

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。

(3) ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間免疫毒性試験

(資料 No. 参考-3)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体純度:

供試動物: Rj: WI(IOPS HAN)系 Wistar 雌ラット、1 群各 10 匹

投与開始時 約 7 週齢、体重 176~209g

投与方法: 検体を 0(対照群)、20、100 および 500ppm の濃度で飼料に混入し 28 日間にわたり随時摂食させた。

陽性対照群にはシクロホスファミドを滅菌水に溶解して 3.5mg/kg/日で 28 日間強制経口投与した。投与液量は 5mL/kg とした。

動物種、性、用量の選択根拠: ラット用いた 28 日間混餌投与毒性試験(資料 参考-2)において、2500 および 500ppm 群雌の脾重量に統計学的に有意な低下が認められた。一方同試験における雄ラットおよびマウスを用いた 28 日間の混餌投与試験(資料 No. 原体-11 の予備試験)における雌雄マウスではともに対照群と同等であった。これらのことから雌を選択し、用量は 28 日間混餌投与毒性試験に基づいて設定した。

観察・検査項目及び結果:

一般症状及び死亡率; 全動物について毎日 2 回(週末および休日は 1 回)、死亡および瀕死状態について確認し、一般状態については少なくとも毎日 1 回記録した。詳細な身体検査は少なくとも週 1 回実施した。

検体投与またはシクロホスファミド投与に起因した一般症状および死亡はいずれの群でも認められなかった。

体重; 全動物の体重を、投与前、投与開始日、投与期間中週 1 回、および剖検前に測定した。

500ppm 群では、試験期間を通じて体重増加量が対照群を上回り、1 週目 ($p \leq 0.05$, Dunnett test) と 3 週目 ($p \leq 0.01$, Dunnett test) は統計学的に有意であった。試験終了時には対照群と比較して、平均体重が 8.5% ($p \leq 0.05$, Dunnett test) 高く、全

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。

体を通した体重増加量が 32% ($p \leq 0.01$, Dunnett test) 高かった。100 および 20ppm 群、並びにシクロホスファミド投与群では投与による体重への影響は認められなかった。

摂餌量； 全動物の摂餌量を毎週測定した。

いずれの検体投与群並びにシクロホスファミド投与群においても、投与による摂餌量への影響は認められなかった。

検体摂取量； 投与期間中における平均検体摂取量は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量

用量 (ppm)	20	100	500
検体摂取量 (mg/kg/日)	1.6	8.4	41.2

免疫毒性； 投与 25 日後に、羊赤血球 (SRBC) の PBS 溶液 (5×10^8 細胞/mL) を 0.5mL/動物の用量で全動物に静注し、免疫性を付与した。SRBC 投与 4 日後 (最終屠殺) に、全動物の眼窩後静脈叢から採血し、血清を得た。血清中の SRBC 特異的 IgM を ELISA 法により測定した。

各群における SRBC 特異的 IgM 濃度を表 2 に示す。

SRBC 特異的 IgM 濃度は、個体別の変動が対照群、検体処理群共に大きかったものの対照群の平均濃度は高く、試験動物の SRBC に対する感受性が確認された。

検体処理群では 500ppm 群において、対照群と比較して統計学的に有意差はないものの SRBC 特異的 IgM 濃度の低下傾向が認められた。しかしながら、剖検および臓器重量の項に示すように、免疫系の主な標的臓器である脾臓および胸腺において肉眼的病理所見および臓器重量に投与による変化が認められなかった。また、以下に示すようにエチプロールを混餌投与した他の毒性試験において、500ppm 群では有意な毒性学的所見が観察されている。これらのことから、500ppm 群における SRBC 特異的 IgM 濃度の低下は全身毒性による二次的な影響と考えられ、一次的に免疫毒性に影響した証拠は見いだせなかった。

28 日間混餌投与毒性試験 (資料 参考-2) において、500ppm 群では雌にコレステロール、トリグリセリドおよび総タンパクの増加が認められ、雌雄に TSH の増加、肝細胞肥大および甲状腺濾胞細胞肥大に関連した肝臓および甲状腺重量の有意な増加が観察された。また、90 日間反復経口投与毒性試験 (資料 原体-7) にお

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

いても、500ppm 群では雌雄に総タンパク、コレステロール、カルシウムの増加、
肝臓および甲状腺の病理所見を伴う重量の増加が認められている。

100 および 20ppm 群では投与に関連する変化は認められなかった。一方、シクロホスファミドは顕著に SRBC 特異的 IgM 濃度を低下させた。

表 2 平均 SRBC 特異的 IgM 濃度 (u/mL)

対照群	検体 20 ppm	検体 100 ppm	検体 500 ppm	シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
6789 (±6527)	5625 (±5230)	9131 (±13045)	2536 (±1706)	343** (±187)

** : p<0.01 (Mann-Whitney U-test)

() 内は SD

剖検および臓器重量；投与 29 日後に、全動物について剖検を行った。脾臓および胸腺重量を測定し、対体重比を算出した。

いずれの検体投与群においても、検体投与による脾臓および胸腺重量に対する影響は認められなかった。

一方、シクロホスファミドは脾臓および胸腺重量を有意に低下させた。

表 3 臓器重量

試験群	検体 20 ppm	検体 100 ppm	検体 500 ppm	シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
最終体重				
脾臓	実重量			66**
	対体重比			65**
胸腺	実重量			72**
	対体重比			71**

** : p<0.01 (T-test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

脾臓および胸腺で認められた肉眼的変化を次表に示す。

検体投与群において、投与に関連した変化は認められなかった。

一方、シクロホスファミド投与群では、脾臓および胸腺の萎縮/小型化が多くの動物

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。

で認められた。

表 4 脾臓および胸腺における肉眼的変化

試験群		対照群	検体 20 ppm	検体 100 ppm	検体 500 ppm	シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
検査動物数		10	10	10	10	10
脾臓	萎縮/小型化	0	0	0	0	5*
胸腺	萎縮/小型化	0	0	0	1	4*

* : $p < 0.05$ (Fisher's exact test、申請者の計算による)

以上の結果から、500ppm 群において、体重増加が認められ、全身毒性による二次的な影響と考えられる IgM 濃度の低下が認められたことから、無毒性量は 100 ppm (8.4 mg/kg/日)と判断された。

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

(4) ウサギを用いた強制経口投与による急性毒性試験 ()
(資料 No. 参考-4)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：2011 年 -

試験目的：

検体純度：

供試動物：Cr1:KBL (NZW) 系ウサギ、各投与群雌各30匹 (15匹づつ第1群と第2群に分けた)。

体重：雌 3.1~3.9g

観察期間：14日間

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ投与前日から絶食させた動物に0.85、
1.5および3.0mg/kg/日の投与量で単回強制経口投与した。第1群は投与後24時間に、
第2群は14日後に屠殺した。

用量設定根拠：

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；生死を毎日2回観察した。一般症状については、第1群は試験1及び2日に、
第2群は試験期間を通して、少なくとも1日1回記録した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。

試験開始時に対照群を含めた3匹に糞量の減少が見られたほか、一般状態の変化は試験期間を通して認められなかった。

体重変化；全動物を対象に投与直前、第2群については投与後は2日に1回測定した。さらに剖検前にも測定した。

いずれの投与群においても投与による影響は認められなかった。

摂餌量；第2群を対象に2日に1回測定した。

いずれの投与群においても投与による影響は認められなかった。

剖 検；第1群および第2群ともに各投与群10匹を対象に剖検を実施した。

臓器重量；最終体重を測定し、

第1群では、統計学的有意差はないものの3.0および1.5mg/kg群において の実重量および対体重比ともにやや増加（10~14%）したが、関連した病理組織学的所見が認められず、 にも変化が認められなかったことから、投与による影響とは考えられなかった。第2群では投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理所見； を検査した。

いずれの投与群においても投与による変化は認められなかった。

病理組織学的検査； について、10%中性緩衝ホルマリン中に固定し、パラフィン包埋後、切片を作製しH&Eで染色した。

認められた変化は、偶発的なものであり、投与に関連したものではないと考えられた。

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

以上の結果、すべての用量群において、体重、摂餌量および

に投与による変化が認められなかったことから、無毒性量は 3 mg/kg/日と判断された。

IX. 動植物および土壌等における代謝分解

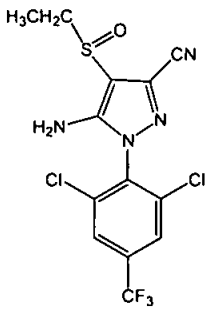
<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動植物	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
代1 (GLP)	動物体内 運命 (吸収、排泄 分布、代謝)	ラット 1群雌雄 各5匹 (分布試験 では、 各12匹)	高用量群: 1000mg/kg 低用量群: 5mg/kg -高用量単回経口投与 -低用量単回経口投与 -低用量反復経口投与	<p>低用量群において投与されたエチプロールは速やかに吸収され、投与168時間後には体内よりほぼ完全に排泄された。</p> <p>主排泄経路は雌雄とも糞中であった。</p> <p>胆汁排泄試験において主排泄経路は胆汁中であつたことから、糞中放射能の大部分は胆汁を介したものであつた。また胆汁排泄されたものの再吸収 (腸肝循環) も認められた。</p> <p>高用量群においても主排泄経路は糞中であつたが、その大部分は未吸収のエチプロールであつた。</p> <p>低用量群において投与後8時間で血中濃度がピークに達した。高用量群ではやや遅れて24~48時間後であつた。また高用量群は低用量群に対してAUC_(0-∞)が比例していないことから吸収の飽和が考えられた。</p> <p>体内に吸収されたエチプロールは臓器および組織中に広く分布し、特に腎臓、肝臓、甲状腺および皮膚・被毛において他と比べてやや高い放射能を認めた。</p> <p>吸収されたエチプロールは一次代謝として酸化、還元および加水分解を受け、更に高次代謝により広範に代謝された。試験期間中5%以上生成された代謝物としては以下のものが認められた。</p>	(1999年)	代-9
代2 (GLP)	植物体内 運命	稲 温室栽培	670g/ha相当量を2回に分けて茎葉散布処理	<p>収穫時の玄米中には総放射能 (TRR) の1.3%が残留した。濃度としては0.15ppmであつた。このうち約87%が抽出され、約6.7%が抽出残渣中に認められた。</p> <p>玄米における主残留放射能は未変化エチプロール (TRRの66.7%) およびであつた。</p>	(2000年)	代-23

資料 No.	試験の種類	供試動植物	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
代3 (GLP)	植物体内 運命	綿 野外栽培	670g/ha相当量を2回に分けて茎葉散布処理	収穫時の綿実中には総放射能 (TRR) の0.2%が残留した。濃度としては0.07ppmであった。このうち63.6%が抽出され、11.4%が抽出残渣中に認められた。 綿実における主残留放射能は であった。未変化は、それぞれTRRの1.4%およびであった。また1倍処理区の綿実中には、他の供試植物あるいはラット中に認められない2種の代謝物が認められたが生成量は僅か () であった (10倍処理区試料中には認められない)。	(2000年)	代-30
代4 (GLP)	植物体内 運命	ピーマン 温室栽培	670g/ha相当量を2回に分けて茎葉散布処理	完熟果実中には、試験期間を通じて総放射能 (TRR) の約0.4%が残留した。濃度としては平均で0.437ppmであった。このうち平均約95%が抽出され、約2.0%が抽出残渣中に認められた。 最終収穫時の完熟果実における主残留放射能は未変化エチプロール (TRRの60.0%) およびであった。	(1999年)	代-41
代9 (GLP)	植物体内 運命	稲 温室栽培	600g/ha相当量を2回に分けて田面水に湛水処理	田面水に処理されたエチプロールは根より浸透移行し、各部に分布した。玄米における濃度は0.280ppmで稲わらの23.97ppmに比べ低かった。玄米では総放射能の93.1%が抽出され、6.9%が残渣に認められた。 全ての分析部位において主残留放射能は未変化エチプロール (TRRの42.2～62.3%) であった。主要代謝物は 。が稲わら及びもみ殻で認められたが、玄米からは検出されなかった。	(2004年)	代-50
代5 (GLP)	土壌中運命	好氣的 湛水条件 砂壤土	420g/ha相当量を田面水に処理	本条件下でエチプロールは速やかに分解した。DT ₅₀ は5日またDT ₉₀ は16日であった。 主要代謝物はであり、最大で処理放射能の80.0%を占めた。またも試験終了時に認められた。	(1999年)	代-57

資料 No.	試験の種類	供試動植物	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
代6 (GLP)	土壌中運命	好気条件 シルト質 壤土 および 砂壤土	600g/ha相当量を 処理	本条件下でエチプロールは比較的速やかに分解した。DT ₅₀ はシルト質壤土で71日、砂壤土で30日 またDT ₉₀ はシルト質壤土で235日、砂壤土で100日であった。 処理放射能の10%を超える代謝物は であった。但し 砂壤土において	(1999年)	代-63
代7 (GLP)	土壌中運命	嫌気条件 壤土	590g/ha相当量を 処理	本条件下でエチプロールは速やかに分解した。 DT ₅₀ は11日、DT ₉₀ は38日であった。 主代謝物は であり最大で、処理放射能の が1時点でのみ 認められた。	(1999年)	代-70
代8 (GLP)	代謝物 の土壌中運命	嫌気条件 砂壤土	600g/ha相当量を 処理	本条件下で は緩やかに分解した。 1年間の試験期間中にDT ₅₀ は認められず推定値として535日であった。 主代謝物は であり、その他には極少量の 未同定代謝物が認められたのみであった。	(2001年)	代-75
環1 (GLP)	加水分解 (EPA農薬評価ガイドラインに準拠)	pH4, 5, 7 及び9の 緩衝液	設定濃度: 3.0mg/L 試験温度: 25℃	pH9の緩衝液中でのみ有意な分解が認められた。 pH9における半減期は121日であった。 処理放射能の10%を超えた分解物は であった。	(1998年)	代-80
環2 (GLP)	水中光分解 (EPA, EU及びSETACガイドラインに準拠)	緩衝液 (pH5)	設定濃度: 3.03mg/L 試験温度: 25℃ 光源: キリンフ (1000W) 光強度: 730W/m ² (290~800nm)	光照射区においてエチプロールは速やかに分解した。半減期は、北緯35°における春期太陽光換算で2.0日であった。 暗対照区においては有意な分解は認められなかった。 主要分解物は であった。	(2000年)	代-83
環3 (GLP)	水中光分解 (農林水産省「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」に準拠)	自然水	設定濃度: 4.354mg/L 試験温度: 25℃ 光源: キリンフ (1800W) 光強度: 765W/m ² (300~800nm)	光照射区においてエチプロールは速やかに分解した。半減期は、北緯35°における春期太陽光換算で1.3日であった。 暗対照区においては有意な分解は認められなかった。 主要分解物はR]であった。	(2002年)	代-86
環4 (GLP)	土壌吸着 (OECDテストガイドライン#106に準拠)	非火山灰 土壌: 3種 火山灰土壌 : 1種	試験温度: 25℃	本試験供試土壌において、エチプロールの土壌吸着性はK _{oc} が53.9~158とやや低いものであった。	(2002年)	代-90
環5 (GLP)	生物濃縮性 (OECDテストガイドライン#305に準拠)	ゼブラダニ オ	0.01、0.1mg/L 半止水式 6日間取り込み 4日間排泄	濃縮係数 BCF _k 8.92(0.01mg/L)、10.24(0.1mg/L) BCF _{ss} 9.71(0.01mg/L)、9.34(0.1mg/L)	(2004年)	代-92

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。
 <代謝分解物一覧表>

記号	由来	名称 (略称)	化学名	構造式
A	親化合物	エチプロール (RPA107382)	5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ- <i>p</i> -トリル)-4-エチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル	

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。

記号	由来	名称（略称）	化学名	構造式

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。

記号	由来	名称（略称）	化学名	構造式

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。

記号	由来	名称（略称）	化学名	構造式

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。

記号	由来	名称（略称）	化学名	構造式

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。

1. 動物体内運命に関する試験

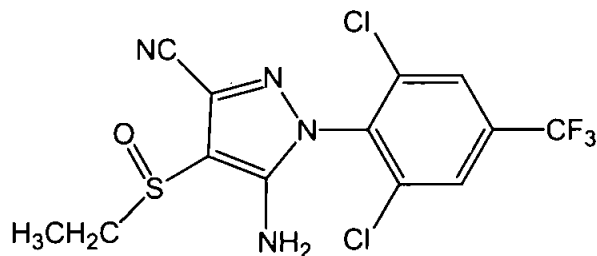
^{14}C 標識エチプロールを用いたラット体内における代謝試験 (資料 代1)

試験機関:

報告書作成年: 1999年 [GLP 対応]

供試標識化合物:

構造式:



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名: 5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能:

放射化学的純度:

供試非標識化合物:

純度: (以下非標識エチプロール)

標識位置の設定理由:

供試動物: SD系ラット、一群雌雄各5匹、ただし組織内分布試験に関しては各12匹
予備試験では各2匹 (体重151~355g)

試験方法:

投与: ^{14}C 標識あるいは非標識エチプロールを0.05% w/w または0.5% w/w メチルセロース水溶液に懸濁して調製し、強制経口投与した。単回投与群 (^{14}C 標識エチプロール) の投与量は、高用量群では1000mg/kg、低用量群では5mg/kg とした。

反復投与群では、非標識エチプロールを14日間連続投与 (5mg/kg) 後、 ^{14}C 標識エチプロールを単回投与 (5mg/kg) した。

投与量の設定根拠:

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。

試験群・試験項目構成；

試験	投与量 (mg/kg)	投与回数	動物数	試料採取
予備試験	5	単回経口	雌雄 各2匹	尿、糞：投与後24時間ごとに168時間まで採取。 呼気：投与後24時間ごとに48時間まで採取。
吸収・分布 代謝・排泄 (ADME試験)	5 1000 5	単回経口 単回経口 反復経口*	雌雄 各5匹	尿：投与6、12、24時間後、以降24時間ごとに 168時間まで採取。 糞：投与12、24時間後、以降24時間ごとに168時間 まで採取。 投与7日後に屠殺し、臓器、組織試料を採取。
薬物動態	5 1000	単回経口 単回経口	雌雄 各5匹	血液：投与0.5、1、2、4、6、8、24、48、72、96、120 および144時間 投与7日後に屠殺し、血液試料を採取。
組織内 分布	5 1000	単回経口 単回経口	雌雄 各12匹	低用量投与群は8(Tmax)、24および48時間後、 高用量投与群は48(Tmax)、72および96時間後に 屠殺し、臓器、組織および体液試料を採取。
胆汁排泄	5 1000	単回経口 単回経口	雌雄 各6匹**	尿、胆汁：投与6、12、24時間後、以降24時間ごとに 96時間まで採取。 糞：投与12および24時間後、以降24時間ごとに 96時間まで採取。

