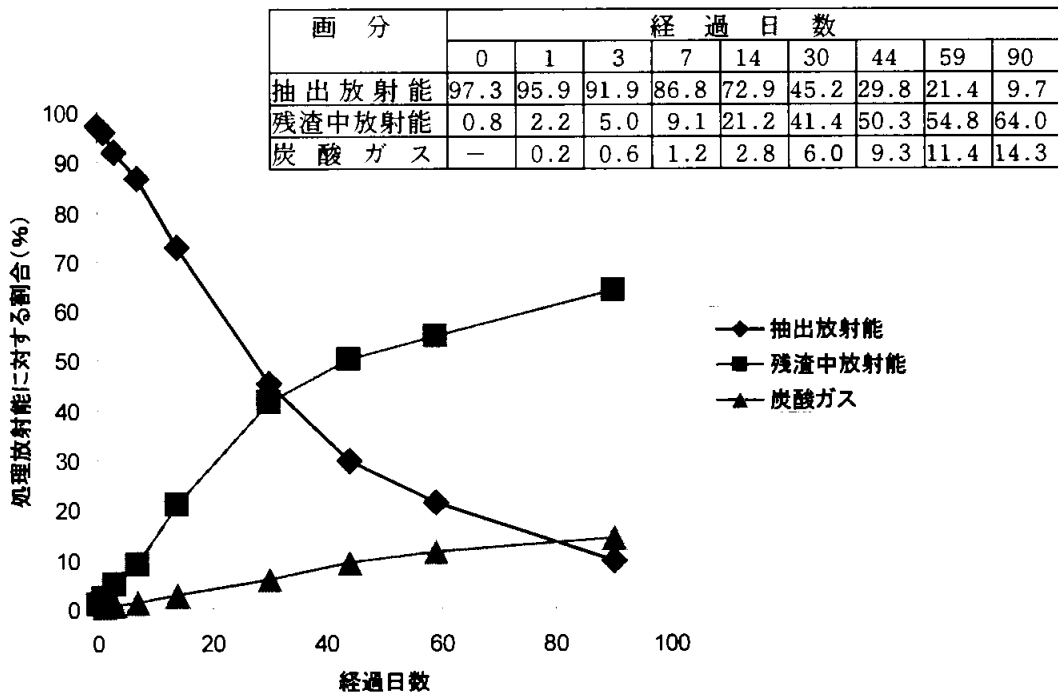
(単位：%処理放射能に対する割合)

画 分	処 理 後 日 数								
	0	1	3	7	14	30	44	59	90
炭 酸 ガ ス	—	0.4	1.0	3.6	6.8	10.4	16.4	15.8	19.2
メタノール/アセトン画分	96.2	92.0	82.4	57.2	35.6	7.5	3.1	2.5	1.6
水 相 画 分	0.3	0.2	0.3	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8
ソックスレー抽出画分	0.8	1.4	1.9	2.8	3.7	4.2	2.2	2.2	1.5
残 渣	0.8	3.9	11.4	25.3	45.7	71.8	64.5	69.2	64.4
合 計	98.0	97.8	97.0	89.5	92.7	94.6	86.9	90.4	87.4

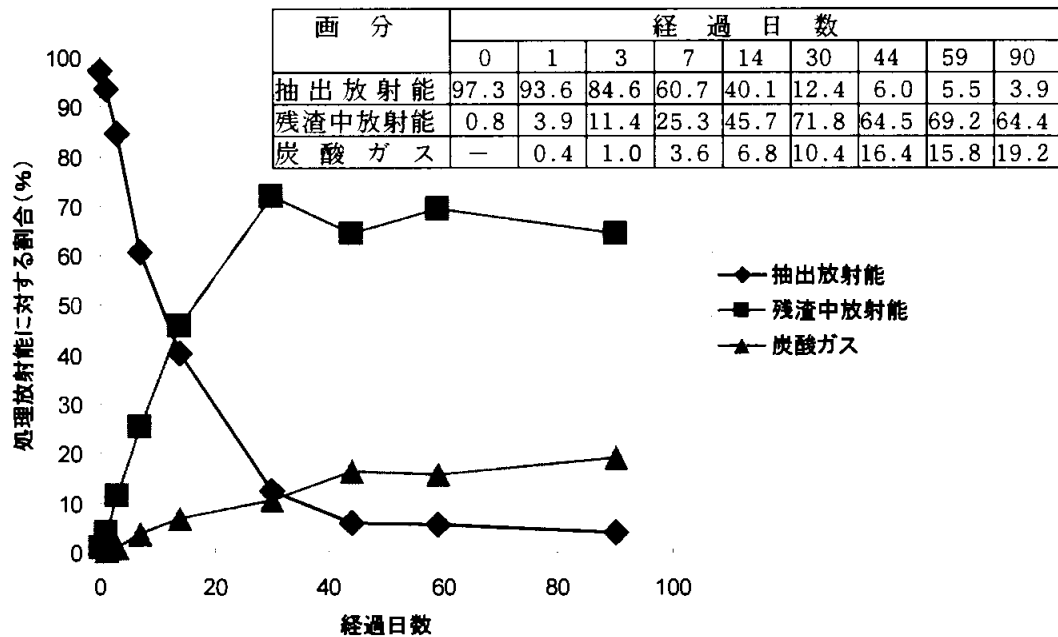
炭酸ガスの発生は、15°Cの場合に比べ25°Cの方が多く、処理後7日では15°C及び25°Cで各々1.2及び3.6%であり、処理後90日では各々14.3及び19.2%であった。

一方、残渣（土壌結合）中放射能は、いずれの条件においても時間と共に増加し、処理後90日には両者とも約64%となった。15°Cでは処理後90日に到達したが、25°Cでは処理後約30日に約72%となり、その後減少した。

メタノール/アセトン抽出画分中放射能は時間経過と共に減少した。次いで、メタノール/アセトン抽出画分、水相画分及びソックスレー抽出画分を用いて、薄層クロマトグラフィーにより分離、測定した結果を次表に示す。



壤質砂土を用いた15°Cにおける好気条件下での放射能の消長
(抽出放射能、残渣中放射能、炭酸ガス)



壤質砂土を用いた25°Cにおける好気条件下での放射能の消長
(抽出放射能、残渣中放射能、炭酸ガス)

3) 温度条件：15℃

(単位：%処理放射能に対する割合)

化合物	処理後日数							
	0	1	3	7	14	44	59	90
親化合物	92.5	88.7	82.7	77.4	56.8	19.0	13.8	4.8
EHP C*	3.1	3.5	5.5	5.3	11.5	3.1	3.2	1.4
その他**	1.5	3.3	3.4	2.0	1.0	3.5	1.4	1.3
原点	0.2	0.2	0.2	2.2	3.5	4.1	3.0	2.2

*：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート 代謝物B

**：未同定化合物等

4) 温度条件：25℃

(単位：%処理放射能に対する割合)

化合物	処理後日数								
	0	1	3	7	14	30	44	59	90
親化合物	92.5	81.7	74.3	50.6	28.3	6.2	2.9	1.8	1.2
EHP C*	3.1	8.3	7.1	4.2	7.3	2.1	1.5	1.1	1.1
その他**	1.5	3.2	2.9	4.7	1.8	0.8	0.5	0.5	0.4
原点	0.2	0.3	0.2	1.2	2.7	3.4	1.0	2.1	1.2

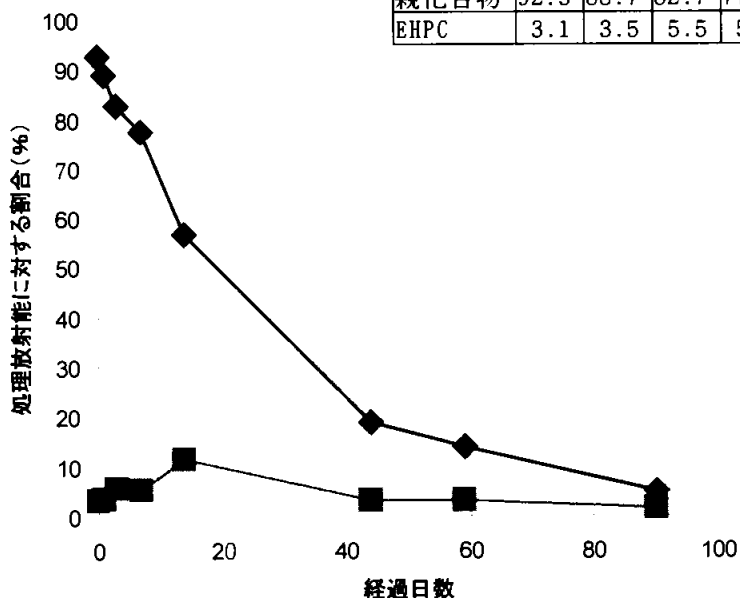
*：N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート 代謝物B

**：未同定化合物等

温度条件の差による本質的な分解の差はなく、土壌中のデスメディファムは、代謝分解されてEHP C (B) 及びより極性の強い未同定化合物 (上表中原点で示す) になるものと推定された。また、原点付近の放射能及びこれら以外 (上表中その他で示す) で検出された放射能は、15℃及び25℃両条件でいずれも5%以下であった。

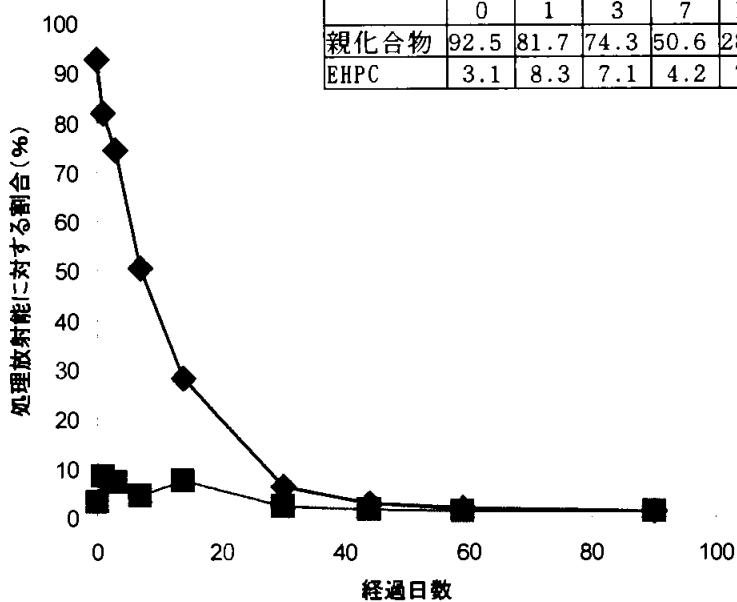
親化合物の15℃及び25℃条件下における半減期は、各々20.5日及び8.3日と計算された。一方、分解物のEHP C (B) の場合、最大に到達後、半減するまでの期間は、15℃で27日及び25℃で21日と計算された。