*：反復投与：非標識化合物を14日間連続投与後、¹⁴C標識化合物を一回投与

**：6匹の動物が96時間まで生存した場合は5匹の動物の結果のみ報告。

試料の放射能測定；

液体試料-尿、胆汁、血漿及びケージ洗液は、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。全血はサンプルオキシダイザーで燃焼し、発生した¹⁴C₂O₂を測定した。糞試料は、水またはアセトン(胆管カニキュレーションの高投与群)でホモジナイズして燃焼分析した。組織は、直接ホモジナイズし燃焼分析した。甲状腺、卵巣および副腎は、直接燃焼分析した。カーカスは、細かく切った後ワーリング・ブレンダーでホモジナイズして燃焼分析した。

代謝物の単離・同定；

尿、糞、胆汁は、性・時間別に分析に供した。HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより代謝物を同定し、さらに質量分析(LC-MS)により確認した。尿および胆汁については、別途酵素(β-グルクロニダーゼ)による脱抱合化処理後、アグリコンの特定のためのHPLC分析を行った。

結果：

1) 予備試験

試験終了時(168時間後)の総放射能の平均回収率は雌雄とも約90%であった。主な排泄経路は糞中であり、雄で68.9%、雌で49.2%であった。尿中排泄は雄で20.7%、雌で38.3%であった。

呼気中への排泄は僅かであり48時間後までにおいて0.1%未満であった。また試験終了時のカーカス中における残留率は投与量の1%未満であった。

2) 吸収・排泄

①排泄

ADME 試験

予備試験より、呼気中への排泄は 0.1%未満と少なかったため、本試験で呼気の分析は行わなかった。

投与された放射能の主排泄経路は、低・高用量群ともに糞中であつた。

投与放射能の糞中及び尿中排泄率（168 時間後）は、次の通りであつた。

投与群	糞中排泄		尿中排泄	
	雄	雌	雄	雌
低用量単回経口	67.3%	54.9%	23.5%	36.4%
高用量単回経口	88.4%	87.5%	2.96%	5.13%
低用量反復経口	70.7%	55.5%	22.5%	35.1%

低用量群において、雌動物における尿中排泄の割合が雄に比べやや高かつた。これは反復試験においても同様に認められた。

また反復投与試験の結果、カーカスに残存した放射能レベルは全動物において 0.8%未満と僅かであり、単回投与群とも同等であつたことから被検物質の蓄積は起きなかつた事が示唆された。

ADME 試験における投与放射能の経時的排泄パターンを表 1 に示した。

表 1-1 投与放射能の排泄/単回投与群 (投与放射能に対する割合%として表示)

	時間	尿		糞		ケージ洗液		カーカス		合計	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
低用量 単回 経口 投与 5mg/kg	0~6	3.18	4.32							3.18	4.32
	0~12	8.78	11.2	4.07	4.97	0.36	0.89			13.2	17.1
	0~24	16.9	24.6	38.8	28.2	0.90	1.79			56.6	54.6
	0~48	22.0	33.8	62.4	50.2	1.25	2.33			85.6	86.4
	0~72	23.0	35.8	65.9	53.8	1.41	2.48			90.3	92.1
	0~96	23.3	36.2	66.7	54.5	1.45	2.55			91.4	93.3
	0~120	23.4	36.3	67.0	54.7	1.48	2.59			91.8	93.6
	0~144	23.4	36.4	67.2	54.9	1.48	2.60			92.1	93.9
	0~168	23.5	36.4	67.3	54.9	1.53	2.67	0.67	0.84	93.0	94.9
高用量 単回 経口 投与 1000 mg/kg	0~6	0.09	0.09							0.09	0.09
	0~12	0.19	0.20	27.3	10.4	0.07	0.05			27.6	10.7
	0~24	0.52	0.62	43.8	36.3	0.10	0.08			44.4	37.0
	0~48	1.40	2.25	75.7	61.6	0.17	0.18			77.3	64.0
	0~72	2.32	4.50	84.9	85.4	0.31	0.32			87.5	90.2
	0~96	2.82	5.03	88.0	87.3	0.34	0.35			91.1	92.7
	0~120	2.94	5.10	88.4	87.5	0.35	0.35			91.6	92.9
	0~144	2.95	5.12	88.4	87.5	0.35	0.36			91.7	93.0
	0~168	2.96	5.13	88.4	87.5	0.37	0.37	0.03	0.04	91.8	93.1

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

表 1-2 投与放射能の排泄/反復投与群 (投与放射能に対する割合%として表示)

	時間	尿		糞		ケージ洗液		カーカス		合計	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
反 復 経 口 投 与 5mg/kg	0~6	2.59	5.34							2.59	5.34
	0~12	6.93	12.9	3.78	5.31	0.18	1.20			10.9	19.4
	0~24	13.7	25.0	32.3	26.5	0.33	2.01			46.3	53.5
	0~48	19.8	33.2	61.2	50.1	0.59	2.64			81.6	85.9
	0~72	21.7	34.7	67.5	54.3	0.70	2.89			89.9	91.8
	0~96	22.2	34.9	69.7	55.1	0.76	2.99			92.6	93.0
	0~120	22.4	35.0	70.3	55.3	0.78	3.01			93.4	93.3
	0~144	22.5	35.1	70.6	55.4	0.83	3.07			93.9	93.5
	0~168	22.5	35.1	70.7	55.5	0.85	3.12	0.87	0.67	95.0	94.4

胆汁排泄試験

胆管カニューレ挿入ラットにおいて、低用量群では胆汁排泄が主排泄経路であった。高用量群では低用量群と異なり主排泄経路は糞経由であった。投与放射能の胆汁中、糞中、尿中における96時間後の排泄率は、次のとおりであった。

投与群	胆汁中排泄		糞中排泄		尿中排泄	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
低用量単回経口	67.2%	51.6%	10.5%	10.5%	11.0%	30.4%
高用量単回経口	8.92%	6.03%	86.0%	79.3%	1.14%	1.53%

これらの結果をADME試験における単回経口投与試験結果と比較すると、低用量群においてはADME試験での糞中排泄量とほぼ同量の放射能が胆汁中に認められた。このことはADME試験で認められた糞中の放射能の多くは、一度体内に吸収され肝で代謝を受けたものが胆汁を介して糞中に排泄されたものである事を示唆している。さらに尿中排泄が低くなったこと(雄で23.3%から11.0%に減少、雌で36.2%から30.4%に減少)は腸肝循環による再吸収が起こり、再吸収された代謝物は主に尿を介して排泄されることを示唆している。また糞中排泄が雌雄とも10%程度であったことから、投与された放射能のほぼ80%以上が吸収されたことになり、吸収率に性差は認められなかった。

高用量群では、胆汁中の放射能の割合が低用量群に比べて非常に低いこと、ならびに糞中の放射能の大部分が未変化のエチプロールであったことから吸収が飽和していると考えられる。未吸収エチプロールの量が圧倒的に多かったため明確ではないが、排泄パターンは低用量群と類似している。

胆汁排泄試験における投与放射能の経時的排泄パターンを表2に示した。

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

表2 投与放射能の排泄/胆汁排泄試験 (投与放射能に対する割合%として表示)

	時間	尿		糞		胆汁		ケージ洗液		カーカス		合計	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
低用量 単回 経口投与 5mg/kg	0~6	1.69	1.38			6.99	7.05					8.68	8.43
	~12	3.37	5.81	3.18	1.24	26.1	19.2	2.49	0.83			35.2	27.1
	~24	7.30	14.7	8.03	6.04	49.9	28.6	3.26	2.01			68.5	51.3
	~48	9.92	24.8	10.0	9.24	64.8	43.6	3.56	2.63			88.3	80.2
	~72	10.6	28.8	10.4	10.1	66.7	49.9	3.71	2.95			91.5	91.8
	~96	11.0	30.4	10.5	10.5	67.2	51.6	3.79	3.10	1.49	3.49	93.9	99.1
高用量 単回 経口投与 1000mg/kg	0~6	0.09	0.10			0.40	0.07					0.49	0.13
	~12	0.19	0.11	19.7	11.3	0.95	0.23	0.03	0.01			20.9	11.6
	~24	0.35	0.20	57.9	39.6	1.85	0.75	0.21	0.10			60.3	40.6
	~48	0.69	0.56	76.0	60.3	5.13	2.90	0.36	0.25			82.2	64.0
	~72	0.98	0.96	82.9	71.0	7.92	4.95	0.46	0.57			92.3	77.5
	~96	1.14	1.53	86.0	79.3	8.92	6.03	0.49	0.98	0.36	5.78	96.9	93.6

②吸収率

吸収率は胆汁排泄試験の結果を基に下記の算出式より申請者が算出した。

$$\text{吸収率 (\%)} = \text{「胆汁中放射能割合」} + \text{「尿中放射能割合」} + \text{「組織内放射能割合」}$$

(各放射能割合は96時間後における投与放射能に対する割合%)

吸収率	雄	雌
低用量 (5mg/kg)	79.7%	85.5%
高用量 (1000mg/kg)	10.4%	13.3%

③血中濃度推移

薬物動態試験における低用量群(5mg/kg)および高用量群(1000mg/kg)の血中濃度推移を表3に示した。

低用量群では、投与8時間後には血中濃度はピークに達し(雄、雌でそれぞれ2.114、1.633μ相当/g)、その後二相的に低下し、投与168時間後にはそれぞれ0.088及び0.173μ相当/gとなった。

高用量群では、総放射濃度は徐々に上昇し、雄は24時間後、雌は48時間後にピークに達した(雄、雌でそれぞれ38.7、29.8μ相当/g)。その後低用量群と同様に二相的に低下し、投与168時間後にはそれぞれ2.9及び3.0μ相当/gとなった。

表 3 血中濃度推移

(単位： μg 相当/g 血液)

時間	低用量単回経口 (5mg/kg)		高用量単回経口 (1000mg/kg)	
	雄	雌	雄	雌
0.5	0.475	0.615	4.3	3.3
1	0.796	0.979	6.8	5.8
2	1.191	1.290	10.5	7.8
4	1.587	1.383	14.7	9.9
6	1.837	1.482	18.0	10.5
8	2.114	1.633	20.1	12.0
24	1.473	1.030	38.7	24.4
48	0.693	0.451	38.4	29.8
72	0.359	0.311	12.2	20.9
96	0.215	0.248	6.1	7.0
120	0.143	0.199	4.9	4.2
144	0.085	0.178	2.6	2.6
168	0.088	0.173	2.9	3.0

$T_{1/2}$ は、個体間に大きな変動が認められた低用量群の雌 (113.8 時間) を除いて、44.33 ~ 49.18 時間であり、投与量による一貫した影響はなかった。 C_{\max} および $AUC_{(0\sim\infty)}$ は用量増加とともに増大したが、高用量群は低用量群に対して $AUC_{(0\sim\infty)}$ は雄で 28 倍、雌で 22 倍、 C_{\max} は雄で 20 倍、雌で 18 倍であり投与量 (200 倍) に比例しなかった。薬物動態パラメーターを以下に示す。

投与量		T_{\max} (hr)	C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	$AUC_{(0\sim\infty)}$ ($\mu\text{g/g}$)	$AUC_{(0\sim t)}$ ($\mu\text{g/g}$)	$T_{1/2}$ (hr)
低用量 5mg/kg	雄	8.00	2.114	101.24	94.88	48.45
	雌	8.00	1.633	110.46	79.38	113.98
高用量 1000mg/kg	雄	33.60	41.66	2849	2620	49.18
	雌	48.00	29.78	2436	2240	44.33

T_{\max} : 最高血中濃度到達時間

C_{\max} : 最高血中濃度

$T_{1/2}$: 血中濃度半減期

AUC: 血中濃度/時間曲線下面積

・各数値は動物 5 匹の平均値。各個体ごとに T_{\max} 、 C_{\max} 、 $AUC_{(0\sim\infty)}$ 、 $AUC_{(0\sim t)}$ 、 $T_{1/2}$ をそれぞれ求めた後に、5 匹の平均値を求めた。

3) 分布

ADME試験

投与 168 時間後の組織内分布は、低用量群では、雌の全血を除いて雄雌とも低濃度で広範な組織にわたっていた。雄では、腎臓、肝臓及び皮膚・被毛に比較的多く認められ、他の組織では、血漿中の濃度以下であった。雌では、全血中の濃度が雄より高かった(雄 0.041 μg 相当/g に対し雌 0.266 μg 相当/g)。また血漿中の濃度より高かった組織は、腎臓、肺、甲状腺、脾臓、肝臓、心臓、皮膚・被毛及び副腎であった。

高用量群では、投与量と比較すると組織内分布の割合は低いものであった。雄では、皮膚・被毛、肝臓及び甲状腺に局在し、他の組織では血漿の濃度以下であった。雌では、血漿中の濃度より高かった組織は、甲状腺、皮膚・被毛、副腎、肝臓、卵巣及び腎臓であった。腸管内容物または胃内容物に放射能が認められず、投与した放射能標識体の吸収は、168 時間まで完了したことが示唆された。

反復投与群では、雌雄とも皮膚・被毛で最も高かった。他の組織については、雄では副腎、腎臓、肝臓及び甲状腺で血漿中濃度をやや上回った程度であったが、雌では殆どの組織で血漿中濃度を上回った。また単回投与群同様、全血中の放射能は明らかに高かった。腸管内容物中には少量の放射能が認められたが、胃内容物では信頼定量限界に近かった。カーカスに残存した放射能は全動物とも 0.8%未満で、被験物質の蓄積はなかったことが示唆された。

各組織における濃度および投与量に対する割合を表 4 に示した。

組織内分布試験

低用量群では血中濃度の T_{max} の投与後 8 時間後で放射能濃度が最も高かったのは、肝臓(雄 14.485 μg 相当/g、雌 13.291 μg 相当/g)で、ついで腎脂肪(雄 11.713、雌 11.418)であった。副腎(雄 7.919、雌 9.805)、脾臓(雄 6.429、雌 7.559)、腎臓(雄 5.364、雌 5.867)、甲状腺(雄 5.316、雌 5.854)及び肺(雄 4.249、雌 4.454)においても比較的高濃度の放射能が検出された。また雌の卵巣(5.228)でも高濃度の放射能が認められたが、精巣ではより低い値(2.376)だった。残りの組織内濃度は、血漿中の濃度以下であった。投与 24 時間後においては、雌雄とも高い濃度は肝臓(雄 5.304 雌 3.172)でのみ認められ、それ以外の組織では速やかに減少していた。

投与 48 時間後においては、雌雄ともに各組織でさらに減少し、肝臓においても雄 1.608、雌 0.773 で、他の全ての組織(雌の腎組織を除く)で血漿中の濃度以下であった。

組織濃度分布および分布割合の推移を表 5 に示した。

高用量群では血中濃度の T_{max} である投与 48 時間後において、雌雄とも高濃度の放射能が組織全体で認められた。組織中最も高かったのは、腎脂肪(雄 208.1、雌 138.0)であり、ついで肝臓(雄 160.5 雌 137.8)、副腎(雄 119.7 雌 122.7)であった。雄の甲状腺も高い濃度(192.0)を示したが、これは 1 匹の動物での極端に高い値(568.0)に起因しており、人為的高値と思われる。

投与 72 時間後においては、雄では全組織で速やかな放射能の低下が認められた。最高濃度は肝臓(45.3)及び腎脂肪(30.4)で認められた。その他の組織は血漿中濃度(22.6)より低かった。雌での減少は雄より緩やかで、高い濃度の放射能が腎脂肪(115.4)、肝臓(111.7)、副腎(87.7)で認められた。

投与 96 時間後においては、雄では肝臓(14.5)および皮膚・被毛(11.8)を除いて、多くの組織で信頼定量限界に近いレベルまで低下した。雌では、雄に比較して低下が遅く、肝臓(56.3)、腎脂肪(30.7)、副腎(27.6)および卵巣(27.5)に依然高濃度の放射能が認められた。脾臓、甲状腺、腎臓および肺でも比較的高い濃度の放射能が認められたが、他の全組織の濃度は血漿中の濃度(14.1)以下であった。

組織濃度分布および分布割合の推移を表 6 に示した。

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

表4 ADME試験における組織内放射能分布

濃度 (μg 相当/g)

試料	低用量単回 (5mg/kg)		高用量単回 (1000mg/kg)		低用量反復 (5mg/kg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.026*	0.043*	1.2*	1.7*	0.103	0.048*
骨髄	0.011	0.032	0.3*	0.7*	0.025	0.032
脳	0.006*	0.011	0.1*	0.2*	0.010	0.010
腎脂肪	0.021	0.027*	0.3*	0.4*	0.040	0.024
心臓	0.020	0.049	0.4*	0.5*	0.034	0.038
腎臓	0.062	0.087	1.6	1.3	0.112	0.062
肝臓	0.058	0.061	1.8	1.7	0.113	0.055
肺	0.024	0.068	0.6*	0.5*	0.049	0.058
筋肉	0.009	0.014	0.2*	0.2*	0.015	0.011
膵臓	0.018	0.026	0.3*	0.4*	0.034	0.022
皮膚・被毛	0.040	0.049	9.9	2.3*	0.294	0.322
脾臓	0.016	0.062	0.3*	0.6*	0.032	0.047
精巣	0.011		0.3*		0.023	
卵巣		0.039*		1.5*		0.039
甲状腺	0.036*	0.063*	1.8*	3.4*	0.122*	0.065
全血	0.041	0.266	1.3*	1.3*	0.076	0.195
血漿	0.036	0.027	1.2*	0.5*	0.087	0.025

分布割合 (%: 投与量に対する割合)

試料	低用量単回 (5mg/kg)		高用量単回 (1000mg/kg)		低用量反復 (5mg/kg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	0.00*
脳	0.00*	0.00	0.00*	0.00*	0.00	0.00
心臓	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00	0.00
腎臓	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01
肝臓	0.07	0.06	0.01	0.01	0.12	0.06
肺	0.00	0.01	0.00*	0.00*	0.00	0.01
膵臓	0.00	0.00	0.00*	0.00*	0.00	0.00
脾臓	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00	0.00
精巣	0.00		0.00*		0.01	
卵巣		0.00*		0.00*		0.00
甲状腺	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
腸管+内容物	0.04	0.04	0.01	0.00	0.07	0.00
胃+内容物	0.00*	0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
カーカス	0.55	0.71*	0.01*	0.02*	0.63	0.58

*: (ハックグラント+30d. p. m) より小さいデータから算出した結果を含む平均値。

表 5 組織内動態試験における放射能動態（低用量群）

濃度（ μg 相当/g）

試料	8 時間		24 時間		48 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	7.919	9.805	0.986	1.123*	0.138*	0.312
骨髄	1.509	1.704	0.364	0.314	0.086	0.078
脳	1.612	2.012	0.194	0.186	0.032	0.056
腎脂肪	11.713	11.418	1.472	0.623	0.153	0.371
心臓	3.809	3.918	0.839	0.665	0.220	0.230
腎臓	5.364	5.867	1.633	1.151	0.496	0.328
肝臓	14.485	13.291	5.304	3.172	1.608	0.773
肺	4.249	4.454	1.035	0.689	0.298	0.255
筋肉	2.600	3.165	0.472	0.403	0.079	0.117
膵臓	6.429	7.559	0.949	0.897	0.150	0.265
皮膚・被毛	4.412	3.520	0.714	0.722	0.242	0.261
脾臓	2.384	2.418	1.423	0.401	0.097	0.156
精巣	2.376		0.563		0.132	
卵巢		5.228		0.707		0.196
甲状腺	5.316	5.854	0.884	0.709	0.250	0.223
全血	2.211	1.525	1.379	0.723	0.584	0.428
血漿	4.099	2.454	2.311	0.806	0.805	0.296

分布割合（%：投与量に対する割合）

試料	8 時間		24 時間		48 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.03	0.05	0.00	0.01*	0.00*	0.00
脳	0.27	0.39	0.03	0.04	0.01	0.01
心臓	0.30	0.37	0.07	0.06	0.02	0.02
腎臓	0.97	1.12	0.30	0.23	0.10	0.07
肝臓	12.2	11.0	5.52	3.38	1.76	0.83
肺	0.46	0.55	0.13	0.10	0.04	0.03
膵臓	0.27	0.32	0.03	0.04	0.01	0.01
脾臓	0.13	0.12	0.02	0.02	0.01	0.01
精巣	0.57		0.14		0.03	
卵巢		0.03		0.01		0.00
甲状腺	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
腸管+内容物	30.2	24.2	16.7	13.5	4.60	3.24
胃+内容物	2.97	5.54	3.65	2.00	1.12	0.34
カーカス	34.2	35.2	6.70	5.53	1.84	2.28

*：（ハックグラント+30d. p. m）より小さいデータから算出した結果を含む平均値。

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

表6 組織内動態試験における放射能動態（高用量群）

濃度（ μg 相当/g）

試料	48 時間		72 時間		96 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	119.7	122.7	17.5*	87.7	4.5*	27.6
骨髄	23.6	18.5	4.0	22.0	1.6*	7.1
脳	24.8	68.4	4.2*	20.7	1.0*	6.8
腎脂肪	208.1	138.0	30.4	115.4	6.9	30.7
心臓	49.8	46.4	10.6	33.9	3.0	14.1
腎臓	65.6	63.4	20.1	47.4	7.3	19.7
肝臓	160.5	137.9	45.3	111.7	14.5	56.3
肺	55.7	49.0	15.0	37.7	4.3	16.2
筋肉	31.7	33.6	6.4	22.7	1.6*	6.9
膵臓	92.9	86.1	15.6	56.5	3.8*	23.7
皮膚・被毛	45.2	37.5	12.5	30.3	11.8	13.1
脾臓	32.1	31.4	5.0*	25.3	1.8	9.3
精巣	36.7		8.3		2.1	
卵巢		63.8		56.7		27.5
甲状腺	192.0	64.6	16.7	43.8	5.2*	20.0
全血	50.7	28.9	13.3	21.8	5.1	9.6
血漿	63.3	39.9	22.6	30.1	7.9	14.1

分布割合（%：投与量に対する割合）

試料	48 時間		72 時間		96 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.00	0.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00
脳	0.02	0.06	0.00*	0.02	0.00*	0.01
心臓	0.02	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01
腎臓	0.06	0.06	0.02	0.04	0.01	0.02
肝臓	0.96	0.88	0.33	0.81	0.12	0.44
肺	0.03	0.03	0.01	0.02	0.00	0.01
膵臓	0.02	0.02	0.00	0.01	0.00*	0.01
脾臓	0.01	0.01	0.00*	0.00	0.00	0.00
精巣	0.05		0.01		0.00	
卵巢		0.00		0.00		0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00
腸管+内容物	14.2	7.91	1.76	6.39	0.68	1.80
胃+内容物	10.4	24.5	0.93	4.41	0.04	1.06
カーカス	5.74	2.48	0.58	1.54	0.23	0.60

*：（バックグラウンド+30d. p. m）より小さいデータから算出した結果を含む平均値。

4) 代謝

尿、糞抽出物および胆汁試料中（各々0～72時間のプール試料）の放射性物質をHPLCおよびLC-MSにより分析した。

①尿中代謝物

尿中には、極性範囲の広い多くの代謝物が認められ、主要代謝物は極性の高い順にあった。雌雄における代謝物は定性的に類似していたが、
は雄に比べ雌で多く生成され、
の硫酸抱合体と推定される
は雌にのみに認められた。代謝物の総量は雌に多かった。この事は雌における尿中排泄の割合が雄に較べて高かったことの一因と考えられる。

低用量群と高用量群での定性的な差は、高用量群において
および
が認められなかった事であった。

また反復投与と単回投与との比較では特に有意な差は見られなかったので、反復投与による代謝経路の変化は起こらないことが示唆された。

胆汁排泄試験では、雄において胆管カニューレ挿入ラットと非挿入ラットの尿中の代謝物は定性的に類似していたが、
の量が挿入ラットで少なかった。雌においては非挿入ラットに比べ挿入ラットでは
の量が少なく、これらの代謝物が胆汁中では認められなかったことから、胆汁中の代謝物が腸肝循環により再吸収された後、尿中に排泄される前にさらなる代謝を受けることを示唆している。

LC-MSによる構造解析では、
と
推定され、酵素的脱抱合化により確認した。
と
推定された。
と推定され酵素的脱抱合化により確認された。
抱合体と推定された。

また
は
の
体と推定された。

尿中代謝物の投与放射能に対する割合を表7に示した。

②糞中代謝物

糞中の代謝物は尿に比べて種類が少なかった。低用量群での主要代謝物は雌雄とも
であり、尿とは対照的に雄で多く、雄及び雌で各々投与量の22%及び11%であったほかは差は認められなかった。その他の代謝物としては

および
が少量認められた。また未変化のエチプロールは僅かに0.2～0.3%

であった。胆汁排泄試験における低用量群での吸収率が80%程度であったことを考

慮すると、糞中の代謝物生成に腸内細菌による分解等も関与していることが示唆された。

高用量群では、未吸収のエチプロールが雄で72.24%、雌で76.97%と圧倒的に多かった。

雄では低用量群と全く同じ代謝物が認められたため、代謝経路に変化はなかったことが示

唆された。また雌においては代謝物の構成が単純化しており、エチプロール以外では

が認められた。

反復投与では、尿と同様単回投与と定性的および定量的に類似しており、ここでも反復投与により代謝経路が変化しないことが示された。

胆汁排泄試験においては、低用量群の胆管カニューレ挿入ラットの糞中に、非挿入ラットで高い割合で見られた
が全く認められておらず、この代謝物が胆汁経路で糞中に排泄されたことが示された。

糞中代謝物の投与放射能に対する割合を表8に示した。

③胆汁中代謝物

胆汁中には、広い極性範囲に及ぶ多くの代謝物が認められた。低用量群における主要代謝物は
であった。高用量群では
が認められ

なかった事を除いては定性的に低用量群に類似しており、同じ代謝経路が関係することが示唆された。

胆汁中代謝物の投与放射能に対する割合を表9に示した。

表7 尿中の代謝物

	ADME試験/尿中代謝物 (投与放射能%)						胆汁排泄試験/尿中代謝物 (投与放射能%)				
	単回投与 (5mg/kg)		単回投与 (1000mg/kg)		反復投与 (5mg/kg)		単回投与 (5mg/kg)		単回投与 (1000mg/kg)		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
エチプロール[A]							0.05			0.05	

空欄は検出されなかったことを示す。

表8 糞中の代謝物

	ADME試験/糞中代謝物 (投与放射能%)						胆汁排泄試験/糞中代謝物 (投与放射能%)				
	単回投与 (5mg/kg)		単回投与 (1000mg/kg)		反復投与 (5mg/kg)		単回投与 (5mg/kg)		単回投与 (1000mg/kg)		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
エチプロール[A]	0.29	0.19	72.24	76.97	1.21	3.97		0.44		76.35	

空欄は検出されなかったことを示す。

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

表9 胆汁中の代謝物

	単回投与 (5mg/kg)		単回投与	
	雄	雌	雄	雌

数値は投与放射能に対する割合(%)。
空欄は検出されなかったことを示す。

④想定代謝経路

ADME試験および胆汁排泄試験結果より、エチプロールはラット体内において以下の3つの主要な経路により代謝される事が推定された。

I.

II.

III.

図1にエチプロールのラット体内における推定代謝経路を示した。

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

図1 エチプロールのラット体内における推定代謝経路

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。

2. 植物体内運命に関する試験

(1) 稲における代謝試験

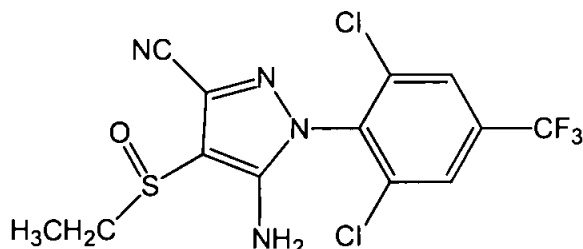
(資料 No. 代2)

試験機関：

報告書作成年：2000年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

標識位置の設定理由；

供試植物：稲 (品種：Gulfmont)

栽培条件：温室内で栽培

温度 (移植後) 対照区 18°C (最低) ~38°C (最高)

処理区 20°C (最低) ~36°C (最高)

試験方法：

処理溶液の調製；

1 倍量処理用： ^{14}C 標識と非標識のエチプロールを約 14.7mg ずつ秤り取りアセトニトリルに溶解し 1.18mg/mL とした。溶液の比放射能は 71,632dpm/ μg であった。

5 倍量処理用： ^{14}C 標識エチプロールを 35.4mg、非標識のエチプロールを 110.1mg 秤り取りアセトニトリルに溶解し 5.82mg/mL とした。溶液の比放射能は 34,433dpm/ μg であった。

処理方法及び処理量設定根拠；

各区 34 本のイネをポット (1 本/ポット) に移植した。対照群は 8 本とした。

1 倍処理区 (処理量 0.67kg a. i. /ha)

第 1 回目：全処理量の 2/3 (19.42mg) となるように上記アセトニトリル溶液をとり、0.25% Tween80 を添加した溶液 41ml を収穫 26 日前にイネ全体に散布した。

第 2 回目：収穫 14 日前に残りの 1/3 (9.51mg) を同様に散布した。

5 倍処理区 (処理量 3.35kg a. i. /ha)

第 1 回目：全処理量の 2/3 (95.71mg) となるように上記アセトニトリル溶液をとり、0.25% Tween80 を添加した溶液 41ml を収穫 26 日前にイネ全体に散布した。

第 2 回目：収穫 14 日前に残りの 1/3 (46.86mg) を同様に散布した。

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。

1倍処理区は予想最大投下薬量とした。さらに代謝の解明を容易にするため5倍処理区も併せて設けた。

試料採取時期；

第1回目の散布2~4時間後および第2回目の散布前に1倍及び5倍処理区から2本ずつ採取し、茎葉と穂(未成熟)に分けた。

第2回目の散布2~4時間後に、1倍、5倍処理区及び対照区から2本ずつ採取し、茎葉と穂(未成熟)に分けた。

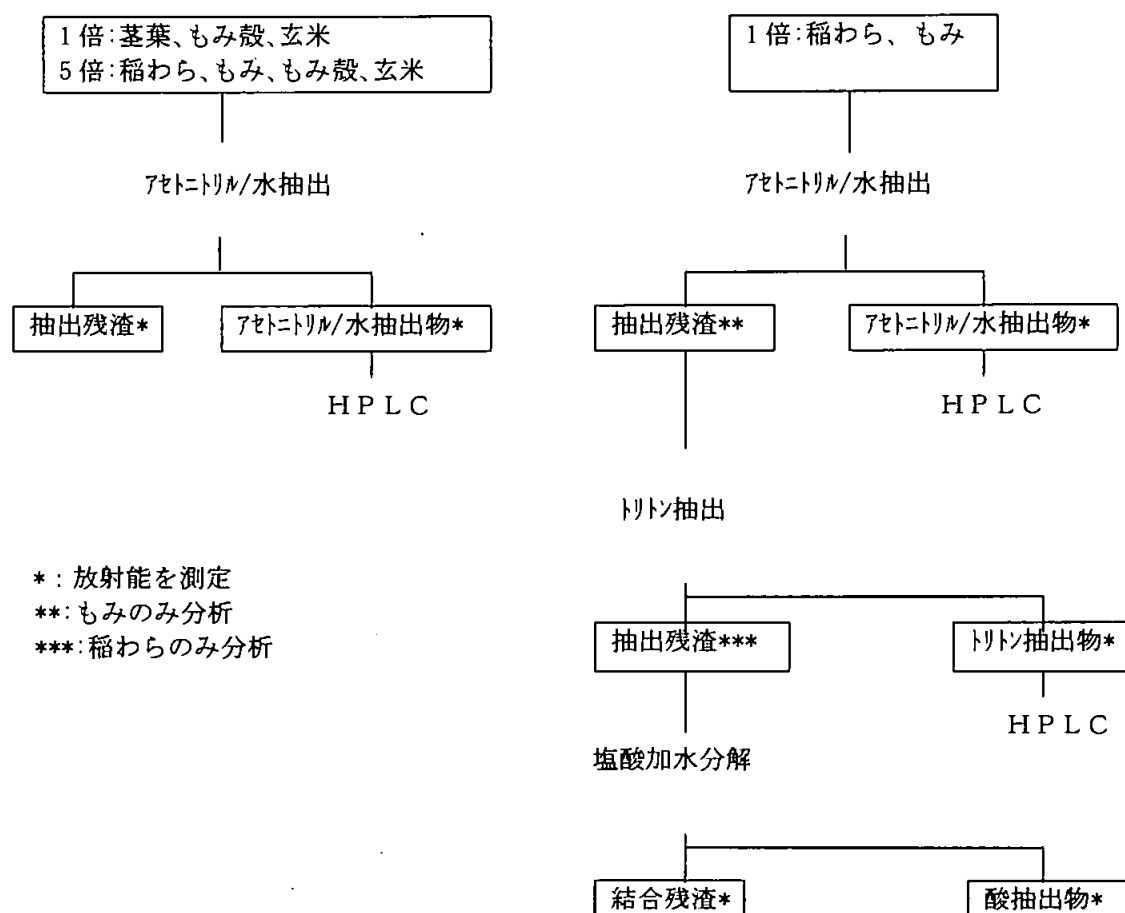
第2回目の散布14日後にそれぞれの区から収穫し、稲わら、もみ、もみ殻および玄米に分けた。

分析方法；

未成熟植物体：茎葉と穂に分け、それぞれLSA法(Liquid Scintillation Analysis)により放射能を測定した。茎葉については、アセトニトリル/水(80:20, v/v)で抽出し抽出液をLSAおよびHPLC分析に供した。

成熟植物体：各組織試料を粉碎後、アセトニトリル/水(80:20, v/v)で抽出し抽出液をLSAおよびHPLC分析に供した。稲わらおよびもみでは、その抽出残渣に界面活性剤(Triton X-100)を加え超音波処理しアセトニトリルを加えて抽出した。抽出物をHPLCで分析した。さらに、結合残渣を遊離するため抽出残渣に塩酸(1.5N)を加え酸加水分解を行い、抽出物、最終結合残留物中の放射能を測定した。HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された代謝物は、質量分析法により確認した。

抽出分析操作フローチャート



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。

機器分析：

総放射能測定

各組織試料および最終抽出残渣はサンプルオキシダイザー (Packard 387 Robotic Oxidizer)で燃焼し生成した $^{14}C^{O_2}$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター (Packard 2500TR)で放射能を測定する(LSA法)。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

HPLC分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS/MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MS/MSによるマススペクトル分析により確認した。

結果：

1) 放射能分布

収穫前試料

処理放射能の大部分が茎葉部に存在した。また濃度は各部とも散布濃度に比例していた。各部における総残留濃度および分布率を下表に示した。

1倍処理区

	茎葉		未成熟穂	
	濃度(ppm)	分布率(%)*	濃度(ppm)	分布率(%)*
1回目散布後(0日)	0.67	86.0	1.01	14.0
2回目散布前(1回目散布10日後)	0.45	92.4	0.60	7.6
2回目散布後(11日後)	1.09	89.3**	0.88	10.7**

5倍処理区

	茎葉		未成熟穂	
	濃度(ppm)	分布率(%)*	濃度(ppm)	分布率(%)*
1回目散布後(0日)	3.33	80.3	6.67	19.7
2回目散布前(1回目散布10日後)	4.85	87.8	4.52	12.2
2回目散布後(11日後)	4.89	88.6	5.21	11.4

*:申請者の計算による

** : 試料重量測定誤差のため、対照区と5倍処理区試料の平均重量を適用した。

収穫時試料

収穫時の稲わら、もみの残留は処理量に比例した。玄米中の放射能はもみ全体の10%程度であり、穂に付着したエチプロールの玄米への移行は少なかった。

もみの残留放射能が未成熟穂より高く、稲わらの残留放射能が茎葉より高いのは、乾燥に起因する。また全対照サンプル、土壌および水には放射能は認められなかった。

各部における総残留濃度および分布率を表1-1、2に示した。

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

表 1-1 各部における総残留濃度および分布率（1倍処理区）

稲わら		もみ		もみ殻		玄米	
濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)
6.27	89.3	2.12	10.7	3.95	9.4	0.15	1.3

表 1-2 各部における総残留濃度および分布率（5倍処理区）

稲わら		もみ		もみ殻		玄米	
濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)
31.52	93.4	11.11	6.6	33.54	5.6	2.28	1.0

*:申請者の計算による

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

1倍処理区試料の各部位における収穫時の残留放射能のほとんどがアセトニトリル/水により抽出された。稲わら、もみにおけるこれに続くトリトン抽出および酸加水分解での抽出放射能はおおむね数%と低いレベルであり、最終結合残渣は稲わらで3.35%、もみで2.36%と非常に少なかった。