画分	経過日数							
	0	1	3	7	14	44	59	90
親化合物	92.5	88.7	82.7	77.4	56.8	19.0	13.8	4.8
EHPC	3.1	3.5	5.5	5.3	11.5	3.1	3.2	1.4



壤質砂土を用いた15°Cにおける好気条件下での親化合物及び主要代謝物EHPCの消長

画分	経過日数								
	0	1	3	7	14	30	44	59	90
親化合物	92.5	81.7	74.3	50.6	28.3	6.2	2.9	1.8	1.2
EHPC	3.1	8.3	7.1	4.2	7.3	2.1	1.5	1.1	1.1



壤質砂土を用いた25°Cにおける好気条件下での親化合物及び主要代謝物EHPCの消長

3. 土壤中運命に関する試験

(3) ¹⁴C標識デスメディファムの土壌における代謝 (資料No. 運命-9)
(壤質砂土：嫌気条件)

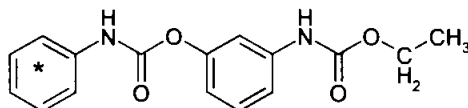
試験機関：

報告書作成年：1982年

供試標識化合物：

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

(1) ¹⁴C-フェニル環標識デスメディファム (P標識)

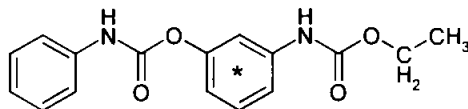


* ¹⁴C標識位置

比放射能：2.20x10⁶ Bq/mg (17.82 mCi/mMol)

放射化学的純度：97%以上

(2) ¹⁴C-アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



* ¹⁴C標識位置

比放射能：2.40x10⁵ Bq/mg (1.95 mCi/mMol)

放射化学的純度：95%以上

供試土壌：次表に示す土壌を用いた。

項目	German standard soil 2.2
pH (0.1NKCl)	6.8
有機物炭素含量 (%)	1.85
粘土含量 (%) < 2μ	9.3
シルト (%) 2~20μ	6.5
最大含水量 (vol %)	36
土壌型	壤質砂土

試験方法：

当試験では通常処理量として 5 ppm の区を設け、代謝物の単離・同定を補助する目的で 500 ppm の区を設けた。

(1) 代謝試験(5 ppm処理)

処理：¹⁴C 標識デスメディファムを土壤に 5ppm の濃度になるように処理し、バイオメーターフラスコに移した。次いで、蒸留水を土壤表面からの湛水深が 2cm となるように加え、フラスコの側枝には炭酸ガス捕集用の KOH 溶液を充填した後、N₂ガスを 2 時間通気し、酸素を置換した。(蒸留水及び KOH 溶液は予め N₂ガスを 12 時間通気して用いた)。バイオメーターフラスコはゴム栓で閉じ、パラフィンで封印した。このフラスコを 24°C の暗所に置き、インキュベートした。

試料の採取及び抽出：試料は処理後 20、40、80 及び 145 日に採り、メタノール/アセトン溶液を用いて室温下で 5 回振盪抽出後メタノールを用いて 24 時間ソックスレー抽出した。

続いて、ソックスレー抽出残渣に 0.5N NaOH を加えてフミン酸及びフルボ酸を可溶化して採取した。

得られた各抽出画分は液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

有機溶媒による抽出液は濃縮後、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分離し、コクロマトグラフィーにより同定した。放射能はオートラジオグラフィーにより検出し、その後、放射能を有するスポットを削り取り、液体シンチレーションカウンターで測定した。

(2) 代謝物同定の補助 (500 ppm処理)

処理：¹⁴C 標識 (P 標識) 及び非標識デスメディファムをテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、土壤に 500 ppm の濃度になるように処理し、酸素を含まない蒸留水を加えて湛水し 3 時間窒素パージした後密封し、25°C の暗所に置き、インキュベートした。

試料の採取、抽出及び分離：

試料は処理 79 日後に採取し、水相を分離後、土壤に THF を加えて 1 時間振盪抽出した。この操作を 4 回繰り返した。THF 抽出液を濾過後減圧留去し、引き続きシリカゲルクロマトグラフィーを行った。次いで、各画分中の放射能を精製、分取するため、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを行い、放射能を有する個所を削り取り、さらに THF を用いて抽出後、トルエンを展開溶媒としてカラムクロマトグラフィーを行い、単離・精製した。代謝物同定のため、質量分析を行った。

試験結果：(1) 代謝試験における放射能の分布

5 ppm処理試料における各抽出画分中の放射能の経時変化を次表に示す。

(単位：%処理放射能に対する割合)

標識位置及び画分		処理後日数			
		20	40	80	145
P 標識	炭酸ガス	0.5	0.8	1.1	2.4
	水相	7.3	8.2	4.7	1.4
	メタノール/アセトン画分	32.0	23.2	12.3	5.0
	ソックスレー抽出画分	7.7	7.3	5.3	5.6
	フミン酸+フルボ酸	20.1	17.4	12.4	18.4
	残渣	17.7	24.6	21.3	37.9
	合計	85.3	81.5	57.1	70.7
AP 標識	炭酸ガス	0.4	0.1	<0.1	<0.1
	水相	9.6	10.2	2.6	2.0
	メタノール/アセトン画分	42.0	28.5	11.3	8.3
	ソックスレー抽出画分	5.8	3.8	2.9	4.1
	フミン酸+フルボ酸	9.2	15.1	18.9	21.2
	残渣	5.8	22.9	29.6	32.6
	合計	72.8	80.6	65.4	68.3

(2) 代謝物

500 ppm 処理試料から、質量分析及び TLC コクロマトグラフィーにより、下記の3種の代謝物が同定された。

- (a) N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート (EHPC)
- (b) 1,3-ジフェニル尿素 (DPU)
- (c) N-(フェニル)エチルカルバマート (PEC)

5 ppm処理試料では、20種以上の代謝物がTLCで確認されたが、0.1%以上の代謝物の生成の経時推移は以下の通りであった。

(単位：%処理放射能に対する割合)

代謝物		処理後日数			
		20	40	80	145
P 標識	デスメディファム	23.4	10.4	4.6	1.9
	未知物質 F	2.6	2.7	0.9	0.5
	未同定物質 L	3.5	8.6	1.4	1.0
	未知物質(3種の合計)	6.3	11.8	3.8	3.2
	原点	1.6	2.2	1.8	0.9
AP 標識	デスメディファム	14.0	9.5	4.6	1.6
	EHPC	28.4	24.6	5.9	6.0
	未知物質 F	1.9	1.6	0.9	0.5
	未知物質 C	2.1	3.4	1.0	1.2
	原点	1.2	2.2	1.5	1.7

以上の結果から、デスメディファムは土壤中で分解され、水相及び有機溶媒抽出放射能は暫時減少する一方、残渣及びフミン酸+フルボ酸画分への放射能の移行が進行し、処理後145日では標識位置に関わらず50%以上に達した。薄層クロマトグラフィーにより、親化合物及び分解物を検出し、それらの量的推移につき検討した。代謝物として3種が同定された。壤質砂土の嫌気条件下におけるデスメディファムの消長を、2-コンパートメントモデルに適合させて求めた半減期は4.3日であった。

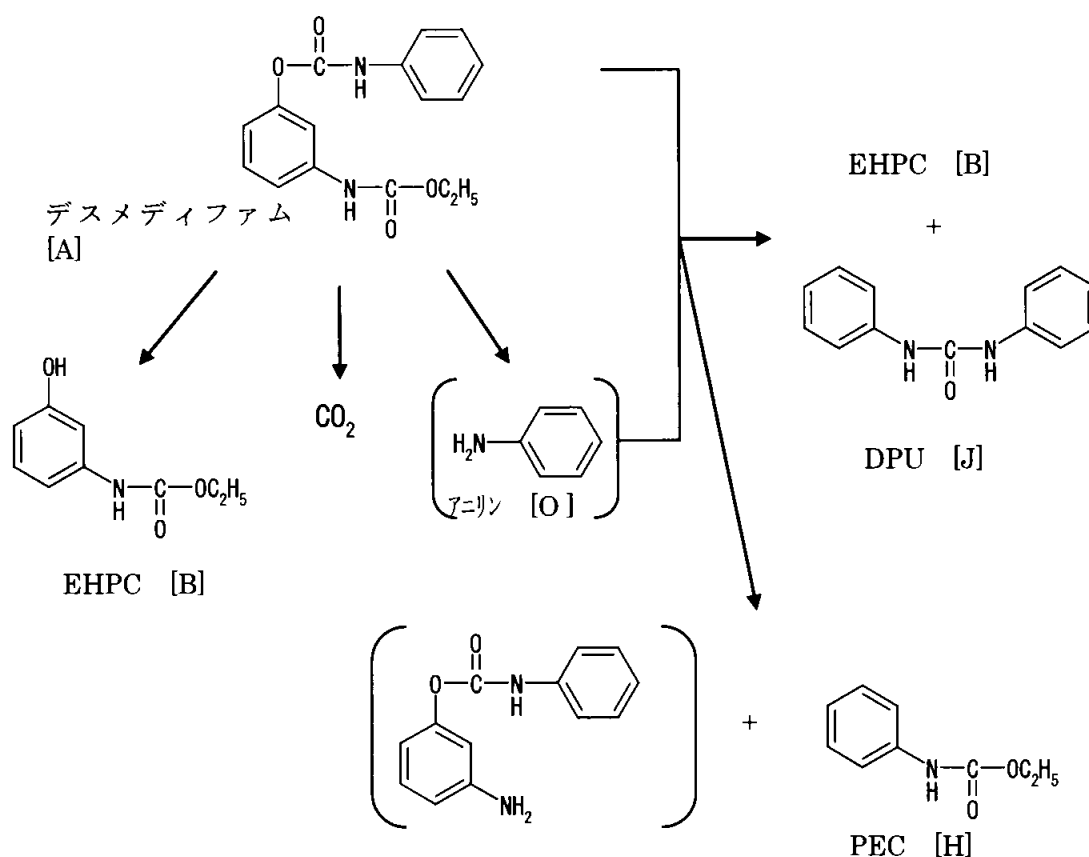


図 デスメディファムの嫌気条件土壌における推定代謝経路

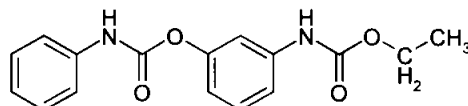
4. 加水分解運命試験

(1) デスメディファムの加水分解試験 (緩衝液) (資料No. 運命-10)