また5倍処理区においても同様、総放射能の85~113%がアセトニトリル/水で抽出された。表2-1に1倍処理区試料の各組織における各抽出操作での回収放射能を示した。表2-2には5倍処理区試料の各組織におけるアセトニトリル/水抽出時の回収放射能を示した。

表 2-1 各組織中の放射能濃度(1倍処理区)

	茎葉(0日)		稲わら		もみ		もみ殻		玄米	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトニトリル/水抽出	0.74	109.33	6.18	98.56	2.12	100.02	3.96	100.18	0.14	94.50
アセトニトリル/水抽出残渣					0.18	8.49	0.29	7.34	0.01	6.67
トリトン抽出			0.89	14.26	0.08	3.77				
トリトン抽出残渣			0.56	8.85						
加水分解			0.32	5.10	0.05	2.36				
結合残留物			0.21	3.35	0.05	2.36				
合計	0.74	109.33	7.60	121.21	2.30	108.51	4.25	107.6	0.15	101.17

*:LSAにおける各組織の総放射能を100%とした。

空欄は分析せず

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

表 2-2 各組織中の放射能濃度(5倍処理区)

	稲わら		もみ		もみ殻		玄米	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトニトリル/水抽出	35.75	113.43	9.49	85.41	28.65	85.43	2.24	98.42
アセトニトリル/水抽出残渣	6.85	21.73	0.62	5.57	1.38	4.11	0.12	5.26
合計	42.60	135.2	10.11	90.98	30.03	89.54	2.36	103.68

*: LSA における各組織の総放射能を 100%とした。

②代謝物の同定

アセトニトリル/水およびトリトン抽出液は LSA 分析とは別に、代謝物の同定のため HPLC および HPLC/MS/MS に供した。

抽出放射能の大部分は未変化のエチプロール (66~76%) であり、であった。

1 倍処理区試料の各組織中の代謝物の濃度を表 3-1 に、また 5 倍処理区試料のもみ殻中の代謝物の濃度を表 3-2 に示した。

表 3-1 各組織中の代謝物濃度 (1倍処理区)

	茎葉(0日)		稲わら		もみ		もみ殻		玄米	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
同定										
エチプロール[A]	0.74	109.33	4.70	74.96	1.54	72.64	2.92	74.05	0.10	66.67
合計	0.74	109.33	7.08	112.92	2.13	100.47	3.86	97.85	0.14	86.67
特徴付け										
未同定代謝物 (アセトニトリル/水抽出)					<0.052	2	<0.061	<2	<0.011	-
(トリトン抽出)	NA	NA			<0.011	-	NA	NA	NA	NA
加水分解生成物	NA	NA	0.32	5.10	0.05	2.36	NA	NA	NA	NA
同定/特徴付け合計	0.74	109.33	7.40	118.02	2.18	104.83	3.86	97.85	0.14	86.67
抽出残渣	NA	NA	0.21	3.35	0.05	2.36	0.29	7.34	0.01	6.67
合計*	0.74	109.33	7.61	121.37	2.23	107.19	4.21	107.19	0.15	93.34

但し TRR は LSA 分析における各組織の総放射能を 100%とした。

1: 少量の 2 種の未同定代謝物、2: 4 種の未同定代謝物の合量

*: 申請者の計算による

NA: 分析せず、また空欄は検出されず

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。

表 3-2 もみ殻中の代謝物濃度 (5 倍処理区)

	もみ殻	
	濃度 (ppm)	%TRR
同定		
エチプロール[A]	25.33	75.52
合計	28.45	84.82
特徴付け		
未同定代謝物	0.20	0.60
合計	28.65	85.42
抽出残渣	1.38	4.11
合計	30.03	89.53

但し TRR は LSA 分析における各組織の総放射能を 100%とした。

③まとめ

稲わら

1 倍処理区では最初のアセトリル/水で TRR の約 99%抽出された。次のトリトン抽出で約 14%抽出され、加水分解では約 5%、最終結合残留物は約 3%であった。回収率は TRR の 121%であったが、これは 2 試料のうち 1 試料で高い放射能が付着した部分を採取したことに起因するものと考えられる。

主要な放射性成分は未変化のエチプロールであり、TRR の約 75%を占めていた。

もみ

1 倍処理区では最初の抽出で 100%回収され、その後の処理で最終的な回収率は TRR の約 109%となった。

主要な放射性成分は未変化のエチプロールで約 73%であった。

もみ殻

回収率は、1 倍処理区で 108%、5 倍処理区で 90%であった。

もみの残留放射能のほとんどがもみ殻に分布していた。主要な放射性成分は未変化のエチプロールおよび C^{14} であり、それぞれ 1 倍処理区で約 73%および C^{14} 5 倍処理区で約 76%および C^{14} であった。これらは、もみとほぼ同じ割合であった。

玄米

回収率は、1 倍処理区で 101%、5 倍処理区で 103%であった。

もみと同様に 1 倍処理区の主要放射性成分はエチプロールおよび C^{14} で、それぞれ 67%、 C^{14} であった。2 種の少量の未同定代謝物を確認したが、その生成量はごく僅かであった。

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

以上の結果から、エチプロールは稲において

稲体におけるエチプロールの推定代謝経路を下記に示した。

稲における推定代謝経路

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。

(2) 綿における代謝試験

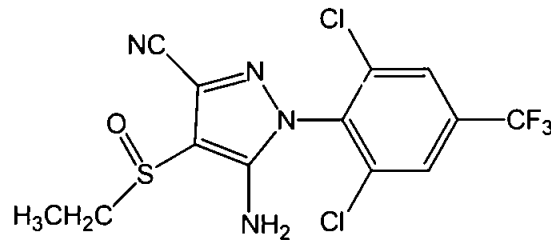
(資料 No. 代3)

試験機関：

報告書作成年：2000年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式；



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

(以下非標識エチプロール)

標識位置の設定理由；

供試植物：綿 (品種：DP 5414)

栽培条件；野外の砂壤土で栽培し、1997年5月29日に播種した。

9月12日及び25日に散布、11月12日に収穫した。

試験方法：

処理溶液の調製；

1倍量処理用： ^{14}C 標識エチプロールを 25mg と非標識エチプロールを 35mg ずつ秤り取りアセトニトリルに溶解し 60mg/25mL とした。溶液の比放射能は、55,827dpm/ μg であった。

10倍量処理用： ^{14}C 標識エチプロールを 124mg と非標識エチプロールを 471mg ずつ秤り取りアセトニトリルに溶解し 595mg/25mL とした。溶液の比放射能は、27,056dpm/ μg であった。

処理方法及び処理量設定根拠；

1区10本として、3試験区 (対照区、1倍処理区、10倍処理区) を設定した。各区の周囲を板仕切で囲み、試験期間を通じて葉が雨に濡れないように、取り外し可能なプラスチックの覆いを取り付けた。

1倍処理区 (処理量 0.67kg a. i. /ha、48,000本/acre、56.7mg/10本)

第1回目：全処理量の 2/3 (40mg) の上記アセトニトリル溶液に 0.25% Tween80 を添加して 42ml の散布溶液とし、莢開口前に散布した。

第2回目：第1回目散布13日後に残りの 1/3 (20mg) を同様に散布した。

10倍処理区 (処理量 6.7kg a. i. /ha、567mg/10本)

第1回目：全処理量の 2/3 (396mg) の上記アセトニトリル溶液に 0.25% Tween80 を添加して 42ml の散布とし、莢開口前に散布した。

第2回目：第1回目散布13日後に残りの 1/3 (198mg) を同様に散布した。

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。

1 倍処理区は予想最大投下薬量とした。さらに代謝の解明を容易にするため 10 倍処理区も併せて設けた。

試料採取時期；

- ①第 1 回目の散布後 2 時間以内に全 3 区から葉を採取した。
- ②第 2 回目の散布前に第 1 回目の散布前からあった葉(旧葉)と散布後に新たに成長した葉(新葉)に分けて全 3 区から採取した。
- ③第 2 回目の散布後 2 時間以内に全 3 区から葉を採取した。
- ④最終散布から 48 日後の収穫時に、綿の莢を摘み取り、綿繰機にかけて綿実と綿毛に分けた。また、綿繰工程からのくずと残りの切断した綿の木をいっしょにして Gin-副産物とした。
各試料は凍結保存状態で分析場所へ送付された。

分析方法：

前処理法；綿毛は裁断し、それ以外の各試料は粉碎し分析日まで凍結保存した。

分析操作；

総放射能測定

全ての採取試料はその一部をサンプルオキシダイザーで燃焼し、発生した $^{14}C^{O_2}$ を捕集し LSC により総放射能を測定した。

抽出操作

- ①1 倍処理区葉部 [第 1 回散布後、第 2 回散布前(新展開葉は除く)]

アセトリル/水 (80:20, v/v) で抽出し、抽出液と残渣に分けた。第 2 回目散布前の茎葉サンプルの抽出残渣のみ、界面活性剤 (1% Triton, X-100) を加え超音波処理しアセトリルを加えて抽出した。抽出液は直接放射能分析をし第 2 回目散布前の試料のみ HPLC 分析に供した。抽出残渣は燃焼後、放射能を分析した。

- ②1 倍および 10 倍処理区 Gin-副産物

水で膨潤後アセトリルを加え抽出した。残渣は更にアセトリル/水 (80:20, v/v) で抽出し抽出液と残渣に分け、抽出液は先のもものと合わせた。抽出残渣に界面活性剤 (1% Triton, X-100) を加え超音波処理しアセトリルを加えて抽出した。

1 倍処理区試料のみさらに酸加水分解およびリグニン分解抽出操作に供した。

酸加水分解：塩酸 (1.5N) を加えて加水分解し、抽出液と残渣に分けた。残渣をさらにメタノールにより抽出し、抽出液と残渣に分けた。

リグニン分解：上記残渣にジオキサン/1.5N 塩酸 (9:1, v/v) を加え加熱分解した。抽出液と残渣に分けた。抽出効率を確認するため、別に分けた 1 倍処理区試料をメタノール/水 (80:20, v/v) で抽出した。それ以降の処理はしなかった。

抽出液は直接放射能分析をし 1 倍処理区試料のみ HPLC 分析に供した。最終抽出残渣は燃焼後、放射能を測定した。

- ③1 倍処理区綿実

アセトリル/水 (80:20, v/v) で抽出し抽出液と残渣に分けた。抽出液はアセトリル留去後ヘキサンを加え抽出し、水層およびヘキサン層の放射能を測定し、水層のみ HPLC 分析に供した。残渣には、界面活性剤 (1% Triton, X-100) を加え超音波処理しアセトリルを加えて抽出し放射能を測定した。抽出残渣には 5% 酢酸を加えて超音波処理した後、アセトリルを加えて抽出し抽出液の放射能を測定した。抽出残渣はアセトリル/水 (84:16, v/v) を用いてソックスレー抽出し、放射能を測定した。次いで抽出残渣には、1.5N 塩酸を加え酸加水分解し、抽出液の放射能を測定した。さらにその抽出残渣は、10N の水酸化ナトリウムによりアルカリ加水分解し、メタノール/水 (90:10, v/v) で抽出した後、抽出液の放射能を測定した。この最終抽出残渣は燃焼後、放射能を測定した。

④-1 10倍処理区綿実

2 試料をアセトニトリル/水(80:20、v/v)で抽出し抽出液と残渣に分けた。1倍と同様にヘキサンで分配し、ヘキサン層は以降の処理をしなかった。

水層：一方の試料の水層はHPLC分析に供した。もう一方の試料はHPLCにより極性代謝物分画と非極性代謝物分画に分け、極性分画の濃縮液をHPLC分析に供した。さらにこの極性分画に濃塩酸を加え0.5N塩酸溶液とし、弱酸性加水分解処理してHPLC分析し、加水分解前の分析結果と比較した。この加水分解は、極性抱合体のアグリコンを遊離させるために行った。

残渣：アセトニトリル/水の抽出残渣は、1倍処理区綿実試料と同様に、界面活性剤(Triton X-100)を加え超音波処理した後、アセトニトリル抽出、弱酸処理、ソックスレー抽出、1.5N塩酸による酸加水分解、10Nの水酸化ナトリウムによるアルカリ加水分解を行った。

但し酸加水分解時の抽出物は、メタノールによる分配を行い水層とメタノール層に分け、水層は中和した後酢酸エチルで分配し、水層と有機層に分画した。メタノール層はメタノールを除去後水溶液と沈殿に分け、水溶液を中和後酢酸エチルで分配し、水層と有機層に分画し、先の水層画分と有機層画分に混合して放射能を測定した。また沈殿の放射能も測定した。

④-2 10倍処理区綿実定性分析

アセトニトリル/水(80:20、v/v)で抽出し脂質除去のためヘキサンで分配した。水層を酢酸エチルで分配し、水層に25%硫酸アルミニウム水溶液を沈殿が生成するまで加え、遠心後の上清についてLSC、HPLCおよび質量分析を行った。有機層についてもHPLCおよび質量分析を実施した。

⑤1倍および10倍処理区綿毛

10倍綿毛のみ分析した。試料を円筒ろ紙に入れてアセトニトリルで抽出し、抽出液の放射能を測定した。

代表例として10倍処理区綿実試料の抽出操作のフローチャートを図1に示した。

機器分析：

総放射能測定

各組織試料の一部及び最終抽出残渣はサンプラキティザー(Packard 387 Robotic Oxidizer)で燃焼した。生成した $^{14}\text{C}^{14}\text{O}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター(Packard 2500TR)で放射能を測定する(LSA法)。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

HPLC分析

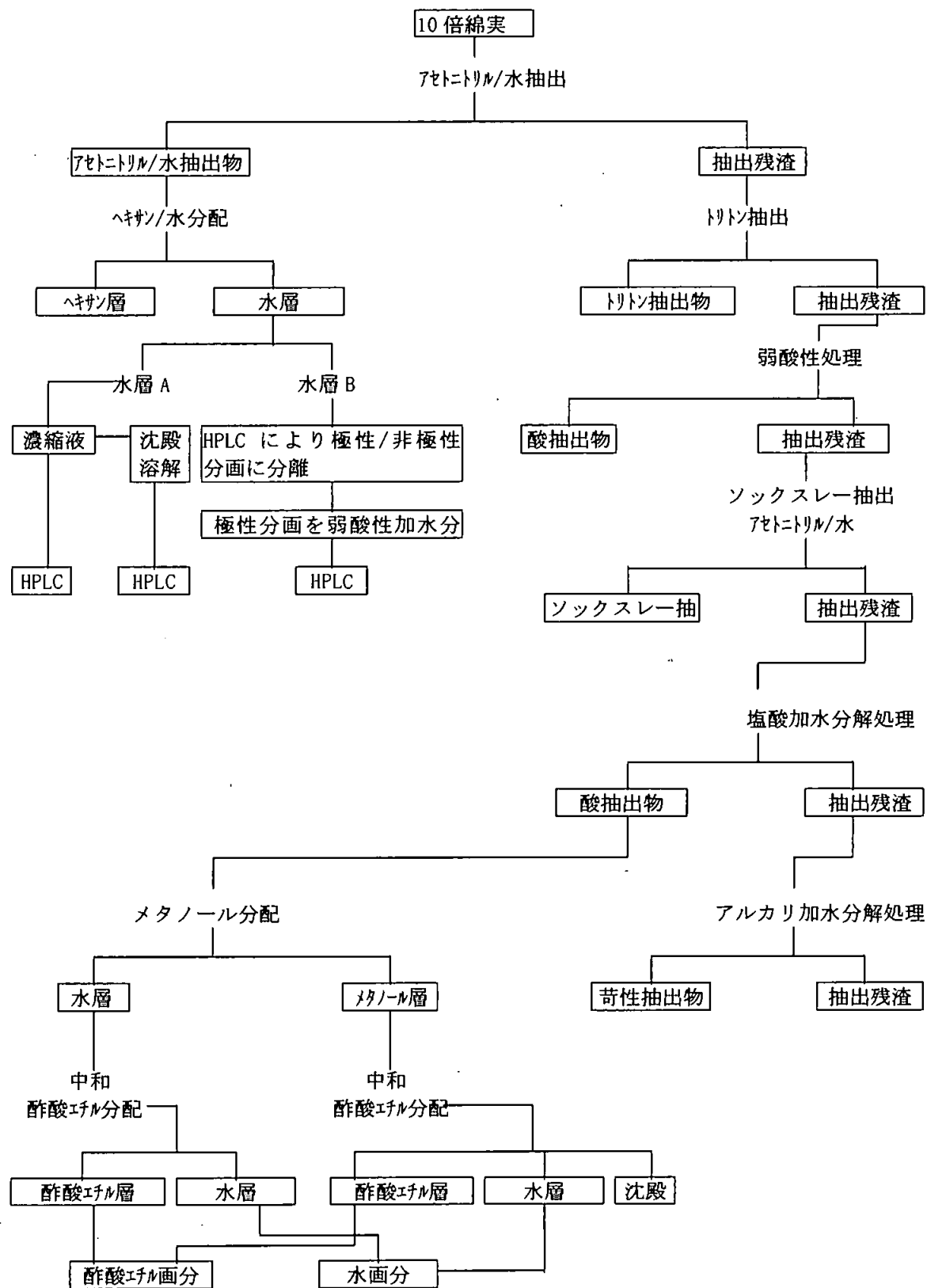
分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS/MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MS/MSによるマススペクトル分析により確認した。

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。

図1 10倍処理区綿実試料の抽出操作のフローチャート



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。

結果：

1) 放射能分布

収穫前試料

両処理区の新葉試料に比較的多くの放射能が検出された。これは茎葉散布されたエチプロールが吸収移行されたことを示すものである。また葉における総放射能は処理量にほぼ比例した。

葉における残留量を下表に示した。

	1 倍処理区 (ppm)			10 倍処理区 (ppm)		
	葉	新葉	旧葉	葉	新葉	旧葉
1 回目散布後(0 日)	55.25			347.90		
2 回目散布前(13 日後)		4.96	15.91		136.04	256.35
2 回目散布後(0 日後)			46.69			483.60

収穫試料

収穫時の各部位の残留量は処理量にほぼ比例していた。残留のほぼ全ては Gin-副産物中に分布しており、綿実および綿毛中の分布はごく僅かであった。

全対照サンプル、水および土壤中に残留放射能は認められなかった。

各組織における濃度と分布率を下表に示した。

	Gin-副産物		綿実		綿毛	
	濃度 (ppm)	分布率 (%) *	濃度 (ppm)	分布率 (%) *	濃度 (ppm)	分布率 (%) *
1 倍処理区	4.55	99.4	0.07	0.2	0.12	0.4
10 倍処理区	60.10	99.2	0.57	0.2	2.49	0.6

*: 申請者の計算による

2) 代謝

① 残留放射能の特徴付け

葉および Gin-副産物についてはアセトニトリル/水抽出により大部分の放射能が抽出された。続くトリトン抽出後 (1 倍処理区 Gin-副産物についてはさらに酸加水分解、リグニン分解処理を行った。) の非抽出放射能はいずれも 10%程度であった。

綿実については本操作で抽出された放射能はほぼ半量にとどまり、これはほぼ全てが比較的極性の高い物質であった。残渣中の放射能はこの後に引き続き行われた数々の抽出操作で大部分が抽出され最終的な未抽出放射能はいずれも 10%程度であった。1 倍処理区試料において総回収率が約 75%と低かったのは前処理の粉碎中に多量の軽い微粒子が生成し重量測定を困難にしたためである。

各組織での各抽出過程における回収放射能を表 1-1 および表 1-2 に示した。

② 代謝物の同定

綿毛を除き各部位のアセトニトリル/水抽出液を代謝物の同定のために HPLC 分析に供した。各部位とも未変化のエチプロールの割合は低く、広範な代謝を受けていた。

葉および Gin-副産物においては

他には

が同定されたが、いずれもその生成量は 10%以下であった。その他多数の未同定代謝物が認められたが生成量は少なかった。

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

綿実においてはエチプロールの量は少なく(1~7%)、多くが代謝物であった。葉等において主要代謝物であった

各組織中の代謝物の濃度を表 1-3 および表 1-4 に示した。

③まとめ

1 倍処理区葉

1 回目散布 13 日後の葉では、アセトリル/水の抽出で TRR の 84.6%が回収された。次のトリトン抽出で 4.8%が回収され、残渣には 14.8%の放射能が残留しており総回収率は 104.1%であった。

抽出液中の主要放射性成分は未変化のエチプロールであり 21%認められた。

1 倍処理区 Gin-副産物

アセトリル/水の抽出で TRR の 76.1%が回収された。次のトリトン抽出で 4.6%が回収され、続く酸加水分解、リガニン分解処理で各々5.7 及び 4.4%が回収された。残渣には 8.8%の放射能が残留しており総回収率は 98.6%であった。

HPLC 分析の結果、約 63%が同定され約 89%が同定あるいは特徴付けられた。主要放射能成分として、未変化エチプロール(16.26%) が認められた。

アセトリル/水の抽出効率を比較するためにメノール/水で抽出したが、結果は同様であった。

10 倍処理区 Gin-副産物

アセトリル/水の抽出で TRR の 83.5%が回収された。次のトリトン抽出で 3.1%が回収され、残渣には 12.0%の放射能が残留しており総回収率は 98.6%であった。

代謝物の同定作業は本試料では行っていない。

1 倍処理区綿実

アセトリル/水の抽出で TRR の 41.4%が回収された。次のトリトン抽出で 5.1%が回収され、続く酸加水分解、アルカリ加水分解処理で各々11.4、5.7%が回収された。残渣には 11.4%の放射能が残留しており総回収率は 75.1%であった。本試料のみ回収率が低かったのは、分析前処理の粉碎過程で微粒粉が多く生成され重量測定を困難なものにしたことに起因していると考えられる。

HPLC 分析の結果、同定に至ったのは僅か 5.7%であった。未変化エチプロールは 1.43%であり、

も同定された。

また、綿実中の主要代謝物は

、濃度としては 0.01ppm 未満であった。

が確認されたが、いずれも

少量であった。

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

10 倍処理区綿実

アセトリル/水の抽出で TRR の 54.0% が回収された。次のトリトン抽出で 6.7% が回収され、続くソックスレー抽出、酸加水分解、アルカリ加水分解処理で各々 2.3、13.4、5.3% が回収された。残渣には 10.5% の放射能が残留しており総回収率は 92.1% であった。HPLC 分析の結果、11.53% が同定された。主要放射能成分は未変化エチプロールであった (7.02%)。

また、1 倍処理区試料同様、綿実中の主要代謝物は

さらに

質量分析による代謝物の確認

1 倍および 10 倍処理区 Gin-副産物のアセトリル/水抽出物および 10 倍綿実のアセトリル/水抽出液のヘキサン分配後の水層および有機層について HPLC-MS および HPLC-MS/MS で分析した。Gin-副産物では、エチプロール、
を同定した。また、

10 倍処理区綿実では、エチプロール、
また

以上の結果からエチプロールの綿における代謝経路を以下のように推定する。
散布されたエチプロールは植物体内に移行後、速やかに広範な代謝を受ける。主要代謝経路は、

また

綿における推定代謝経路を図 2 に示した。

表 1-1 各組織中の放射能濃度

	1倍 葉(0日)		1倍 旧葉(13日)		10倍 Gin-副産物	
	濃度(ppm)	%TRR*	濃度(ppm)	%TRR*	濃度(ppm)	%TRR*
アセトニル/水抽出	58.34	105.6	13.46	84.60	50.18	83.51
トリソ抽出			0.76	4.77	1.88	3.13
抽出残渣			2.35	14.74	7.21	12.0
合計+	58.34	105.6	16.57	104.11	59.27	98.64

*:LSAにおける各組織の総放射能を100%とした。

+:申請者の計算による

表 1-2 各組織中の放射能濃度

	1倍 Gin-副産物		1倍 綿実		10倍 綿実	
	濃度(ppm)	%TRR*	濃度(ppm)	%TRR*	濃度(ppm)	%TRR*
アセトニル/水抽出	3.46	76.1	0.029	41.43	0.308	53.99
ヘキソ/水分配水画分			0.029	41.43	0.257	45.09
ヘキソ画分			ND	ND	0.009	1.59
沈殿 ¹⁾					0.035	6.14
トリソ抽出	0.16	3.56	0.004	5.06	0.038	6.67
塩酸加水分解処理	0.26	5.71				
リグニン分解処理	0.20	4.40				
弱酸加水分解			ND	ND	ND	ND
ソックスレー抽出			ND	ND	0.013	2.26
塩酸加水分解処理			0.008	11.43	0.077	13.42
メタノール分配/水層					0.047	8.25
メタノール層					0.030	5.26
酢酸エチル分配/水層 ²⁾					0.050	8.77
酢酸エチル分配/有機層 ²⁾					0.015	2.63
沈殿 ³⁾					0.010	1.75
苛性分解処理			0.004	5.71	0.030	5.26
未抽出残留物	0.40	8.79	0.008	11.43	0.060	10.53
合計+	4.48	98.56	0.053	75.06	0.526	92.13

1): 10倍処理区綿実試料のみに認められた抽出液濃縮過程で生じた沈殿。

2): メタノール分配における水層ならびにメタノール層それぞれの酢酸エチル分配における水層および有機層を合わせたもの。

3): メタノール層のメタノール留去の際に生じた沈殿

*:LSAにおける各組織の総放射能を100%とした。

+:申請者の計算による

空欄は分析せず

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

表 1-3 各組織中の放射成分の定性

	1 倍旧葉 (0 日)		1 倍旧葉 (13 日)		1 倍 Gin-副産物	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
同定						
エチプロール[A]	58.34	105.6	3.34	20.99	0.74	16.26
合計	58.34	105.6	8.45	53.1	2.86	62.85
特徴付け ¹⁾						
複数の極性未同定代謝物 ²⁾					0.28	6.16
複数の非極性未同定代謝物 ³⁾					0.29	6.38
複数の未同定代謝物 ⁴⁾			5.01	31.5		
トリソ抽出	NA	NA	0.76	4.77	0.16	3.56
酸分解処理	NA	NA	NA	NA	0.26	5.71
リグニン分解	NA	NA	NA	NA	0.20	4.40
同定/特徴付け 合計	58.34	105.6	14.22+	89.37+	4.05	89.06
未抽出残渣			2.35	14.74	0.40	8.79

1) : より前に溶出した未同定代謝物は極性と考えられ、それ以降のものは非極性として特徴付けた。

2) :

3) :

4) :

NA : 分析せず

* : LSA における各組織の総放射能を 100%とした。

+ : 申請者の計算による

空欄は検出されず

表 1-4 各組織中の放射成分の定性

	1倍 綿実		10倍 綿実	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
同定				
エチアール[A]	0.001	1.43	0.040	7.02
合計	0.004	5.72	0.066	11.53
特徴付け ¹⁾				
極性未同定代謝物 0.71	0.007	10.00	0.045	7.89
極性未同定代謝物 0.69	0.005	7.14	0.072	12.63
複数の極性未同定代謝物	0.006 ²⁾	8.58 ²⁾	0.064 ³⁾	11.23 ³⁾
複数の非極性未同定代謝物	0.003 ⁴⁾	4.29 ⁴⁾	0.041 ⁵⁾	7.21 ⁵⁾
トリソ抽出	0.004	5.06	0.038	6.67
ソックスレー抽出	ND	ND	0.013	2.26
苛性加水分解産物	0.004	5.71	0.030	5.26
酸加水分解産物	0.008	11.43	NA	NA
酸加水分解産物の水溶性画分	NA	NA	0.050	8.77
酸加水分解産物の酢酸エチル画分	NA	NA	0.015	2.63
同定/特徴付け 合計	0.041	57.93	0.434	76.08
未抽出残渣	0.008	11.43	0.060	10.53

1) : より前に溶出した未同定代謝物は極性と考えられ、それ以降のものは非極性として特徴付けた。

2) :

3) :

4) :

5) :

NA : 分析せず

* : LSA における各組織の総放射能を 100%とした。

空欄は検出されず

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。

図2 綿における推定代謝経路

(3) ピーマンにおける代謝試験

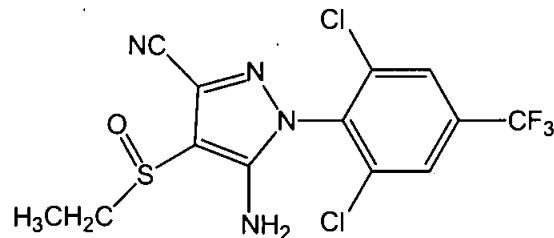
(資料 No. 代 4)

試験機関：

報告書作成年：2000 年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：



(*: ¹⁴C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニル^{*}ラゾール-3-カルボニトリル
(以下 ¹⁴C 標識エチプロール)

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度； (以下非標識エチプロール)

標識位置の設定理由：

供試植物：ピーマン (品種：North Star)

栽培条件；1998 年 8 月 19 日に温度調節した温室に播種し、9 月 21 日にシト壤土に少量の鉢植え用土を混合した土に 1 本/鉢の割合で定植した。

12 月 10 日 (収穫 26 日前) および 22 日 (収穫 14 日前) に散布、1 月 5 日に収穫した。

試験方法：

処理溶液の調製；

1 倍量処理用：¹⁴C 標識エチプロールを 73.7mg と非標識エチプロールを 126.4mg ずつ秤り取りアセトニトリルに溶解し、200.1mg/25mL とした。溶液の比放射能は 76,025dpm/ μ g であった。

5 倍量処理用：¹⁴C 標識エチプロールを 36.0mg と非標識エチプロールを 177.9mg ずつ秤り取りアセトニトリルに溶解し、213.9mg/10mL とした。溶液の比放射能は 35,536 dpm/ μ g であった。

処理方法及び処理量設定根拠；

1 倍処理区 14 本、5 倍処理区 3 本、対照区 7 本とした。

1 倍処理区 (処理量 0.67kg a. i./ha、21,000 本/acre、181.56mg/14 本)

第 1 回目：上記アセトニトリル溶液の約 2/3 (133.1mg) に 0.25% Tween80 を添加し 42ml としたもののうち 41ml を収穫 26 日前に散布した。

第 2 回目：第 1 回目散布 12 日後に残りの 1/3 (63.9mg) を同様に調製し散布した。

5 倍処理区 (処理量 3.35kg a. i./ha、21,000 本/acre、194.31mg/3 本)

第 1 回目：上記アセトニトリル溶液の約 2/3 (141.5mg) に 0.25% Tween80 を添加し 16ml としたもののうち 15.7ml を収穫 26 日前に散布した。

第 2 回目：第 1 回目散布 12 日後に残りの 1/3 (65mg) を同様に 14ml に調製したもののうち 13.7ml を散布した。

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。

1 倍処理区は予想最大投下薬量とした。さらに代謝の解明を容易にするため 5 倍処理区も併せて設けた。

試料採取時期；

- ①第 1 回目の散布後 2~4 時間以内に 1 倍処理区および対照区から茎葉を採取した。
- ②第 1 回目の散布 11 日後に 1 倍処理区および対照区から茎葉および果実を採取した。
果実は完熟果実(赤)と未熟果実(緑)に分けた。
- ③第 2 回目の散布後 2~4 時間以内に 1 倍処理区および対照区から茎葉および果実を採取した。
果実は完熟果実(赤)と未熟果実(緑)に分けた。
- ④第 2 回目の散布から 14 日後の最終収穫時に、全区から茎葉および果実を採取した。
果実は完熟果実(赤)と未熟果実(緑)に分けた。
各試料は凍結保存状態で分析場所へ送付された。

分析方法；

前処理法：各試料はカット、スライスした後磨砕し凍結保存した。

分析操作：

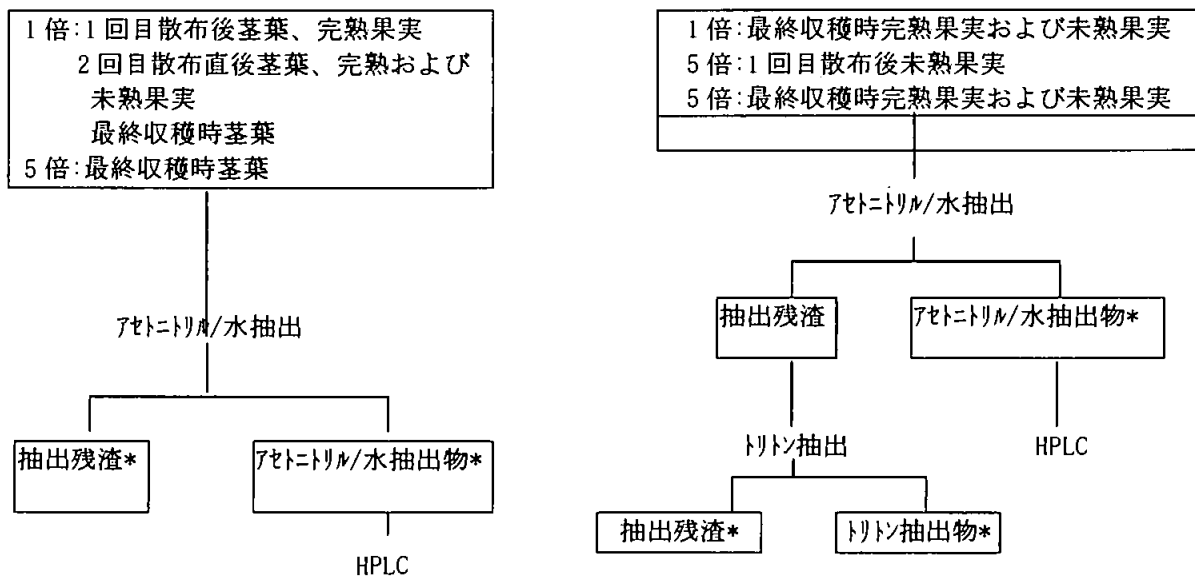
総放射能測定

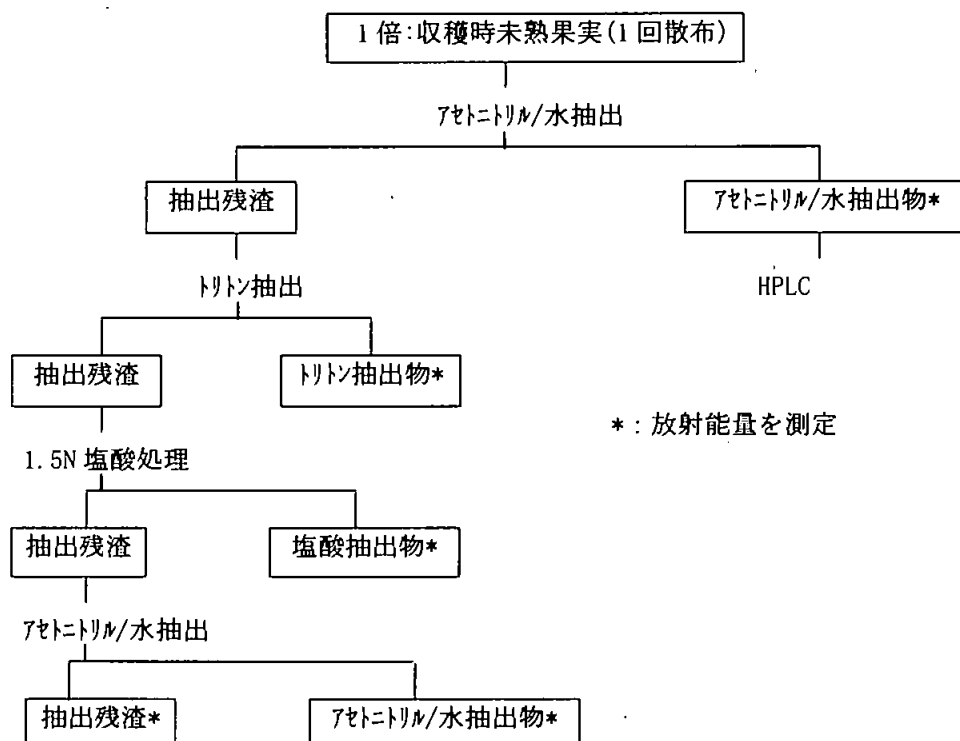
全ての採取試料について、その一部を燃焼後 LAS により総放射能を測定した。

抽出操作

- ①茎葉部、1 倍処理区 1 回目処理後完熟果実、2 回目散布後完熟および未熟果実
アセトニトリル/水(4:1,v/v)で抽出し、抽出液と残渣に分けた。抽出液は HPLC および LSC 分析に供した。抽出残渣は燃焼後、LSC により放射能を測定した。
- ②収穫時果実 (1 倍処理区 1 回散布後試料を除く)
アセトニトリル/水(4:1,v/v)で抽出し、抽出液と残渣に分けた。抽出液は HPLC および LSC 分析に供した。残渣に界面活性剤(1%Triton X-100)を加え超音波処理し、アセトニトリル/水で抽出し、抽出液と残渣に分け LSC により放射能を測定した。
- ③収穫時果実 (1 倍処理区 1 回散布後試料)
アセトニトリル/水(4:1,v/v)で抽出し、抽出液と残渣に分けた。抽出液は HPLC および LSC 分析に供した。残渣に界面活性剤(1%Triton X-100)を加え超音波処理し、アセトニトリル/水で抽出し、抽出液と残渣に分け、抽出液は LSC により放射能を測定した。残渣に 1.5N の塩酸を加えて処理し液相と残渣に分離した。液相は LSC により放射能を測定した。残渣にアセトニトリル/水(4:1)を加え抽出し、抽出液と残渣に分け LSC により放射能を測定した。