試験機関:

報告書作成年: 1982年、1983年

供試化合物:



エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

試験溶液: 次の各滅菌緩衝溶液にデスメディファムのメタノール溶液を添加し、7mg/L溶液の試験溶液とした。

pH5 1.5×10^{-2} M酢酸 + 1×10^{-2} M水酸化カリウム

pH7 2.8×10^{-3} Mリン酸二水素カリウム + 2.4×10^{-3} Mリン酸水素二ナトリウム

pH9 5×10^{-3} M四ホウ酸ナトリウム + 6.9×10^{-3} Mホウ酸

試験方法: 上記の各試験溶液 (初期濃度7mg/L) を暗条件下で22°Cの水槽で試料採取時までインキュベーションした。

経時的に試料を採取し、HPLCにより親化合物を測定した。

デスメディファムの濃度Cの対数と各試料採取時間との間には、22°Cにおいて次式の直線関係が得られる。

$$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t$$

ただし、C = デスメディファムの濃度

t = 時間

C₀ = 初期濃度

k = 加水分解速度常数

結果: (1) 上の式から求めた速度常数平均及び推定半減期を次表に示す。

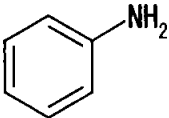
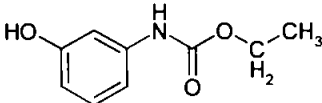
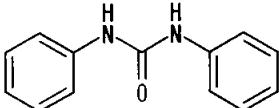
試験温度 [°C]	pH	濃度 [mg/L]	速度常数 K[1/h]	半減期 (時間)
22	5	7.0	4.1×10^{-4}	1676
22	7	7.0	3.5×10^{-2}	19.6
22	9	7.0	4.0	0.17

以上の結果から、デスメディファムは22°Cの一定温度条件では、酸性 (pH5) 溶液中で半減期が1676時間 (約70日) であり比較的安定であるが、pHの上昇に伴い加水分解が促進され、アルカリ性 (pH9) 溶液中では半減期が0.17時間と速やかであった。

(2) 加水分解物の同定

本試験とは別に実施した加水分解試験（1983年）で、加水分解生成物として次の3化合物が同定された。各生成物の同定及び定量は2種のHPLC試験系を用いて行った。

主たる加水分解生成物はアニリンとN-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマートで、その他に微量のジフェニルウレアが同定された。

化合物	構造式
アニリン (0)	
N-(3-ヒドロキシフェニル) エチルカルバマート (EHPC (B))	
ジフェニルウレア (DPU (J))	

尚、これら分解生成物の相対的生成量を下表に示す。

時間 (秒)	mol%				II+III Σ I+IV+ ($\frac{II+III}{2}$)
	DMP I	アニリン II	EHPC III	ジフェニル ウレア IV	
33	95.6	7.0	7.0	—	102.6
93	90.3	11.7	12.2	—	102.3
120	77.9	23.7	23.9	—	101.7
180	72.9	30.8	31.1	—	103.9
240	64.7	37.4	37.1	—	101.9
300	58.1	44.6	43.6	—	102.2
400	46.7	55.1	54.9	0.2	101.9
600	34.5	67.2	67.6	0.2	102.1
780	24.6	75.7	76.1	0.3	100.8
1080	14.7	86.2	86.9	0.5	101.7
1500	6.8	94.4	94.8	0.5	101.9
3000	0.5	100.5	100.7	0.6	101.7
					φ : 102.1 %

「—」：検出されず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

4. 加水分解運命試験

(2) 加水分解運命試験 (緩衝液)

(資料 No. 運命-11)

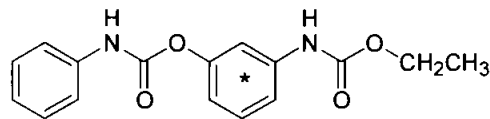
試験機関:

報告年: 2003年 [GLP]

供試化合物:

¹⁴C 標識デスメディファム

比放射能: 871 MBq/mmol (2.89MBq/mg)、放射化学的純度: 98.4% (TLC)



*: 標識位置

非標識デスメディファム (純度: 99.6%)

化学名: エチル=3-フェニルカルバモイルオキシフェニルカルバマート

供試緩衝液: 供試緩衝液の pH として、pH 4, 5, 7 及び 9 を選択した。各緩衝液の組成は次のとおりであった。

pH 4 及び 5: クエン酸一水和物の Milli-Q 水溶液。

pH 7: イミダゾールの Milli-Q 水溶液。

pH 9: ホウ酸ナトリウムの Milli-Q 水溶液。

試験条件: 25±1°C、暗所

試験濃度: 3.5 mg/L

試験系の滅菌: 試験に先立ち、緩衝液、試験容器/器具等を真空蒸気滅菌装置により滅菌処理した。試験系の滅菌性維持は、滅菌したトリプシン大豆ブロスの Milli-Q 水溶液を試験系で培養して確認した。

試験方法: 試験系の容器として、約 30mL 容のガラス製枝付きインピンジャーを使用した。試験系には二酸化炭素を除去した加湿無菌空気を通気し、揮発性物質捕集のためにエチレングリコール次いで 2M 水酸化カリウム溶液の直列した各トラップを取り付けた。

分析試料 (試験緩衝液及び各捕集溶液) の採取時点は、次のとおりであった。各採取時点において、分析試料 (試験緩衝液及び各捕集溶液) をそれぞれ 2 反復採取した。

試料採取時点

試験水 pH	採取時点
4 及び 5	処理直後 (0 時間)、処理後 24、48、96、168、336、504、672、720 時間
7	処理直後 (0 時間)、処理後 0.5、2、4、8、16、24、48、72 時間
9	処理直後 (0 時間)、処理後 1、2、4、8、12、18、24、30 分

分析方法：液体シンチレーションカウンター (LSC) により、採取した分析試料中の放射能を定量した。全ての試験水を ^{14}C -高速液体クロマトグラフィー (HPLC- ^{14}C) を用いて非標識標準品との保持時間を比較により代謝物の同定・定量を行い、一部の試料は高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析 (HPLC-MS/MS) を用いて分析した。

試験結果：

放射能回収率：各緩衝液における放射能回収率(物質収支)を、表 1 (pH 4 及び 5) 並びに表 2 (pH 7 及び 9) に示す。

用いた各 pH 緩衝液では、エチレングリコール捕集液及び水酸化カリウム捕集液中に揮発性物質は認められなかった。

処理した放射能は試験緩衝液から回収され、各 pH 緩衝液及び各採取時点における放射能回収率は 98.8% (pH 9) ~102.6% (pH 4) の範囲にあった。

試料の無菌性：試験試料の給気装置の間にトリプシン大豆ブロスを配置して無菌性の確認を行い。無菌性が確認されている。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

表 1 : pH4 及び 5 緩衝液における放射能回収率

(表中の数値は、処理放射能に対する%)

経過時間 (hr)	pH4 緩衝液				pH5 緩衝液			
	試験水		揮発性物質捕集液		試験水		揮発性物質捕集液	
	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値
処理直後 (0)	103.3	103.3	0.0	0.0	100.4	100.6	0.0	0.0
	103.2		0.0		100.8		0.0	
24	93.3	99.0	0.0	0.0	96.6	93.8	0.0	0.0
	104.6		0.0		90.9		0.0	
48	101.7	102.1	0.0	0.0	101.7	101.4	0.0	0.0
	102.5		0.0		101.1		0.0	
96	102.8	101.8	0.0	0.0	99.6	100.7	0.0	0.0
	100.7		0.0		101.7		0.0	
168	105.6	105.1	0.0	0.0	101.7	102.1	0.0	0.0
	104.6		0.0		102.4		0.0	
336	95.4	99.0	0.0	0.0	101.6	99.9	0.0	0.0
	102.6		0.0		98.1		0.0	
504	103.5	103.9	0.0	0.0	103.8	103.7	0.0	0.0
	104.2		0.0		103.6		0.0	
672	106.7	105.0	0.0	0.0	102.8	102.9	0.0	0.0
	103.3		0.0		102.9		0.0	
720	103.7	104.2	0.0	0.0	107.0	105.7	0.0	0.0
	104.6		0.0		104.3		0.0	
平均値	102.6		0.0		101.2		0.0	

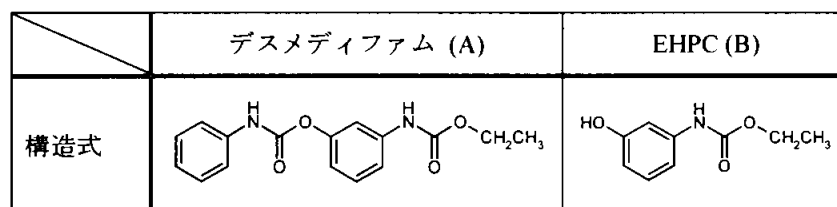
表 2 : pH7 及び 9 緩衝液における放射能回収率

(表中の数値は、処理放射能に対する%)