抽出操作のフローチャート





機器分析:

総放射能測定

試料をサンプルオキシダイザー (Packard 387 Robotic Oxidizer)で燃焼し生成した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター (Packard 2500TR)で放射能を測定する (LSA法)。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

HPLC分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS/MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物は LC-MS/MSによるマススペクトル分析により確認した。

結果:

1) 放射能分布

両処理区とも全ての試料採取時点において放射能のほぼ全てが茎葉部に認められた。果実についてはいずれの時点でも 1%以下であったが比重が小さいため残留濃度としては比較的高い値を示した。

無処理区には有意な放射能は検出されなかった。

各組織における残留濃度と分布率を表 1-1、2 に示した。

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

表 1-1 各組織における残留濃度と分布率 (1 倍処理区)

	茎葉		完熟果実		未熟果実		未熟果実+	
	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)
1 回目散布後	183.693	100.0						
2 回目散布前	36.036	99.2	0.312	0.8	0.450	<0.1		
2 回目散布後	117.739	99.4	0.549	0.3	0.591	0.3		
収穫時	44.571	99.2	0.450	0.2	0.505	0.5	0.676	0.1

表 1-2 各組織における残留濃度と分布率 (5 倍処理区)

	茎葉		完熟果実		未熟果実		未熟果実+	
	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)
収穫時	163.200	99.5	1.708	0.4	1.134	<0.1	0.400	<0.1

*: 申請者の計算による

+ : 1 回目散布以降に成長した果実なので、植物体には 2 回散布されているが、果実は 2 回目の 1 回のみ散布。

空欄は採取時に試料がなかったことを示す。

2) 代謝

① 残留放射能の特徴付け

全ての組織試料においてアセトニル/水抽出で概ね 90%以上の回収を得た。果実については引き続きトリトン抽出を行ったが、放射能の回収は 1%前後であった。1 回散布後収穫された果実ではアセトニル/水での回収が 85%とやや低かったため、トリトン抽出の後、塩酸加水分解に続きアセトニル/水抽出を行ったがいずれの操作においても放射能の回収は 2%以下であった。結合残渣はいずれも 6%以下であった。

② 代謝物の同定

茎葉

1 倍処理区試料においてはアセトニル/水抽出で抽出された放射能のほとんどが未変化エチプロール(83~99%)であった。

抽出残渣中の放射能も 4%以下と低かった。

5 倍処理区試料は最終収穫時のみ分析に供した。1 倍処理区試料と同様の結果が得られたが TRR は 79%とやや低い値を示した。

茎葉中の未変化体および代謝物の濃度ならびに総放射能に対する割合を表 2 に示した。

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

表 2 茎葉中の未変化体および代謝物

	1 倍処理区								5 倍処理区	
	1 回目散布直後		1 回目散布後		2 回目散布直後		最終収穫時		最終収穫時	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトール/水抽出	170.902	93.04	31.840	88.36	117.213	99.55	40.629	91.16	125.003	76.59
エチプロール[A]	170.908	93.04	30.766	85.38	116.228	98.72	37.125	83.29	120.584	73.89
合計	170.908	93.04	31.840	88.36	117.213	99.56	40.632	91.15	125.010	76.60
抽出残渣	3.281	1.79	0.866	2.40	2.505	2.12	1.666	3.74	3.847	2.36
合計	174.183	94.83	32.706	90.76	119.718	101.67	42.295	94.90	128.850	78.95

*:LSA における総放射能を 100%とした。
空欄は検出されず。

未熟果実

1 倍処理区試料において未変化のエチプロールは 1 回処理後収穫時で約 22%、2 回処理後収穫時で約 43%であった。主要代謝物は

抽出残渣中の放射能は 2~6%程度であった。

5 倍処理区試料においては未変化のエチプロールの割合が増加し、1 回処理後収穫時で約 49%、2 回処理後収穫時で約 83%であった。

抽出残渣中の放射能は 3~6%程度であった。

完熟果実

1 倍処理区の 2 回目散布前後で収穫された試料において抽出された放射能の大部分は未変化のエチプロール (85~92%) であった。

抽出残渣中の放射能はいずれも 1%程度と低いものであった。

最終収穫時の試料では未変化エチプロールは約 60%に減少していた。主要代謝物は

抽出残渣中の放射能は若干増加し 3.8%となった。

未熟果実に比べ相対的に代謝物のバリエーションが少なかった。

5 倍処理区試料 (最終収穫時試料のみ分析) においても同様の傾向が認められ、約 90%認められた未変化エチプロール以外で残留が認められたのは

抽出残渣中の放射能はわずか 1%であった。

果実中の未変化体および代謝物の濃度および総放射能に対する割合を表 3-1~3 に示した。

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

LC-MS/MS 分析

HPLC 分析におけるクロマトグラフィーにより同定されたエチプロールおよび代謝物についてはマススペクトル分析により同一物質であることが確認された。

表 3-1 1 倍処理区完熟果実

	完熟果実					
	1 回目散布後		2 回目散布直後		最終収穫時	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトリル/水抽出	0.293	93.91	0.527	96.10	0.423	94.00
エチプロール[A]	0.266	85.26	0.503	91.62	0.269	59.77
合計	0.294	94.23	0.527	95.99	0.421	93.55
トリソ X-100 抽出	NA	NA	NA	NA	0.005	1.11
抽出残渣	0.004	1.28	0.006	1.09	0.017	3.78
合計	0.297	95.19	0.533	97.19	0.445	98.89

*:LSA における総放射能を 100%とした。

NA : 分析せず

空欄は検出されず

表 3-2 1 倍処理区未熟果実

	未熟果実					
	1 回目散布後		2 回目散布直後		最終収穫時	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトニトリル/水抽出	0.576	85.21	0.568	96.11	0.471	93.27
エチアール[A]	0.150	22.19	0.469	79.36	0.218	43.17
合計	0.563	83.27	0.567	95.94	0.471	93.25
トリトン X-100 抽出	0.009	1.33	NA	NA	0.006	1.19
1.5N 酸抽出	0.011	1.63	NA	NA	NA	NA
アセトニトリル/水抽出	0.012	1.77	NA	NA	NA	NA
抽出残渣	0.026	3.85	0.014	2.37	0.029	5.74
合計	0.634	93.79	0.582	98.48	0.506	100.20

*:LSA における総放射能を 100%とした。
 NA: 分析せず
 空欄は検出されず

表 3-3 5 倍処理区果実

	完熟果実		未熟果実			
	最終収穫時		1 回目散布後		最終収穫時	
	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*	濃度 (ppm)	%TRR*
アセトリル/水抽出	1.639	95.96	0.375	93.75	1.149	101.32
エチプロール[A]	1.534	89.81	0.195	48.75	0.945	83.33
合計	1.638	95.90	0.371	92.75	1.149	101.32
トリソ X-100 抽出	0.009	0.53			0.007	0.62
抽出残渣	0.016	0.94	0.022	5.50	0.034	3.00
合計	1.664	97.43	0.397	99.25	1.190	104.94

*:LSA における総放射能を 100%とした。
空欄は検出されず

③まとめ

ピーマンにおける主要代謝経路は、

ピーマンにおけるエチプロールの推定代謝経路を図 1 に示した。

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

図1 ピーマンにおける推定代謝経路

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) 稲における代謝試験 (湛水処理)

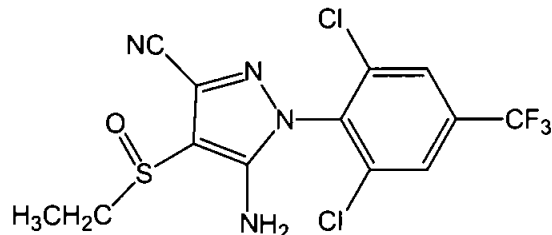
(資料 No. 代 9)

試験機関 :

報告書作成年 : 2004 年 [GLP 対応]

供試標識化合物 :

構造式 ;



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名 ; 5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α , α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能 ;

放射化学的純度 ;

供試非標識化合物 :

純度 ;

標識位置の設定理由 :

供試植物 : 稲 (品種 : 日本晴)

栽培条件 : 温室内で栽培

温度 (移植後) 明時間 (7:00-19:00) 24.5-25°C

暗時間 (19:00-7:00) 20-21°C

試験方法 :

処理溶液の調製 ;

1 回目処理用 : ^{14}C 標識エチプロールを 64.4mg 秤り取り 3055 μl のアセトニトリルに溶解し、このうち 500 μl を水 3L に溶解する。この溶液の比放射能は 12.67 MBq/L であった。

2 回目処理用 : ^{14}C 標識エチプロールを 64.9mg 秤り取り 3200 μl のアセトニトリルに溶解し、このうち 500 μl を水 3L に溶解する。この溶液の比放射能は 12.22 MBq/L であった。

処理方法及び処理量設定根拠 ;

10 株のイネをコンテナ (0.5m²) に移植した。このコンテナを 2 つ調製した。

1 回目処理 : 各々のコンテナに、調製した処理溶液 3L を 3 回注ぎ入れた。その後 3L の水で植物体を洗い流した。

2 回目処理 : 1 回目処理 8 日後に、1 回目と同様の処理を行った。

処理量の設定は予想最大投下薬量 (0.6kg/ha x 2) とした。

試料採取時期 ;

2 回目処理 30 日後 (移植 116 日後) に収穫し、稲わら、もみ殻および玄米に分けた。玄米の一部は精米し、白米と糠に分けた。

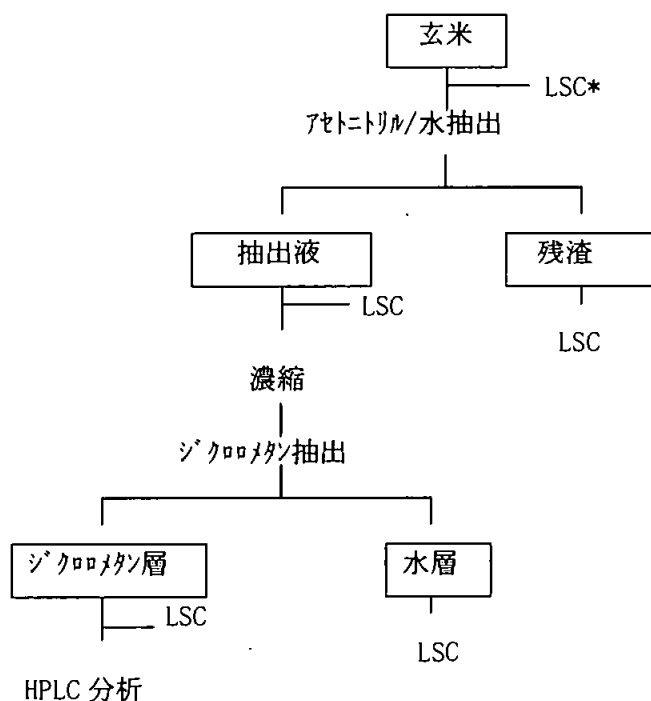
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

分析方法；

玄米：抽出操作の前に試料の一部を採取し、直接γプロポキシドールにより放射能を測定した。試料（50g）を粉砕し、水 60ml を加え 30 分間膨潤させアセトニル 240ml で抽出する。ろ過後、残渣をアセトニル/水（4:1, v/v）300ml で 2 回抽出し、続いてアセトニル 300ml で抽出し、抽出液と残渣に分けた。各抽出液は液体シンチレーションカウンター（LSC）にて放射能測定後、混合しアセトニルを留去した。濃縮液を 100ml のジクロロメタンで 3 回抽出し、抽出液を濃縮後、LSC で放射能を測定し、HPLC 分析に供した。水層は LSC にて放射能のみを測定した。残渣は LSC にて放射能のみを測定した。また、試料の一部は精米し、糠と白米に分けたのち各々放射能を測定した。

稲わら、籾殻：抽出操作の前に試料の一部を採取し、直接γプロポキシドールにより放射能を測定した。試料（50g、但し籾殻は 10.57g）を粉砕し、水 60ml を加え 30 分間膨潤させアセトニル 240ml で抽出する。ろ過後、残渣をアセトニル/水（4:1, v/v）300ml で 2 回抽出し、続いてアセトニル 300ml で抽出し、抽出液と残渣に分けた。各抽出液は液体シンチレーションカウンター（LSC）にて放射能測定後、混合しアセトニルを留去した。濃縮液を 100ml のジクロロメタンで 3 回抽出し、抽出液を濃縮後、LSC で放射能を測定し、HPLC 分析に供した。水層も LSC にて放射能を測定後、HPLC 分析に供した。残渣は LSC にて放射能を測定後、2.0g を分取、アセトニル/水（1:1, v/v）100ml を加え 120℃ で 20 分間超音波抽出を行い、吸引ろ過により抽出液と最終残渣に分けた。抽出液は LSC で放射能を測定後、アセトニルを留去し、濃縮液を LSC による放射能分析及び HPLC 分析に供した。最終残渣は LSC にて放射能のみを測定した。

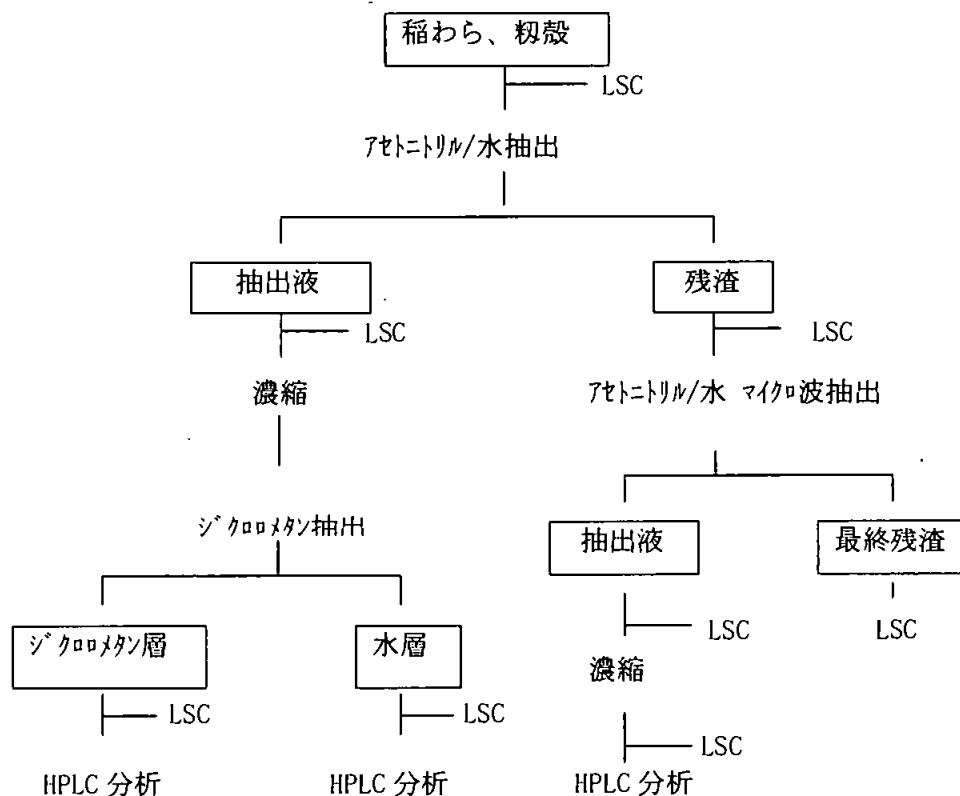
抽出分析操作フローチャート 1



*：白米と糠に分けたものも別途分析

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

抽出分析操作フローチャート 2



機器分析：

総放射能測定

各抽出液および個体試料（抽出残渣を含む）について総放射能を測定した。固体試料はサンプルオキシゲイター（Zinsser Analytic, OX500）で燃焼し生成した¹⁴C¹⁴O₂を捕集し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

HPLC分析

分解物と標準品とのクロマトグラフを行い分解生成物の定性及び定量を行った。また、分解生成物の分画化も行った。

質量分析

HPLC分析において分離された分解物は、LC-MS (ESI)、LC-MS/MS及びFT-MSならびに¹H-NMRにより構造解析を行った。

結果：

1) 放射能分布

田面水に処理された被験物質は根より浸透移行し各部に分布した。しかしながら可食部における分布率は低く、稲わらの約1/100であった。

各部における総残留濃度および分布率を表1に示した。

表1 各部における総残留濃度および分布率

稲わら		もみ殻		玄米		玄米中分布率	
濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	濃度 (ppm)	分布率* (%)	白米 (%)	糠 (%)
23.97	80.1	5.69	19.0	0.280	0.9	30	70

*: 申請者の計算による

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。

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

各試料の残留放射能の大部分がアセトニトリル/水により抽出された。ただし稲わら及びもみ殻に関しては抽出残渣中に 10%以上の残留放射能が認められたので同溶媒でマイクロ波抽出を行った。この結果、最終結合残渣は稲わらで 4.0%、もみ殻で 3.5%と非常に少なかった。玄米に関しては通常の抽出操作のみで 93%の放射能が回収されたためマイクロ波抽出は行わなかった。

各組織における抽出画分毎の放射能濃度を表 2 に示した。

表 2 各組織中の放射能濃度

	稲わら		もみ殻		玄米	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アセトニトリル/水抽出	20.79	86.7	3.54	62.1	0.261	93.1
ジクロロメタン抽出						
ジクロロメタン層	18.84	78.6	3.33	58.5	0.257	91.9
水層	1.95	8.1	0.21	3.6	0.003	1.2
アセトニトリル/水抽出残渣	3.18	13.3	2.16	37.9	0.019	6.9
アセトニトリル/水マイクロ波抽出	2.23	9.3	1.96	34.4		
最終残渣	0.95	4.0	0.20	3.5		
合計	23.97	100	5.69	100	0.280	100

空欄は分析せず

②代謝物の同定

アセトニトリル/水抽出液は LSC 分析とは別に、代謝物の同定のため HPLC による標準物質とのコクロマトグラフを行った。さらに LC-MS (ESI)、LC-MS/MS 及び FT/MS ならびに ¹H-NMR により構造解析を行った。

全ての分析部位に共通して抽出放射能の多くは未変化のエチプロール (42.2~62.3 %TRR) であり、

処理区試料の各組織中の代謝物の濃度を表 3 に示した。

表3 各組織中の代謝物濃度

	稲わら		もみ殻		玄米	
	濃度 (mg/kg)	%TRR	濃度 (mg/kg)	%TRR	濃度 (mg/kg)	%TRR
同定						
エチプロール[A]	10.12	42.2	3.53	62.0	0.175	62.3
合計	20.20	84.3	5.32	93.4	0.254	90.5
特徴付け						
未同定代謝物 (アセトリル/水抽出)	2.82*	11.8*	0.18+	3.1+	0.007++	2.6++
同定/特徴付け合計	23.02	96.1	5.50	96.5	0.261	93.1
抽出残渣	0.95	4.0	0.20	3.5	0.019	6.9
合計	23.97	100.1	5.70	100.0	0.280	100.0

*: 未同定代謝物の含量 (内最大値: 0.59mg/kg、2.4%TRR)

+: 未同定代謝物の含量 (内最大値: 0.11mg/kg、2.0%TRR)

++: 未同定代謝物 (0.004mg/kg、1.4%TRR) 及びジクロロメタン転溶後の水層の総放射能
空欄は検出されず

③まとめ

稲わら

最初のアセトリル/水抽出により総放射能の 86.7%が抽出された。さらに同溶媒によるマイクロ波抽出により 9.3%の放射能が抽出され、合わせて総放射能の 96%がこれらの抽出操作により抽出された。最終残留物中の放射能は、総放射能の僅か 4%であった。

稲わら中の主要な放射能は未変化のエチプロールであり、TRR の 42.2%を占めていた。

もみ殻

最初のアセトリル/水抽出により総放射能の 62.1%が抽出された。さらに同溶媒によるマイクロ波抽出により 34.4%の放射能が抽出され、合わせて総放射能の 96.5%がこれらの抽出操作により抽出された。最終残留物中の放射能は、総放射能の僅か 3.5%であった。

もみ殻中の主要な放射能は未変化のエチプロールであり、TRR の 62.0%を占めていた。

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。

玄米

最初のアセトリル/水抽出により総放射能の 93.1%が抽出された。最初の抽出操作により 90%以上の放射能が抽出されたためマイクロ波による抽出は実施しなかった。残留物中の放射能は、総放射能の 6.9%であった。

玄米中の主要な放射能は未変化のエチプロールであり、TRR の 62.3%を占めていた。

なお、玄米中の放射能分布については、白米中に 30%、糠中に 70%の割合で放射能が存在していた。

以上、エチプロールは

湛水処理された稲体におけるエチプロールの推定代謝経路を図 1 に示した。

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

図1 稲（湛水処理）における推定代謝経路

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。

3. 土壌中運命に関する試験

(1) 好氣的湛水土壌中運命試験

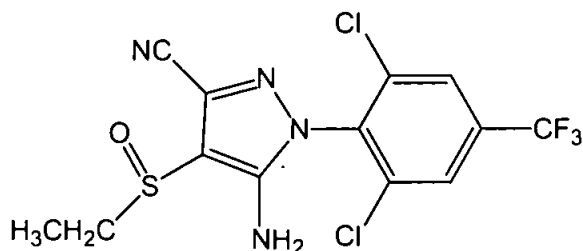
(資料 No. 代5)

試験機関：

報告書作成年：1999年[GLP対応]

供試標識化合物：

構造式：



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

標識位置の設定理由；

供試土壌：

採取した土壌は、礫および粗大有機物を取り除くため 2mm の篩にかけた後供試した。
供試土壌の特性を下表に示した。

	土壌 (砂壤土)
採取地	ローヌ・フランソワ社研究所(米国ノースカロライナ州)の池
砂	78.8%
シルト	14.4%
粘土	6.8%
有機物含量	3.08%
pH	5.7
陽イオン交換容量	4.57meq/100g
容水量 (1/3bar)	10.37%
かさ密度	1.27g/cc
微生物バイオマス (処理前)	173 $\mu\text{gC/g}$
微生物バイオマス (試験終了時)	108 $\mu\text{gC/g}$

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：

処理溶液調製；

保存溶液：¹⁴C標識エチプロールをアセトリルに溶解し、1.66 µg/µlの溶液を調製した。

溶液の比放射能は198,626 dpm/µlであった。

1倍量処理用：保存溶液361 µlを分取しアセトリルを加え4.4 mlとした。溶液の比放射能は16,296 dpm/µl *であった。

10倍量処理用：保存溶液361 µlを分取し、10 mg/mlの非標識エチプロール溶液を60 µl添加しアセトリルを加え0.9 mlとした。溶液の比放射能は72,534 dpm/µl*であった。

*:申請者の計算による

土壌の調製；

250 ml 容フラスコに遠心して上清を除いた土壌51g (乾土33gに相当)を採り、同じ池の水を100 ml 加えた。水と乾燥土壌の重量比は約4:1であった。また、別に土壌サンプルを用意し、土壌中の微生物バイオマスを測定した(測定結果は供試土壌の表中に記載した)。

被験物質の処理および処理量の根拠；

1倍処理区用として、0.46 ppmに相当(実圃場投下薬量として0.52 kg a. i. /ha)するように14 µg (1倍量処理用溶液103 µl)を33 gの土壌(乾土相当)に処理した(含水率の測定ミスにより実濃度は0.42 ppm)。

10倍処理区用として、4.6 ppmに相当(実圃場投下薬量として5.2 kg a. i. /ha)するように137 µg (10倍量処理用溶液100 µl)を33 gの土壌(乾土相当)に処理した(含水率の測定ミスにより実濃度は4.2 ppm)。

1倍処理区は想定処理量(0.40~0.60 kg a. i. /ha)の範囲内とした。さらに代謝の解明を容易にするため10倍処理区も併せて設けた。

土壌試料のインキュベーション；

被験物質を処理した容器および対照容器を、温度20±1°Cに調節したチャンバー内の暗黒下に置いた。各容器に四本のトラップを接続し、そのうち二本は揮発性物質捕集用トラップとした。二本目にはエチレングリコールを入れ揮発性有機物質トラップとし、四本目は2-エトキシエタノール:モノエタノールアミン(2:1, v/v)を用い14CO₂捕集用とした。容器には加湿空気を流した。サンプルリング時または月1回、試験系の水層及び土壌層の酸化還元電位を測定し、水層が好気条件であること及び土壌層底部が還元条件であることを確認した。

試料採取；

処理0、3、7、14日後、1、2、3、6、9および12ヶ月後に試験容器2本を取り出し、分析に供した。

分析方法：

揮発性物質の測定；

各試料採取時点で、捕集溶液を一部採取しLSCに供した。

抽出操作；

土壌

1) 土壌試料をアセトリル/水(80:20, v/v)で3回抽出した。

2) 1)における回収率が90%未満の場合、さらにアセトリル/水/酢酸(60:40:1, v/v)で3回抽出した。

3) 3~12ヶ月後試料については、さらにアセトン/水/りん酸(90:8:2, v/v)で1回抽出した後、0.5N水酸化ナトリウムで1回抽出した(高次抽出)。

得られた抽出液について濃縮操作を行い、濾過後HPLC分析(3を除く)を行った。また、放射エネルギーをLSCにより測定した。

抽出残渣は燃焼後、発生した14CO₂をLSCにより測定した。

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

水

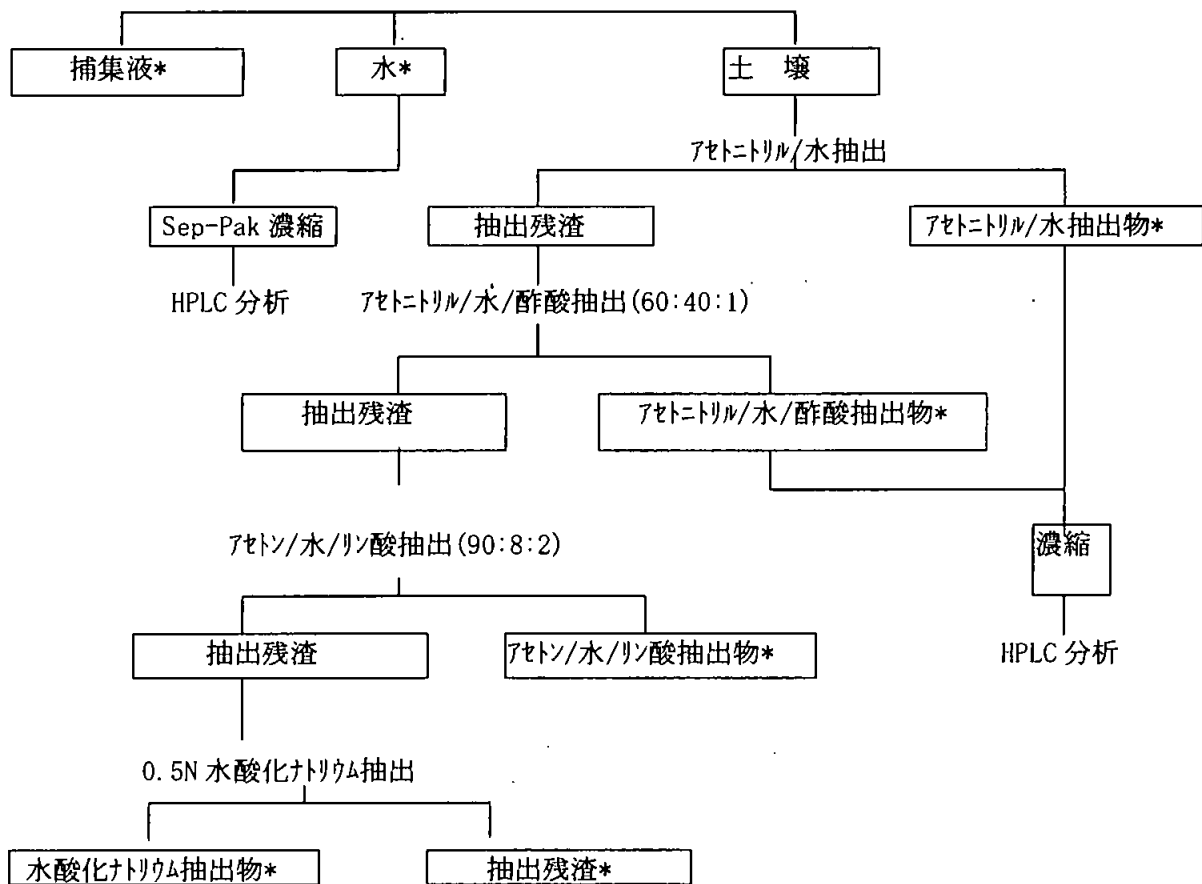
0 および 3 日目のサンプルは HPLC により直接分析した。他のサンプルは HPLC 分析の前に C18 カラムクロマトグラフィーにより精製した。また LSC により総放射能を測定した。

代謝物の確認；

HPLC のクロマトグラフィーにより同定された代謝物は、LC-MS/MS によるマススペクトル分析により確認した。

分析操作のフローチャートを下記に示した。

分析操作のフローチャート



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。

HPLC-MS/MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MS/MSによるマススペクトル分析により確認した。

結果：

酸化還元電位の測定結果より試験期間を通じて試験系は好氣的湛水状態を維持したことが確認された。

1倍処理区の分析で代謝物の同定が十分であったため、10倍処理区の分析は行わなかった。

1) 放射能分布

試験期間を通じて揮発性放射能は検出されなかった。処理放射能のほとんどすべてが湛水土壤中に分布していた。

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

水中の放射能は処理直後から減少（試験終了時 5.08%）し、14日後には処理放射能の約80%が土壤に移行した。2ヶ月後までは土壤中放射能の約90%以上がアセトニトリル/水系の抽出により回収されたが、3ヶ月以降の試料では回収率がやや低下したため引き続き高次抽出を行った。高次抽出により回収された放射能は経時的に増加したが試験終了時でも併せて10%程度であった。

結合残渣中の放射能は2ヶ月後（4.99%）まで経時的に増加した。3ヶ月以降の試料において低い値が認められたのは、高次抽出によるものである。

揮発性放射能は試験期間を通じて検出されなかった。

また総放射能回収率は試験期間を通じて（但し3ヶ月後試料における87.42%を除く）90%以上と良好であった。

抽出操作毎の処理放射能に対する回収放射能を表1に示した。

②代謝物の同定

エチプロールは好氣的湛水条件下で速やかに代謝された。

主要代謝経路は

。

抽出液中の未変化体及び代謝物の総放射能に対する割合を表2に示した。

③まとめ

エチプロールのDT50は水中で4日、土壤中で11日、両者合わせた湛水土壤としては5日であった。

エチプロールは好氣的湛水条件下において速やかに分解した。

図1にエチプロールの好氣的湛水土壤中における推定代謝経路を示した。

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

表 1 抽出操作毎の処理放射能に対する回収放射能 (%)

	処理後日数									
	0日	3日	7日	14日	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月
土壤中放射能										
アトニル:水	17.95	24.03	57.51	75.53	77.91*	74.48	64.11	70.68	73.58	67.50
アトニル:水:酢酸		0.18	0.58		-	1.44	1.80	3.16	3.29	4.03
結合残渣	n. d.	0.91	1.72	1.94	1.05	4.97	5.75**	9.53**	12.84**	14.34**
高次抽出(計)**							3.97	5.87	9.27	10.40
アトニル:水:リン酸							2.28	2.65	5.15	5.37
0.5N NaOH							1.69	3.22	4.12	5.03
結合残渣							1.78	3.66	3.57	3.94
水中放射能	89.41	71.13	37.46	19.76	11.95	10.58	15.76	10.49	5.15	5.08
揮発性放射能	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
合計回収率	107.36	96.25	97.27	97.23	90.91	91.47	87.42	93.85	94.86	90.94
試験期間を通じた平均回収率 : 94.76%										

*: 両抽出液を合わせて濃縮し分析した。

** : 申請者の計算による

n. d. : 検出されず

空欄は分析せず

表 2 : 抽出液中の未変化体及び代謝物の総放射能に対する割合 (%)

	処理後日数									
	0日	3日	7日	14日	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月*
水	89.42	71.13	33.82	9.28	3.90	7.11	10.86	7.36	4.28	2.15
エチアール[A] 土壌	8.15	8.36	5.64	3.74	5.08	3.36	8.21	3.35	40.23	9.19
合計	97.56	79.49	39.46	13.02	8.98	10.47	19.07	10.71	44.51	11.34
合計	97.56	93.83	92.25	87.63	88.93	72.35	76.45	71.14	80.46	75.10

* : 濃縮前の試料により分析した。

空欄は検出されず

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。

図1 好氣的湛水土壌中におけるエチプロールの推定代謝経路

(2) 好気性土壌代謝試験

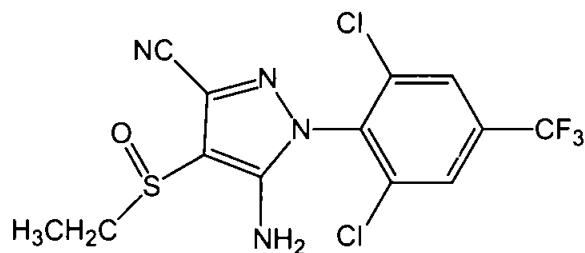
(資料 No. 代6)

試験機関：

報告書作成年：1999年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式；



(*: ¹⁴Cの標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ-α, α, α-トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルメチルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ¹⁴C 標識エチプロール)

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

標識位置の設定理由；

供試土壌：

採取した土壌は、礫および粗大有機物を取り除くため2mmの篩にかけた後供試した。
供試土壌の特性を下表に示した。

USDA による分類	シル質壤土	砂壤土
採取地	米国ミズーリ州	米国カリフォルニア州
砂	27%	61%
シルト	56%	33%
粘土	17%	6%
有機物含量	4.1%	0.6%
pH	6.1	7.8
pH (1N KCl)	NA	7.3
陽イオン交換容量	17.9 meq/100 g	6.2 meq/100 g
含水率 (1/3bar)	26.4%	9.8%
かさ比重	1.04 g/cc	1.38 g/cc
微生物バイオマス (処理前)	255.8 μgC/g	61.5 μgC/g
微生物バイオマス (試験終了時)	208.3 μgC/g	34.2 μgC/g

NA：分析せず

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

試験方法：

処理溶液の調製；

保存溶液：¹⁴C 標識エチプロールをアセトニトリルで溶解し 3.12 mg/ml の溶液を調製した。

溶液の比放射能は 374,378 dpm/μl であった。

1 倍量処理用：保存溶液 692 μl を分取しアセトニトリルを加え 7.2ml とした。溶液の比放射能は 35,982 dpm/μl* であった。

10 倍量処理用：保存溶液 577 μl を分取し、12mg/ml の非標識エチプロール溶液 150 μl 添加しアセトニトリルを加え 1.2ml とした。溶液の比放射能は 180,013 dpm/μl* であった。

*: 申請者の計算による

土壌調製；

それぞれ乾燥重量で 50g を採り、125ml 容フラスコに入れ、土壌水分を 0.33bar における最大容水量の約 75±5% に調整した。また、別に土壌サンプルを用意し、土壌中の微生物バイオマス測定した（測定結果は供試土壌特性の表中に記載した）。

被験物質の処理および処理量の根拠；

1 倍処理区用として、0.6 ppm (実圃場投下薬量として 0.68kg a. i. /ha 相当) となるように 30 μg (1 倍量処理用溶液 108 μl 相当) を土壌に処理した。

10 倍処理区用として、6 ppm (実圃場投下薬量として 6.8 kg a. i. /ha 相当) となるように 300 μg (10 倍量処理用溶液 100 μl 相当) を土壌に処理した。

1 倍処理区は予想最大投下薬量とした。さらに代謝の解明を容易にするため 10 倍処理区も併せて設けた（ただし最終的には 1 倍処理区で十分な知見が得られたので分析は省略した）。

土壌試料のインキュベーション；

被験物質で処理した容器および対照容器を、温度 25±1°C に調節したキャビネット内の暗黒下に置いた。各土壌の表面に加湿空気を流し、四本のトラップを接続し、そのうち二本は揮発性物質捕集用トラップとした。一本目にはエチルグリコールを入れ有機物質トラップとし、三本目は 2-エトキシエタノール:モノエタノールアミン (2:1, v/v) を用い CO₂ 捕集用とした。