経過時間 (hr 又は min)	pH7 緩衝液				pH9 緩衝液			
	試験水		揮発性物質捕集液		試験水		揮発性物質捕集液	
	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値
処理直後 (0)	90.0	96.6	0.0	0.0	97.5	99.7	0.0	0.0
	103.1		0.0		101.8		0.0	
1 min					105.7	103.5	0.0	0.0
					101.2		0.0	
2 min					94.2	99.7	0.0	0.0
					105.1		0.0	
4 min					92.8	92.6	0.0	0.0
					92.3		0.0	
8 min					97.9	99.3	0.0	0.0
					100.6		0.0	
12 min					94.8	98.0	0.0	0.0
					101.1		0.0	
18 min					95.2	101.4	0.0	0.0
					107.6		0.0	
24 min					97.9	94.7	0.0	0.0
					91.5		0.0	
0.5 hr (30 min)	102.6	102.1	0.0	0.0	100.3	100.4	0.0	0.0
	101.6		0.0		100.4		0.0	
2 hr	101.5	100.9	0.0	0.0				
	100.2		0.0					
4 hr	102.2	100.5	0.0	0.0				
	98.8		0.0					
8 hr	101.2	101.8	0.0	0.0				
	102.3		0.0					
16 hr	103.2	103.3	0.0	0.0				
	103.4		0.0					
24 hr	103.9	104.0	0.0	0.0				
	104.1		0.0					
48 hr	102.7	101.7	0.0	0.0				
	100.6		0.0					
72 hr	103.8	104.0	0.0	0.0				
	104.1		0.0					
平均値	101.6		0.0		98.8		0.0	

放射性成分の組成 : HPLC-[¹⁴C]による分析の結果、試験緩衝液中の放射性成分としてデスメディファムと 1 種類の加水分解物が認められた。
HPLC-MS/MS による検討の結果、親化合物デスメディファムと代謝物 B:

EHPC の構造が同定された。



放射性成分の量的推移を表 3 (pH4 及び 5) 及び表 4 (pH7 及び 9) に示す。

各 pH において経時的にデスメディファムが減少する一方、分解物 EHPC (B)が増加した。デスメディファム(A)から EHPC (B)への加水分解は、pH 依存性が認められた。即ち酸性領域 (pH4 及び 5) においてデスメディファムの加水分解は緩慢であり、アルカリ性領域では急速であった。

表 3 : pH4 及び 5 緩衝液における放射性成分の量的推移
(表中の数値は、処理放射能に対する%)

経過時間 (hr)	pH4 緩衝液				pH5 緩衝液			
	デスメディファム		EHPC (B)		デスメディファム		EHPC (B)	
	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値
処理直後 (0)	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	100.0		0.0		100.0			
24	100.0	100.0	0.0	0.0	97.1	97.2	2.9	2.8
	100.0		0.0		97.3		2.7	
48	100.0	100.0	0.0	0.0	94.2	94.4	5.8	5.6
	100.0		0.0		94.6		5.4	
96	97.9	98.2	2.1	1.8	90.7	90.9	9.3	9.20
	98.5		1.5		91.0		9.0	
168	97.9	98.2	2.1	1.9	90.9	89.0	9.1	11.1
	98.4		1.6		87.0		13.0	
336	96.7	96.8	3.3	3.3	73.4	74.9	26.6	25.1
	96.8		3.2		76.4		23.6	
504	95.3	95.3	4.7	4.8	69.8	68.6	30.2	31.5
	95.2		4.8		67.3		32.7	
672	92.3	92.1	7.7	7.9	55.2	58.3	44.8	41.8
	91.9		8.1		61.3		38.7	
720	91.3	92.0	8.7	8.1	57.7	59.3	42.3	40.7
	92.6		7.4		60.9		39.1	

表 4 : pH7 及び 9 緩衝液における放射性成分の量的推移

(表中の数値は、処理放射能に対する%)

経過時間 (hr 又は min)	pH7 緩衝液				pH9 緩衝液			
	デスメディファム		EHPC (B)		デスメディファム		EHPC (B)	
	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値	反復値	平均値
処理直後 (0)	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	100.0		0.0		100.0		0.0	
1 min					81.0	80.8	19.0	19.2
					80.6		19.4	
2 min					67.5	68.5	32.5	31.6
					69.4		30.6	
4 min					52.7	51.6	47.3	48.4
					50.5		49.5	
8 min					29.6	30.1	70.4	70.0
					30.5		69.5	
12 min					15.7	15.6	84.3	84.4
					15.5		84.5	
18 min					9.4	9.2	90.6	90.8
					9.0		91.0	
24 min					7.8	7.1	92.2	92.9
					6.4		93.6	
0.5 hr (30 min)	97.3	97.7	2.7	2.4	4.1	4.4	95.9	95.6
	98.0		2.0		4.7		95.3	
2 hr	86.8	87.1	13.2	13.0				
	87.3		12.7					
4 hr	75.7	76.0	24.3	2.4				
	76.3		23.7					
8 hr	61.4	61.2	38.6	38.9				
	60.9		39.1					
16 hr	37.3	37.4	62.7	62.6				
	37.5		62.5					
24 hr	23.1	24.2	76.9	75.8				
	25.3		74.7					
48 hr	5.3	5.6	94.7	94.5				
	5.8		94.2					
72 hr	1.6	1.4	98.4	98.6				
	1.2		98.8					

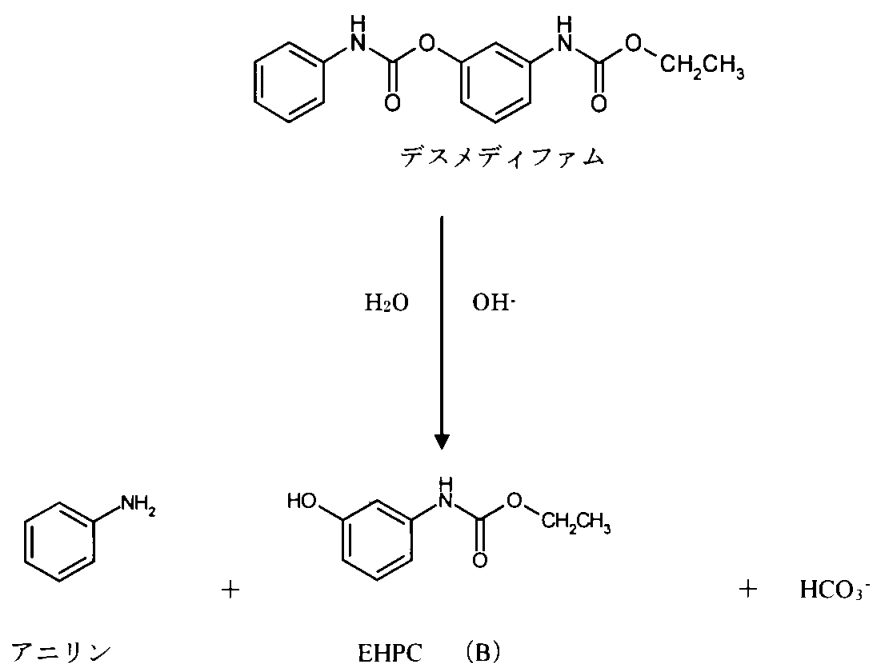
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

加水分解速度：各 pH 緩衝液における一次速度式に従うデスメディファムの DT₅₀及びDT₉₀を、下表に示す。

pH	相関係数	速度定数	DT ₅₀	DT ₉₀
4	-0.9840	0.0028 day ⁻¹	248 日	823 日
5	-0.9893	0.0179 day ⁻¹	39 日	129 日
7	-0.9991	0.0596 hr ⁻¹	12 時間	39 時間
9	-0.9816	0.1047 min ⁻¹	7 分	22 分

デスメディファムの半減期は、pH4 及び 5 においてそれぞれ 248 日及び 39 日、pH7 及び 9 においてはそれぞれ 12 時間及び 7 分であり、アルカリ性領域において極めて急速に分解すると示された。

本試験結果から得られたデスメディファムの加水分解経路図を示す。



5. 水中光分解運命試験

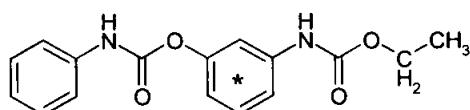
(1) デスメディファムの中での光分解性

(資料No. 運命-12)

試験機関:

報告書作成年: 1994年

供試化合物: デスメディファム標準品 純度: 99.4%



エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

試験方法: EPAの § 795.70 (provisional) ガイドライン及びOECDの試験ガイドライン (案)、Phototransformation of Chemicals in water, 1990」に従い、次の試験条件で試験を行った。

- (1) 光源: キセノンアーク灯 (硼珪酸ガラス製チューブフィルター)
照度:

波長 [nm]	太陽光の照度		本試験の照度 [m Watt/cm ²]
	北緯40度 [m Watt/cm ²]	北緯50度 [m Watt/cm ²]	
290-320	0.29	0.25	0.16
290-400	5.51	5.03	8.63
290-600	37.1	34.5	27.9*

* 外挿値

合成自然水中でデスメディファムが太陽光を吸収する波長範囲290-600nmにおける照度は、自然の太陽光とほぼ同等であった。

- (2) 試験温度: 25°C
 (3) 試験容器: メリーゴーランド型 (DEMA, Bornheim-Roisdorf、ドイツ)、光反応器、反応セル、石英製キュベット、光路幅1cm、テフロン製共栓付
 (4) 試験濃度: 3mg/L (1%アセトニトリル)
 (5) 供試水:

合成自然水: EPAのProvisional Chemical Fate Guidelineに従い調製した合成フミン酸水原液を0.01M酢酸塩緩衝液で1:9 (v/v) に希釈、pH4、吸光度は370nmで0.048。

滅菌緩衝液: 0.01M酢酸塩緩衝液、pH4をオートクレーブで滅菌。

約3mg/Lのデスメディファムを含む0.01M酢酸塩緩衝液（pH4、1%アセトニトリル）、または合成フミン酸水溶液（pH4、1%アセトニトリル）を試験溶液として調製した。各試験液に前述の条件に設定したメリーゴーランド型の光反応器を用い、合成自然水区に対しては0、24、50.4、70.3、144.1、192.0及び240.1時間、また蒸留水区に対しては144.1及び240.1時間、それぞれ人工光源（キセノンアーク灯）からのフィルター透過光（ $\lambda > 290\text{nm}$ ）を照射した後、試験溶液中のデスメディファム濃度の経時変化を測定した。尚、光を照射しないことを除き、光照射区と同じ条件においた暗所対照区を設けた。各試料採取時に光照射溶液及び暗所対照溶液から、それぞれ分析試料を採取しHPLC（可変波長検出器）により分析した。

結果：試料の経時変化の測定を次項に示す。

供試試料中のデスメディファム濃度の消長

供試水	照射時間 [h]	光照射試料		暗所対照試料	
		[mg/L]	[%]	[mg/L]	[%]
合成自然水 pH4	0	2.90	100.0	2.90	100.0
	24.0	2.52	86.9	2.87	99.0
	50.4	2.13	73.4	2.87	99.0
	70.3	1.77	61.0	2.85	98.3
	144.1	1.07	36.9	2.86	98.6
	192.0	0.82	28.3	2.88	99.3
	240.1	0.62	21.4	2.87	99.0
滅菌緩衝液 pH4	0	2.70	100.0	2.70	100.0
	144.1	2.67	98.9	2.71	100.4
	240.1	2.64	97.8	2.69	99.6

デスメディファムの光分解は合成自然水（pH4）にのみ認められた。滅菌緩衝液（pH4）の光照射試料では光分解が認められなかったため、暗反応に対する補正は行わなかった。

以上の測定結果から、濃度の対数値と照射時間の関係は一時速度式に従うことが認められ、合成自然水の半減期及びその95%信頼限界は以下のように求められた。滅菌緩衝液の半減期は求められなかった。

	半減期 (hr)	95%信頼限界 (hr)
合成自然水 pH4	106.6	97.6-115.5

以上の結果、デスメディファムは滅菌緩衝液中ではほとんど光分解されなかったが、合成自然水中では推定半減期が106.6時間（約4～5日）であったことから、自然水中では容易に光分解を受けることが明らかになった。

5. 水中光分解運命試験

(2) 自然水中光分解運命試験

(代謝資料 No. 運命-13)

試験機関：

[GLP対応]

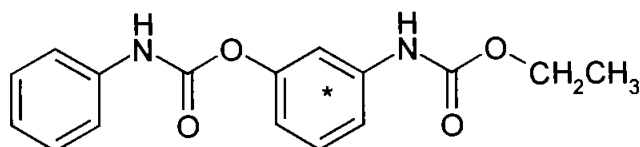
報告書作成年月日：2004年11月5日

供試標識化合物

¹⁴C 標識 デスメデイファム

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシフェニルカルバマート

化学構造：



[*：¹⁴C 標識部位]

比放射能：3.28 MBq/mg、放射化学的純度 >99%

供試水：イギリス エッセックス州の農場の池より2004年3月2日に採取した。
0.22μm のフィルターでろ過し、滅菌して供試した。供試水の特性を下表に示した。

表1 供試水の特性

溶存有機炭素	9.9 mg/L
溶存有機物	17.1 mg/L
総りん	0.2 mg/L
窒素 (ケルダール法)	< 0.05 mg/L
硝酸	3.1 mg/L
総硬度 (炭酸カルシウムとして)	223.0 mg/L
電気伝導度	527 μS/cm
pH	8.2
溶存酸素	
採取時	97% 飽和
滅菌後にエアレーション後	85% 飽和

光源：キセノンランプ (290nm 以下の波長をカットするフィルターを装着)

光強度：57.5 W/m² (300~400 nm)

試験方法：

メタノール 2.19mL に¹⁴C-デスメディファム 2.19mg を溶解し、目標濃度 1mg/mL の保存溶液を調製した。この保存溶液 250 μ L を約 249mL の滅菌自然水を含むメスフラスコに添加し、250mL に定容後、各試験容器へ 18mL ずつ分注した。

各 2 反復の試料を 25 $^{\circ}$ C に設定したサンテスト中で連続照射した。各試料は 0、0.5、1、3、24、48、72 及び 97 時間後に採取した。照射試料では揮発性物質捕集用としてソーダライムとポリエチレン栓からなる捕集管を装着し、水中の放射エネルギーが 98% を下回る 48 時間目以降の試料のみ分析した。

試験条件の要約を表 2 に示した。

表 2 試験条件等

試験期間	97 時間 (太陽光の 30 日に相当)	
試験濃度	設定値	1 mg/L
	測定値	1.01 mg/L - 照射試料 0.97 mg/L - 非照射試料
反復数	72 時間後が 1 反復であるのを除き、その他は 2 反復	
試験用水の調製	容器あたりの水量	18 mL
	滅菌法	ろ過
被験物質の処理	処理方法	自然水に被験物質のメタノール溶液（保存溶液）をピペットを用いて添加
	添加容量	250mL の自然水に対して 250 μ L、各試験容器へ 18mL を分注
	補助溶媒（メタノール）濃度	0.1%
試験容器	約 20mL 容の石英製光分解用容器	
CO ₂ 及び有機揮発物質の捕集	CO ₂ の捕集用としてソーダライム	
容器への被験物質の吸着	吸着なし	
使用機器	フィルターを装着した Heraeus Suntest 装置による連続照射	
試料採取時間	0、0.5、1、3、24、48、72 及び 97 時間 (暗対照試料は 24、72 時間後を除く)	
温度	25 \pm 1 $^{\circ}$ C	
滅菌性	試験期間中滅菌性が保たれていた。	

結果：

(1) 回収率

照射試料における各試料中の放射能分布を表 3 に、暗対照試料における回収率を表 4 に示した。

照射試料における各試料の平均回収率は 90%以上 (90.9~100.0%) で良好であった。暗対照試料における平均回収率も 99.9~103.2%であった。照射試料の揮発性物質捕集管には微量の放射能が認められ、1.3~3.8%であった。

表 3 光照射試料の溶液中及び揮発性物質捕集管における放射能分布

照射時間 (hr)	太陽光 換算日数 ¹⁾	試験溶液中の %		揮発性物質 捕集管中の %		処理放射能に 対する回収率	
		測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値
0	0.00	99.9	100.0	分析せず		99.9	100.0
		100.1				100.1	
0.5	0.15	99.8	100.0	分析せず		99.8	100.0
		100.2				100.2	
1	0.31	101.3	99.8	分析せず		101.3	99.8
		98.3				98.3	
3	0.93	100.5	99.9	分析せず		100.5	99.9
		99.2				99.2	
24	7.41	98.2	98.7	分析せず		98.2	98.7
		99.1				99.1	
48	14.82	93.6	94.3	1.6	1.3	95.2	95.6
		94.9		1.0		95.9	
72	22.23	91.0	91.0	1.6	1.6	92.6	92.6
		-		-		-	
97	29.95	86.6	87.1	4.9	3.8	91.5	90.9
		87.5		2.7		90.3	

(2 反復試料の平均値は申請者が計算、72 時間は 1 試料の値)

1) 東京 春(4月-6月)の太陽光換算日数

表 4 暗対照試料における放射能回収率

採取時間 (hr)	試験溶液中の%	
	測定値	平均値
0	100.0	100.0
	100.0	
0.5	99.3	99.9
	100.4	
1	100.4	100.4
	100.4	
3	100.5	100.6
	100.7	
48	103.3	103.2
	103.0	
97	103.4	103.2
	102.9	

(2 反復試料の平均値は申請者が計算)

(2) 分解物の経時分布

1) 照射試料 (表 5、図 1)

試料溶液中の分解物を HPLC を用いて分析した。親化合物デスメディファムは速やかに減少し、照射 0.5 時間後には 11.3% しか認められず、3 時間後には 1.5%、24 時間後には ND まで減少した。分解物 EHPC は照射 0.5 時間後には 88.6% へ増加し、3 時間後に最大値 96.4% に達した後に減少し、48 時間後には 29.1%、97 時間後には 0.9% となった。

試料溶液中の CO₂ は 24 時間後に 8.8%、48 時間後に 20.5%、72 時間後には 29.7%、97 時間後には 32.3% であった。

その他に、HPLC 分析では 10% を超える分解物として画分 1 及び画分 13 が認められた。画分 1 は 97 時間後に最大値 28.4% であった。HPLC における該当画分を採取し、TLC を用いて更に分画したところ、8 物質が認められ、各物質は 10% を超えないことが確認された。画分 13 は 48~72 時間後に約 15% で最大となり、97 時間後には約 12% に減少した。この画分 13 を LC/MS を用いて分析し、分子量が 123 であることを確認した。試料量が少なく、これ以上の例えば NMR 分析等は行えなかった。

2) 暗対照試料 (表 6)

デスメディファムは暗対照試料においても速やかに減少し、0.5 時間後には 26.2%、1 時間後には 9.0%、3 時間後には 0% となった。分解物は EHPC (B) のみが認められ、0.5 時間後には 73.6%、3 時間後には 100.6% となった。

EHPC は暗条件では安定であるが、光照射により分解することが確認された。

表5 照射試料の試料溶液中における分解物の分布 (処理放射能に対する%)

成分名	キセノンランプ照射時間 () 内は東京春の太陽光換算															
	0 hr (0日)		0.5 hr (0.15日)		1 hr (0.31日)		3 hr (0.93日)		24 hr (7.41日)		48 hr (14.82日)		72 hr (22.23日)		97 hr (29.95日)	
	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値	測定値	平均値
画分1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.5	8.0	18.1	16.4	23.0	23.0	29.3	28.4
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.6	8.0	14.8	16.4	-	23.0	27.6	
CO ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.6	8.8	21.6	20.5	29.7	29.7	33.0	32.3
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.1	8.8	19.5	20.5	-	29.7	31.7	
画分13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.1	1.9	8.4	8.8	15.7	14.8	14.7	14.7	12.5	12.0
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.7	1.9	9.2	8.8	13.9	14.8	-	14.7	11.5	
EHPC	1.0	1.0	89.0	88.6	94.1	91.6	96.8	96.4	75.7	72.9	23.2	29.1	5.4	5.4	ND	0.5
	1.1		88.3		89.1		96.0		70.2		35.1		-		0.9	
デスメデ ィファム	99.0	99.0	10.8	11.3	7.2	8.2	1.6	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	99.0		11.9		9.1		1.5		ND		ND		ND		ND	
その他 ¹⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15.1	13.4	18.2	18.2	11.8	13.8
	ND		ND		ND		ND		ND		11.7		-		15.7	
計		100		100		99.8		99.8		98.6		94.2		91.0		87.0

(2 反復試料の平均値を申請者が計算、72 時間は 1 試料の値)

1) 18 種の成分の合計値。各成分は最大でも 6.7%。

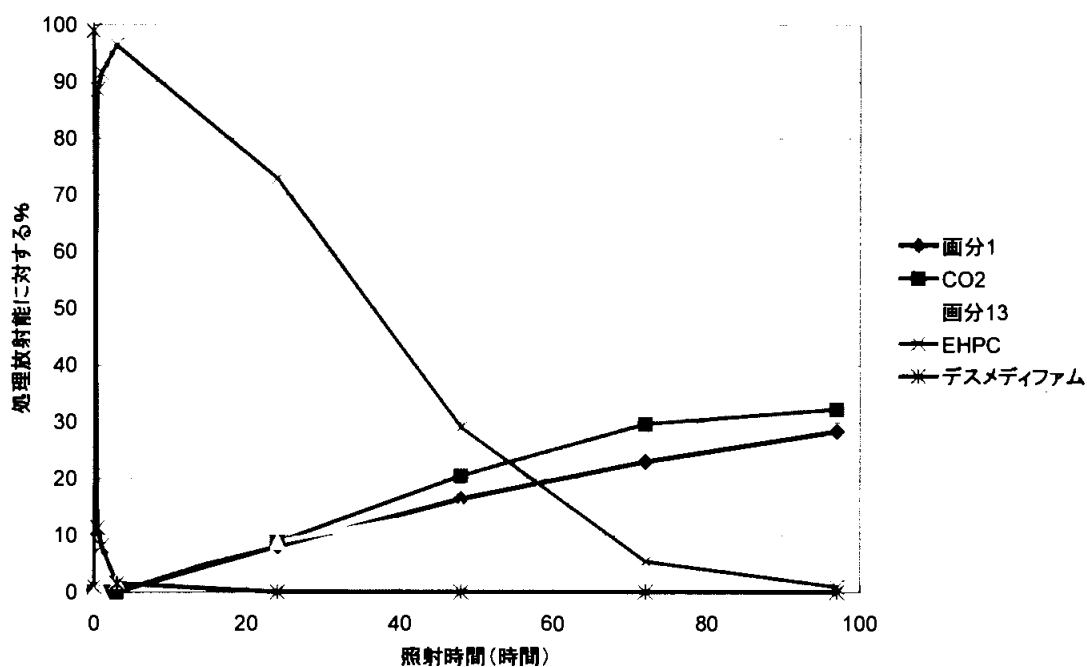


図1 照射試料における分解物の経時的分布 (HPLC 分析)

表6 暗対照試料における分解物の分布 (処理放射能に対する%)

成分名	採取時間 (hr)					
	0	0.5	1	3	48	97
EHPC	1.3	73.6	91.4	100.6	103.3	103.2
デスメディファム	98.8	26.2	9.0	0.0	0.0	0.0

(3) デスメディファム及び EHPC の半減期及び DT90

デスメディファムの自然水中光分解試験における半減期は実験条件下において 0.17 時間、太陽光換算で 0.05 日であった。DT90 は、それぞれ、0.57 時間、0.18 日であった。デスメディファムは暗対照においても速やかな減少を示したが、光照射条件下と比較して、僅かに半減期及び DT90 とも長かった (表 7)。分解物 EHPC の半減期は光照射条件下で 29.8 時間、太陽光換算で 9.2 日であった。DT90 は光照射実験条件下で 99.3 時間、太陽光換算で 30.6 日であった。EHPC は暗条件下では安定であった。

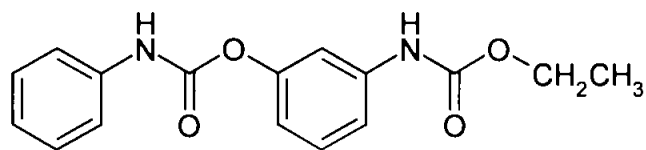
表 7 自然水中光分解におけるデスメディファムの半減期及び DT90

	デスメディファム			
	半減期		DT90	
	光照射 試料	暗対照 試料	光照射 試料	暗対照 試料
連続照射	0.17 時間	0.27 時間	0.57 時間	0.89 時間
北緯 35° 春の太陽光換算	0.05 日	—	0.18 日	—

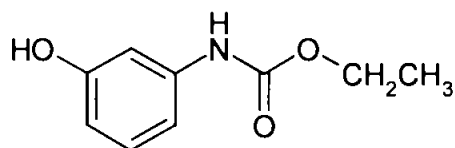
表 8 自然水中光分解における EHPC (B) の半減期及び DT90

	EHPC			
	半減期		DT90	
	光照射 試料	暗対照 試料	光照射 試料	暗対照 試料
連続照射	29.8 時間	安定	99.3 時間	安定
北緯 35° 春の太陽光換算	9.2 日	安定	30.6 日	安定

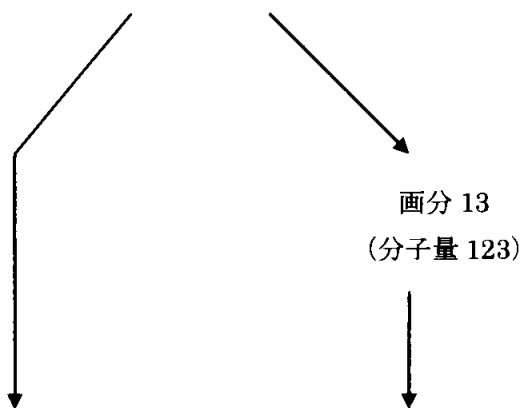
デスメディファムは水中で光が照射される条件においては、まず加水分解により速やかに EHPC (B) へ分解し、EHPC は光によって主に二酸化炭素へ分解することが認められた。推定代謝経路を次頁に示した。



デスメディファム



EHPC (B)



CO₂ 及びその他の少量代謝物

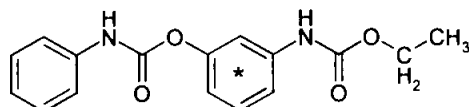
6. 土壌吸着試験

(1) ^{14}C 標識デスメディファムの土壌への吸着 (資料No. 運命-14)

試験機関：

報告書作成年：1994年

供試標識化合物： ^{14}C -アミノフェノキシ標識デスメディファム (AP標識)



* ^{14}C 標識位置

化学名：エチル=3-フェニルカルバモイルオキシカルバニラート

比放射能：65 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：90%以上

供試土壌：次表に示す土壌を用いた。

項目	標準2.1*	標準2.2*	標準2.3*	シェーリング [†] 土壌130
pH	6.6	5.7	5.0	5.9
有機物炭素含量 (%)	0.475	1.930	0.990	1.030
粘土含量 (%) < 2 μm	3.5	7.3	5.9	15.6
シルト (%) 2~20 μm	2.6	6.5	14.1	14.0
細砂 (%) 20~200 μm	23.4	29.0	39.3	42.1
粗砂 (%) 0.2~2mm	70.5	57.2	40.7	28.2
陽イオン交換容量 (mVal)	2.2	7.8	5.0	NA
最大含水量 (g/100g)	24	30	30	NA
土壌型	砂土	壤質壤土	砂壤土	砂壤土

* ドイツ標準土壌 NA: 測定せず

試験方法：0.5mmの篩を通した風乾土壌を共栓付試験管に秤取した。

約1ppmの ^{14}C 標識デスメディファム水溶液を調製し、この溶液100mLを土壌20gに添加し、この土壌スラリーを25°Cで約24時間振盪した。その間、処理後1、2、3、5、8及び24時間に溶液の1部を採取して、放射能の測定を行った。但し、シェーリング土壌については1、2、4、6、8及び25時間に採取した。

次いで、 ^{14}C 標識デスメディファムの安定性を検討するため、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) を行い、展開後X-線用フィルムを用いて、オートラジオグラムを作製した。放射能が分布する位置を削り取り、その後液体シンチレーションカウンターで測定した。

試験結果：結果は次表に示す。

a) 安定性試験

土 壤	デスメディファム平均残存率 (%)					
	1	2	3	5	8	24時間
標準土壌2.1	51.1	35.4	23.9	17.6	7.6	NA
標準土壌2.2	NA	速やかに分解された				
標準土壌2.3	7.2	6.9	8.3	7.7	7.7	5.7
シェリング [®] 土壌130	38.2	38.0	34.8	38.2	NA	32.8

NA：測定せず 反復数n=2あるいは3（数値は申請者が計算）

土壌スラリー中では、デスメディファムはいずれの土壌においても極めて速やかにN-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート (EHPC) に加水分解された。

従って、土壌の吸着プラトーは形成されず、通常のガイドラインによる土壌吸着試験の実施は不可能であった。

b) 分解物EHPCの土壌吸着

24時間以内にシェリング土壌130を除くすべての土壌で、デスメディファムはEHPCに分解された。EHPCの吸着係数を下式から求めた。

$$K_d = C_s / C_l$$

C_s：土壌に吸着されたEHPC

C_l：溶液中のEHPC

土 壤	有機炭素 含量 (%)	C _s μg/g	C _l μg/g	K _f ^{ads}	K _f ^{ads} oc
標準土壌2.1	0.475	1.88	0.71	2.65	558
標準土壌2.2	1.930	2.01	0.18	11.17	579
標準土壌2.3	0.990	1.15	0.71	1.62	164

$$K_{f}^{ads}oc = (K_{f}^{ads} \times 100) / \text{有機炭素含量}$$

上記の結果からデスメディファムは既存のガイドラインによる土壌吸着試験によって土壌吸着係数を求めることはできない。

分解生成物のEHPCの土壌吸着係数は求められ、EHPCは土壌に速やかに吸着することが認められた。

代謝のまとめ

動物：

¹⁴Cの標識位置の異なる2種のデスメディファム（DMP）を用い、下記の方法でラットに経口投与した。

標識位置	投与方法	投与量 (mg/kg)	註
P	単回	5	
		1000	
AP	反復	5	非標識化合物を14日間反復投与した後、標識化合物を単回投与
	単回	5	
AP		1000	
	反復	5	非標識化合物を14日間反復投与した後、標識化合物を単回投与

いずれの試験でも、投与された被験物質は速やかに排泄された。その排泄パターンは低用量を投与した場合には、主要排泄経路は両標識化合物とも尿であり、全回収放射能の約70～90%が尿から排泄された。一方、高用量を投与した場合は、両標識化合物とも糞への排泄量が増え、回収放射能のほぼ半量がそれぞれ糞、尿に排泄された。呼気中への排泄は両標識化合物とも極めて少なかった（0.1%～検出限界以下）。

投与後の組織中の放射能の減衰は、標識化合物の方が標識化合物より速やかであった。標識の低用量群の投与96時間後の組織中残留は、いずれの組織でも検出限界以下となったが、標識化合物では低濃度ながら脳、脳下垂体を除く組織に残留した。経時的に組織内残留を調べる試験は、これらの知見に基づいて標識化合物を用いて行った。低用量群、高用量群とも投与後の組織内の最高残留は、胃腸管を除き、血液、肝臓、腎臓などの組織に認められたが、経時的に速やかに残留濃度は低下し、血漿中の放射能の最終半減期は、低用量群／高用量群とも同様で約40～50時間であった。排泄パターン及び組織内残留分布の試験に供した動物の糞、尿中の代謝物の検討を行った。その結果は以下のように要約される：

- (1) デスメディファムの代謝の第一段階は、2つの環の間のカーバメート結合の加水分解である。
- (2) AP標識化合物の主要代謝物はEHPC(N-(3-ヒドロキシフェニル)エチルカルバマート) (代謝物B) で、糞では遊離の形で、尿では抱合体として存在した。これ以外の代謝物として、3-AAP (3-アセトアミドフェノール) (代謝物F)、3-AP (3-アミノフェノール) (代謝物D) が同定された。
- (3) P標識化合物の糞の主要代謝物はPMC (N-(フェニル)メチルカルバマート) (代謝物I) であり、この代謝物は尿には認められなかった。一方、尿の主要代謝物は4-AAP (4-アセトアミドフェノール) (代謝物G) であり、抱合体として存在した。これら以外にマイナーな代謝物として、4-AP (4-アミノフェノール) (代謝物E) と3-AP (代謝物D)、3-AAP (代謝物F) が検出された。

- (4) 未変化の親化合物は尿中からは検出されなかったが、すべての試験の糞中に認められた。
- (5) 非標識化合物を標識化合物の投与前に14日間事前投与した場合の尿中代謝物に差は認められなかったが、糞中の親化合物が減少しEHPC（代謝物B）の量が増えた。

植 物：

デスメディファムは、世界的に広く上市されているフェンメディファムとその化学構造、生理活性、作用機構が極めて類似している。フェンメディファムのでんさいによる植物代謝は、既に詳細に検討されているので、デスメディファムの植物代謝試験、特に代謝物の構造の推定を含め、一部の試験はフェンメディファムで得られている知見に基づいて推定、実施した。

茎葉部に処理したフェンメディファムは、可食部の根部には移行しないことが認められている。茎葉部に吸収されたデスメディファムは、徐々に代謝／抱合体化され、処理30日後では処理量の約12.4%（有機相10.8%、水相1.6%）が未変化のデスメディファムとして残存していた。また、この時点で微量のEHPC（代謝物B）（約3%）が検出された。

一方、フェンメディファムを用いた試験で、代謝の主たる反応は親化合物及びデスメディファムのEHPCに対応するMHPCの抱合体化であることが知られている。

従って、上記のデスメディファムとEHPC（代謝物B）以外の極性代謝物の構造については、クロマトグラフィー、電気泳動、酸加水分解などの手法でフェンメディファムの代謝パターンとの類似性から、下記のように推定した。

代謝物K：EHPCの糖抱合体、代謝物L：EHPCの糖サルフェート、代謝物M：DMPの糖抱合体、代謝物N：DMPの糖サルフェート

これらの内、K及びMは中間代謝物で、最終的にはそれぞれ糖サルフェートのL及びNに代謝されると考えられる。

また、デスメディファムの二つの芳香族環をそれぞれ標識し、最大圃場処理率（1kg原体/ha：1倍量処理）及び5倍（5kg原体/ha：5倍量処理）ででんさいに処理し、根部/茎葉部における残留放射能の測定及び1倍量処理した処理後7日の茎葉部試料を用いて代謝物の同定を試みた。

この結果、1倍量処理した成熟期（処理後120日）の根部の総放射能残留量は0.011ppm（デスメディファム換算）であった。なお、1倍量処理した成熟期根部の放射能は、不十分であったためにクロマトグラフィーにかけなかった。質量分析等を用いた代謝物の同定により、主要代謝物として代謝物Nが確認された。

1倍量処理後7日の茎葉部では、総放射能残留に対して、デスメディファムが40.4%（0.065ppm）、残渣が38.5%（0.062ppm）を占めた。

また、2種の芳香環を ^{14}C 標識して518g a. s./haあるいは494g a. s./haで6-8葉期のでんさいへ散布処理した試験では、処理15日後及び収穫期（処理63日後）に試料を採取した。収穫期試料における総残留量は茎葉で約1.5-1.9mg/kg、根部で約0.12-0.14mg/kg、抽出率は茎葉で72-85%、根部で29-30%であった。親化合物デスメディファムは生育期の茎葉で主要な残留物約16-32%（約1.8-3.3mg/kg）であったが、収穫期の茎葉及び根部では少量であった。デスメディファム-グルコシドサルフェート（代謝物Q）が主要な代謝物として認められ、生育期茎葉で約40-60%（約4.0-4.2mg/kg）、収穫期茎葉で約32-53%（約0.61-0.79mg/kg）、収穫期根部で7.5-7.8%（0.009-0.011mg/kg）であった。

土 壤：

デスメディファムを砂土及び壤質砂土に混入し、好気条件下で15°C及び25°Cでインキュベートした。炭酸ガスの発生は、いずれの土壤においても15°C条件に比べ25°Cの方が速やかであった。15°C及び25°Cにおける砂土での炭酸ガス発生は、処理後7日まで各々1.0%及び4.2%であり、処理後60日で各々13.2%及び18.8%であった。壤質砂土では処理後7日で各々1.2%及び3.6%であり、処理後59日で各々11.4%及び15.8%であった。

いずれの濃度条件下及び供試土壤においても、水相及び有機溶媒抽出画分中放射能は時間経過と共に減少する一方、残渣（土壤結合）中放射能は時間と共に増加した。

次いで、水相及び有機溶媒抽出画分中放射能について分離・同定した。その結果、温度条件による本質的な代謝の差はなく、EHPC（代謝物B）及びより極性の強い未同定化合物（原点付近）になるものと推定された。

砂土における15°C及び25°C条件下における半減期は、各々12.4日及び5.5日と計算された。一方、EHPC（代謝物B）が最高濃度に到達した後、半減するまでの期間は、各々21日及び9日と計算された。また、壤質砂土におけるデスメディファムの15°C及び25°C条件下における半減期は、各々20.5日及び8.3日と計算され、EHPC（代謝物B）の場合前者と同様に計算すると、各々27日及び21日であった。

嫌気条件下におけるデスメディファムの分解を壤質砂土を用いて、24°Cで実施した。本試験では、動物代謝試験の場合と同様、 ^{14}C 標識位置の異なる2種の標識化合物を用いた。嫌気条件下においても好気条件の場合と同様、デスメディファムは速やかに分解され、水相及び有機溶媒抽出画分中放射能は、暫時減少する一方、残渣及びフミン酸+フルボ酸画分への放射能の移行が進行し、処理後145日には残留放射能はP標識化合物では53.8%及びAP標識化合物では56.3%に達した。検出・同定された化合物は、親化合物、EHPC（代謝物B）、1,3-ジフェニル尿素（代謝物J）及びN-フェニルエチルカルバマート（代謝物H）であり、このうち主要代謝物はEHPC（代謝物B）であろうと推定された。壤質砂土の嫌気条件下におけるデスメディファムの消長を2-コンパートメントモデルに適合させ、半減期を算出した。この実験結果に最も適合すると考

えられる半減期は4.3日と求められた。

水中運命：

デスメディファムの加水分解運命を22℃ (pH 5, 7, 9)、または25℃ (pH 4, 5, 7, 9) で試験した。半減期はpH 4で248日、pH 5で39日～約70日、pH 7で12時間～約20時間、pH 9で7分～約10分であり、pHの上昇にもとまって速やかに分解した。主要代謝物として、EHPC (B) 及びアニリン (O) が認められた。

水中光分解試験を滅菌緩衝液 (pH 4) 及び緩衝液にフミン酸を添加して調製した人工自然水 (pH 4) 及び池水 (pH 8.2) を用いて実施した。デスメディファムは光照射条件下においても滅菌緩衝液 (pH4) では安定であったが、フミン酸を添加した人工自然水では光分解し、半減期は約107時間であった。池水を用いた試験においては、暗対象試料における半減期が0.27時間 (約16分) であったのに対して、光照射試料では0.17時間 (約10分) (東京換算では1.2日) であり、光による分解が認められた。

代謝分解の概要

(% : 投与放射能に対する百分率)

供試条件		代謝物																	排泄計	総回収率							
標識、用量 投与方法	性	親 (A)	EHPC (B)	3-AP (D)	4-AP (E)	3-AAP (F)	4-AAP (G)	PEC (H)	PMC (I)	DPU (J)	(K)	(L)	(M)	(N)	(P)	(Q)	(R)	(S)			未知物質			極性 物質	炭酸 ガス		
																			U1	U2	U3						
動物 (ラット)	AP : 5mg/kg 単回	♂	尿	62.3			8.28														4.81			91.48	99.41		
		糞	0.92	2.33			0.47																	7.51			
	♀	尿		65.8			10.9															6.67			90.5	99.61	
		糞	0.92	2.99			0.42																		8.8		
	AP : 1000mg/kg 単回	♂	尿		24.32	1.81		8.44														0.67	4.24	1.55	0.92	48.71	99.76
		糞	38.35	11.73			0.1																			50.65	
	♀	尿		30.6	2.16		7.43															0.5	2.34	2.07	0.72	50.77	101.81
		糞	34.25	13.21			0.05																			50.66	
	AP : 5mg/kg 反復	♂	尿		67.77			7.47														6.21				91.9	101.4
		糞	0.81	4.05	0.06		0.06															0.39	0.77		0.23	9.29	
	♀	尿		65.71			12.41																7.89			95.33	101.06
		糞	0.81	2.2	0.07		0.03															0.25	0.33		0.03	0.46	
P : 1000mg/kg 単回	♂	尿			1.55	1.39	0.76	10.36																3.4	35.68	94.96	
	糞	29.01							23.18															1.68	55.65		
♀	尿			0.75	0.99	1.33	11.63																	8.87	37.87	97.57	
	糞	31.47								18.2														2.13	56.25		
P : 5mg/kg 反復	♂	尿					67.62																	1.66	83.95	98.41	
	糞	1.97		0.09	0.1	0.01	0.57		2.80															0.68	12.55		
♀	尿						52.56																	5.64	73.68	97.29	
	糞	3.06		0.48	0.02	0.22	0.52		2.64															1.6	20.08		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

供試条件		代謝物																	結合	合計	回収率		
標識、用量、投与方法		親(A)	EHPC(B)	3-AP(D)	4-AP(E)	3-AAP(F)	4-AAP(G)	PEC(H)	PMC(I)	DPU(J)	(K)	(L)	(M)	(N)	(P)	(Q)	(R)	(S)				未知物質	
植物 (てんさい)	AP: 茎葉部	4日後	64.05	0.16								2.5	11.5	0.54	—					7.14	12.1	97.99	
		7日後	48.58	0.17								4.0	15.12	0.63	1.60					6.79	15.8	92.7	
		15日後	26.55	—								4.19	24.45	1.25	8.12					6.23	17.3	88.1	
		30日後	12.74	3.32								2.19	15.87	3.5	7.64					15.21	22.1	82.57	
	P 及び AP		下記記載の上段: 総放射能残留に対する百分率、下段: 組織内濃度 (ppm, デスメディウム換算値)																				
	1 kg原体/ha	茎葉部	120日後	40.4																	3.3 (親抱合体)	38.5	97.7
			0.065																		0.005 (同上)	0.062	0.157
		根部	放射能が不十分であったため、クロマトグラフィー分析せず。																			—	
	P	茎葉部	63日後	1.4													3.9	52.5			16.6	19.7	100.0
		根部	1.4													2.0	7.5			41.7	47.5	100.0	
AP	茎葉部	63日後	1.9								1.4	8.0			2.5	31.9	8.0	29.1 (B)との 含量	12.0	5.5	100.0		
	根部										1.2					7.8	3.8	2.2	33.3	45.6	100.0		

代謝物K: EHPC (代謝物B) の糖抱合体
 代謝物L: EHPC (代謝物B) の糖サルフェート
 *: 表面洗浄液

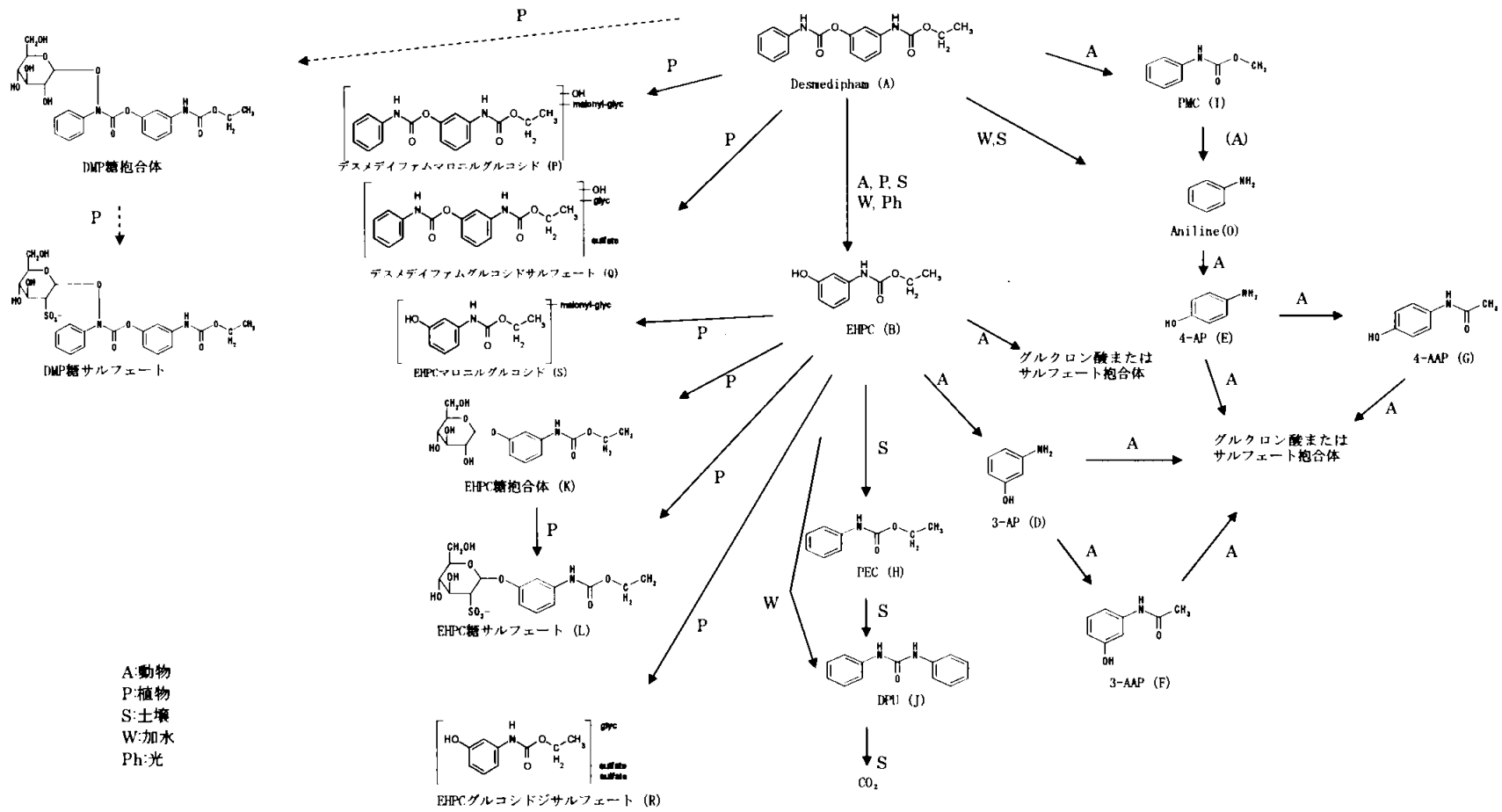
代謝物M: 親化合物の糖抱合体
 代謝物N: 親化合物の糖サルフェート

供試条件		代謝物																	極性物質	炭酸ガス	総回収率			
標識、用量、投与方法		親(A)	EHPC(B)	3-AP(D)	4-AP(E)	3-AAP(F)	4-AAP(G)	PEC(H)	PMC(I)	DPU(J)	(K)	(L)	(M)	(N)	(P)	(Q)	(R)	(S)				未知物質		
土	AP: 砂土 好気条件	15°C	30日後	15.1	4.5															1.5	5.5	8.4	78.7	
			60日後	4.8	1.3																1.2	4.7	13.2	74.3
		25°C	30日後	2.7	1.6																0.6	4.1	14	68.9
			60日後	1.4	0.7																1.2	3.1	18.8	72.4
	AP: 壤質砂土 好気条件	15°C	44日後	19.0	3.1																3.5	4.1	9.3	89.4
			90日後	4.8	1.4																1.3	2.2	14.3	88.0
25°C		44日後	2.9	1.5																0.5	1	16.4	86.9	
		90日後	1.2	1.1																0.4	1.2	19.2	87.4	
P: 壤質砂土 嫌気条件	80日後	4.6																		6.1	1.8	1.1	57.1	
	145日後	1.9																		4.7	0.9	2.4	70.7	
AP: 壤質砂土 嫌気条件	80日後	4.6	5.9																	1.9	1.5	<0.1	65.4	
	145日後	1.6	6.0																	1.7	1.7	<0.1	68.3	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

代謝分解物			親 (A)	EHPC (B)	DPU (J)	アミン (O)	合計	
水中	加水							
		pH 9	300秒	58.1 ¹⁾	43.6 ¹⁾	- ¹⁾	44.6 ¹⁾	102.2
	分解		3000秒	0.5 ¹⁾	100.7 ¹⁾	0.6 ¹⁾	100.5 ¹⁾	101.7
		pH 4	720時間	92.0	8.1			100.1
		pH 5	720時間	59.3	40.7			100.0
		pH 7	8時間	61.2	38.9			100.1
			72時間	1.4	98.6			100.0
		pH 9	4分	51.6	48.4			100.0
			30分	4.4	95.6			100.0
	水中光 (自然水)	pH 8.2	0.5時間	11.3	88.6			99.9

1) モル%で表示



デスメディファムの想定代謝経路

[附] デスメディファムの開発年表

	1980	1985	1990	1995
化合物選抜	1967年終了			
物理的・化学的性質	_____			
魚介類・鳥類 に及ぼす影響	_____			
農薬残留量			_____	
効果試験			_____	
毒性		_____	_____	
代謝・分解		_____	_____	_____
製造	1970年合成研究			
	開始			