土壌試料採取；

処理 0、7、14 日後、1、2、3、6、9 および 12 ヶ月後に、各土壌につき試験容器 2 本を取り出し、分析に供した。

分析方法：

揮発性物質の測定；

各試料採取時点で、捕集溶液を一部採取し放射能を測定した。

抽出操作；

1) 土壌試料をアセトニトリル/水 (80:20, v/v) で 3 回抽出した。

2) 1) における回収率が 90% 未満の場合、さらにアセトニトリル/水/酢酸 (60:40:1, v/v) で 3 回抽出した。

3) 180~365 日後の試料については、さらにアセトン/水/りん酸 (90:8:2, v/v) で 1 回抽出した後、0.5N 水酸化ナトリウムで 1 回抽出した（高次抽出）。

得られた抽出液について濃縮操作を行い、濾過後 HPLC 分析 (3 を除く) を行った。また、その放射能を測定した。

抽出残渣は燃焼後、放射能を測定した。

抽出操作のフローチャートを図 1 に示した。

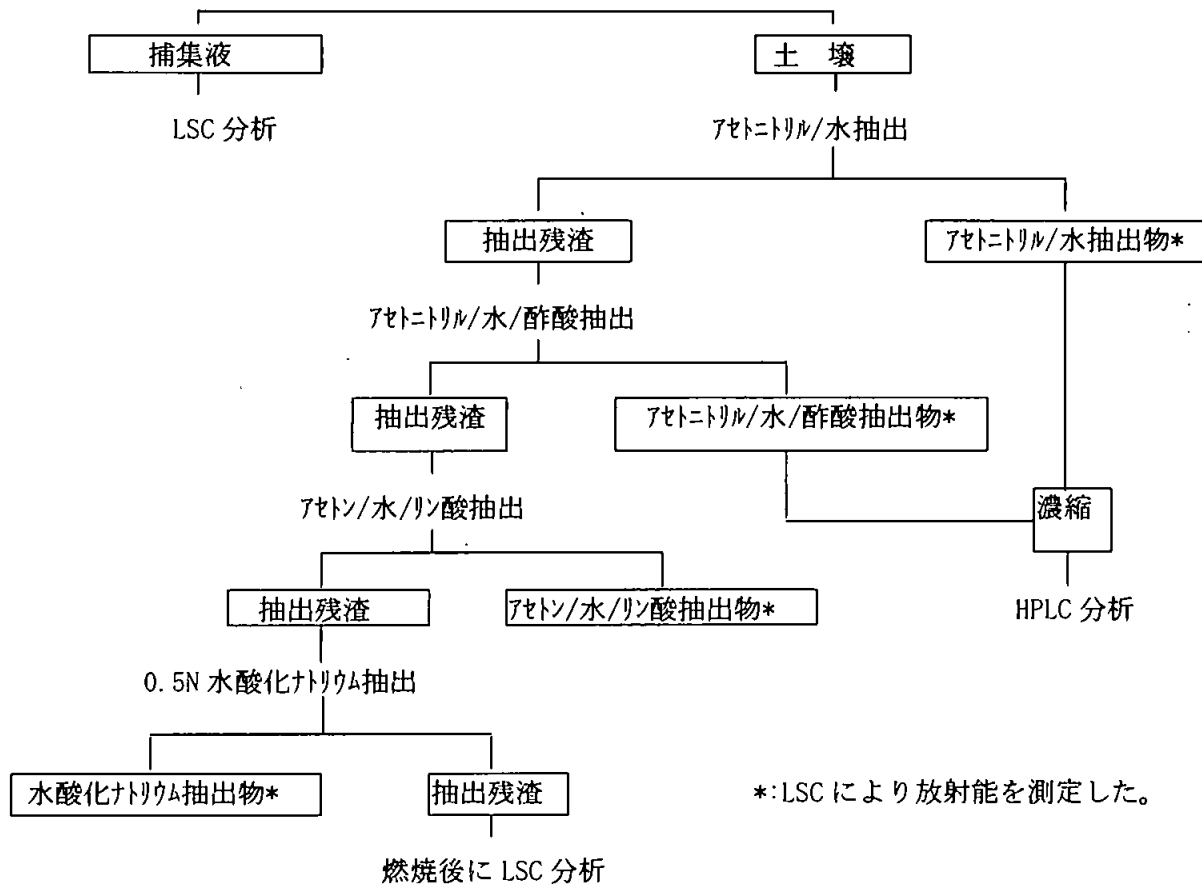


図1 抽出分析過程のフローチャート

機器分析；

総放射能測定

試料をサンプルオキシダイザー (Packard 387 Robotic Oxidizer)で燃焼し生成した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター (Packard 2500TR)で放射能を測定する (LSA 法)。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

HPLC分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS/MS分析

HPLC 分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物は LC-MS/MS によるマススペクトル分析により確認した。

結果：

1 倍処理区試験において代謝に関する十分な知見が得られたので、10 倍処理区試料については分析を省略した。

1) 放射能分布

シルト質壤土

試験期間を通じて揮発性放射能は検出されなかった。処理放射能のほとんどすべてが 土壤中に分布していた。

砂壤土

処理後 270 日まで揮発性放射能は検出されなかった。365 日後にはトラップ液中に放射能が認められたが、0.02%と極めて少量であり、処理放射能のほとんどすべてが土壤中に分布していた。

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。

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

シルト質壤土

試験期間を通じアセトニトリル:水系による抽出で83%以上の放射能が回収された。180日後まではほぼ90%以上と高い回収を得た。270および365日後の試料については引き続き高次抽出を行ったが、回収された放射能はいずれも5%程度であった。

残渣中の放射能は経時的に増加し180日後では9.46%であった。270および365日後の試料で、いずれも5%以下と180日後に比べて低かったのは高次抽出を行ったことに起因する。

抽出操作毎の処理放射能に対する回収放射能を下表に示した。

砂壤土

シルト質壤土と同様、アセトニトリル:水系による抽出で81%以上の放射能が回収された。60日後までは90%以上と高い回収を得た。180、270および365日後の試料については引き続き高次抽出を行ったが、回収された放射能はいずれも8%程度であった。

残渣中の放射能は経時的に増加し90日後では7.85%であった。180、270および365日後の試料で、いずれも90日後に比べて低かったのは高次抽出を行ったことに起因する。

抽出操作毎の処理放射能に対する回収放射能を下表に示した。

シルト質壤土 (単位: %)

	処理後日数								
	0日	7日	14日	30日	60日	90日	180日	270日	365日
抽出放射能(計)	98.33	96.70	94.88	91.81	92.38	88.10	90.80	88.59	83.51
アセトニトリル:水	98.33	96.70	94.88	91.81	87.51	83.23	85.68	81.27	73.55
アセトニトリル:水:酢酸					4.87	4.87	5.12	7.32	9.96
結合残渣	1.56	3.92	3.75	5.33	4.66	7.12	9.46	9.97*	9.66*
高次抽出(計)*								5.46	4.99
アセトニトリル:水:リン酸								3.00	3.07
0.5N NaOH								2.46	1.92
結合残渣								4.51	4.67
揮発性放射能	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
合計(回収率)	99.89	100.62	98.63	97.14	97.04	95.22	100.26	98.51	93.17
試験期間を通じた平均回収率 : 97.84%									

*: 申請者が計算

n. d. : 検出されず、また空欄は分析せず

砂壤土 (単位: %)

	処理後日数								
	0日	7日	14日	30日	60日	90日	180日	270日	365日
抽出放射能(計)	98.68	97.65	95.39	92.38	91.62	85.47	85.64	82.83	81.97
アセトニトリル:水	98.68	97.65	95.39	92.38	88.37	82.37	81.09	76.83	76.23
アセトニトリル:水:酢酸									
結合残渣	0.36	1.75	3.10	6.89	5.57	7.85	10.83*	15.86*	11.31*
高次抽出(計)*							7.29	8.15	7.67
アセトニトリル:水:リン酸							2.78	3.29	2.70
0.5N NaOH							4.51	4.86	4.97
結合残渣							3.54	7.71	3.64
揮発性放射能	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0.02
合計(回収率)	99.04	99.40	98.49	99.27	97.19	93.32	96.46	98.68	93.27
試験期間を通じた平均回収率 : 97.24%									

*: 申請者が計算

n. d. : 検出されず、また空欄は分析せず

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

②代謝物の同定

シルト質壤土

エチプロールは比較的速やかに分解した。試験終了時の処理放射能に対する割合は、僅か1.73%であった。

主要代謝物は

抽出液中の未変化体および代謝物の処理放射能に対する割合を下表に示した。

シルト質壤土における抽出液中の放射能特性 (単位：%)

	処理後日数								
	0日	7日	14日	30日	60日	90日	180日	270日	365日
エチプロール[A]	98.63	89.89	92.43	69.96	43.39	32.06	28.14	10.23	1.73
未同定代謝物		0.291)				1.192)			
合計	98.63	93.65	94.21	90.57	91.32	76.81**	94.99*	88.58*	86.28*

*: 同定された抽出性放射能の合計は、最初の2回の有機溶媒抽出の合計より多い。

** : 同定された抽出性放射能の合計は、最初の2回の有機溶媒抽出の合計より少ない。
濃縮過程における損失による。

空欄は検出されず

砂壤土

シルト質壤土と同様エチプロールは速やかに分解し、270日後には定量限界以下であった。

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

抽出液中の未変化体および代謝物の処理放射能に対する割合を下表に示した。

砂壌土における抽出液中の放射能特性（単位：％）

	処理後日数								
	0日	7日	14日	30日	60日	90日	180日	270日	365日
エチプロール[A]	99.63	86.59	66.76	48.21	40.43	10.18	1.61		
合計	99.63	92.98	93.80	89.28	90.01	80.71	91.80*	82.82*	82.82*

*: 同定された抽出性放射能の合計は最初の2回の有機溶媒抽出の合計より多い。

③まとめ

シルト質壌土におけるエチプロールのDT50は71日であった。また砂壌土では30日であった。
好気条件下の土壌における主要代謝経路は

好氣的土壌中におけるエチプロールの推定代謝経路を図2に示した。

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

図2 好氣的土壤中におけるエチプロールの推定代謝経路

(3) 嫌氣的土壤中運命試験

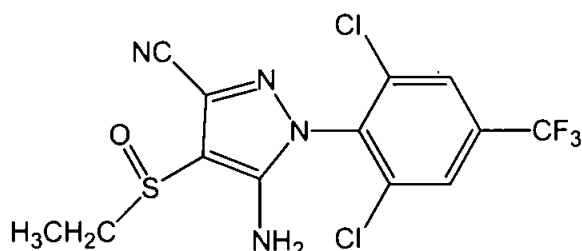
(資料 No. 代7)

試験機関：

報告書作成年：1999年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：



(*: ¹⁴Cの標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ¹⁴C 標識エチプロール)

比放射能； 放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

標識位置の設定理由：

供試土壌：

採取した土壌は、礫および粗大有機物を取り除くため 2 mm の篩にかけた後供試した。
土壌の特性を下表に示した。

USDA による分類	壤土
採取地	英国エセックス州オンガ-の圃場
砂	33.39%
シルト	42.44%
粘土	24.15%
有機物含量	3.9%
pH	6.5
pH(1M KCL)	5.3
カチオン交換容量	9.95 meq/100 g
容水量	19.98%
微生物バイオマス (処理前)	68 μ gC/g
微生物バイオマス (試験終了時)	61 μ gC/g

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：

処理溶液調製；

^{14}C 標識エチプロールをアセトリルに溶解し、 $0.59 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の溶液を調製した。溶液の比放射能は $101,318 \text{ dpm}/\mu\text{l}$ (申請者の計算による) であった。

土壌の調製；

フラスコに乾土相当で 100 g の土壌を採り、水深が 2 cm 以上になるように脱イオン水を加えた。また、別に土壌サンプルを用意し、土壌中の微生物バイオマス測定した (測定結果は供試土壌の表中に記載した)。

被験物質の処理および処理量の根拠；

想定最大処理量 ($0.60 \text{ kg a. i.}/\text{ha}$) に合わせるため処理溶液 $100 \mu\text{l}$ を試料に添加した。

試料中の濃度は 0.59 ppm であり実圃場での $0.59 \text{ kg a. i.}/\text{ha}$ に相当した。

土壌試料のインキュベーション；

被験物質を処理する前に試料を、温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節したチャンパー内にてプレインキュベーションを行った。各容器には 2MKOH の入った二本の揮発性物質捕集用トラップを接続し、システムに窒素を通じた。システムを嫌気状態にするため 35 日間プレインキュベーションを行った。

プレインキュベーションの後、被験物質を処理した試料および対照試料容器を遮光性の袋に入れ、再びチャンパー内に設置した。

試料中の酸化還元電位を測定し、嫌気性を確認した。

試料採取；

処理 $0, 6$ 時間、 $1, 2, 3, 7, 14, 28, 57, 87$ および 118 日後に試験容器を取り出し、分析に供した。

分析方法：

揮発性物質の測定；

各試料採取時点で、捕集溶液を一部採取し LSA に供した。

抽出操作；

土壌

土壌試料をアセトリルで 1 回さらにアセトリル/水 ($80:20, \text{v/v}$) で 2 回抽出した。

得られた抽出液について濃縮操作を行い、濾過後 HPLC 分析を行った。また、放射エネルギーを LSC により測定した。

抽出残渣は燃焼後、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を LSC により測定した。

水

HPLC により直接分析した。放射能濃度が低い場合には濃縮した。また LSC により総放射能を測定した。

代謝物の確認；

HPLC のクロマトグラフィーにより同定された代謝物は、LC-MS によるマススペクトル分析により確認した。

分析操作のフローチャートを図 1 に示した。

機器分析；

総放射能測定

水試料および抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。抽出残渣についてはサンプルオキシダイザー (Packard 387 Robotic Oxidizer) で燃焼後、生成した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS6500 等) で放射能を測定する (LSA 法)。

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

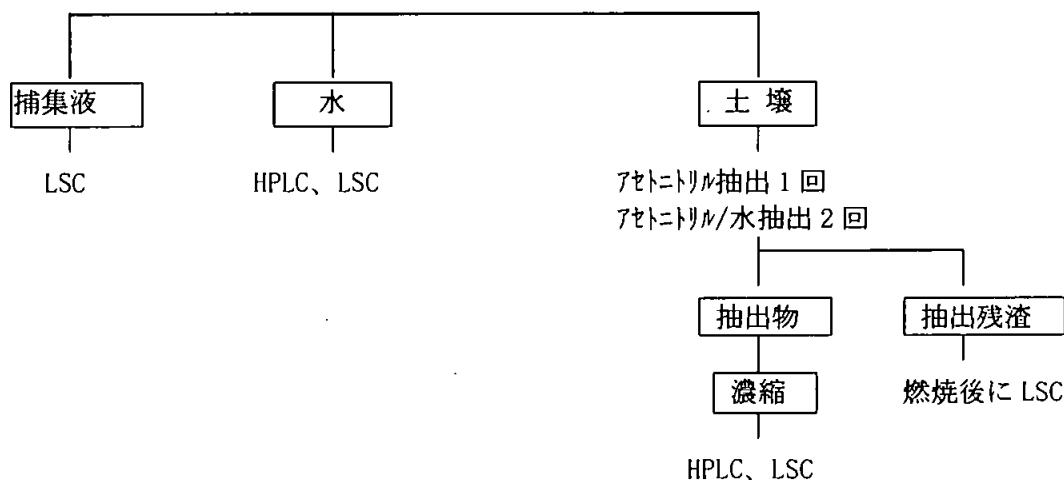
HPLC分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MSによるマススペクトル分析により確認した。

図1 抽出分析過程のフローチャート



結果：

酸化還元電位の測定結果より試験期間を通じて試験系は嫌気の状態を維持したことが確認された。

1) 放射能分布

揮発性放射能が処理6時間後から認められたが、ごく僅か(<0.04%)であった。試験期間を通じ処理放射能のほとんどすべてが湛水土壤中に分布していた。

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

水中の放射能は処理直後から減少(試験終了時4.36%)し、28日後には処理放射能の約80%が土壌に移行した。

土壌抽出液および水中の放射能の合計は試験期間を通じて92%以上と、極めて高い回収性を示した。

揮発性放射能は極めて僅かではあるものの処理6時間後より認められ(0.04%)57日後まで同レベルで推移した。

結合残渣中の放射能は経時的に増加し試験終了時には15.77%に達した。

抽出操作後の画分ごとの処理放射能に対する回収放射能を表1に示した。

②代謝物の同定

エチプロールは嫌気的条件下で速やかに代謝された。

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

土壌抽出液ならびに水中の未変化体および代謝物の総放射能に対する割合を表2に示した。

表1 抽出操作毎の処理放射能に対する回収放射能 (%)

	処理後日数										
	0時間	6時間	1日	2日	3日	7日	14日	28日	57日	87日	118日
土壌抽出液		11.67	20.22	33.70	39.31	49.89	58.98	81.37	88.11	88.37	88.39
水	105.91	91.93	87.33	73.27	67.78	49.88	37.06	17.35	7.17	6.62	4.36
抽出物合計	105.91	103.60	107.55	106.97	107.09	99.77	96.04	98.72	95.28	94.99	92.75
揮発性放射能		0.04	0.04	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04		
結合残渣		0.48	0.57	2.89	3.83	5.09	8.95	7.33	11.07	10.77	15.77
合計回収率	105.94	104.12	108.15	109.87	110.96	104.90	105.03	106.09	106.38	105.75	108.52
試験期間を通じた平均回収率 : 106.88%											

空欄は検出されず

表2 抽出液中の放射能特性 (処理放射能に対する割合%)

	処理後日数										
	0時間	6時間	1日	2日	3日	7日	14日	28日	57日	87日	118日
土壌		11.67	19.07	29.11	32.73	30.15	19.00	8.19	5.91	2.37	2.21
エチアール[A] 水	105.91	91.93	87.33	73.27	65.36	44.20	28.89	6.30	0.42	0.20	
合計	105.91	103.60	106.40	102.38	98.09	74.35	47.89	14.49	6.33	2.57	2.21
合計 土壌	0.00	11.67	20.22	33.70	39.31	49.89	58.98	81.37	88.11	88.37	88.39
水	105.91	91.93	87.33	73.27	67.78	49.88	37.06	17.35	7.17	6.62	
合計	105.91	103.60	107.54	106.97	107.09	99.77	96.04	98.72	95.28	94.98	88.39

空欄は検出されず

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。

③まとめ

エチプロールの DT50 は水中で 5.6 日、土壌中で 11 日、両者合わせた湛水土壌としては 11.2 日であった。

エチプロールは嫌気条件下において速やかに分解した。

下記にエチプロールの嫌氣的土壌中における推定代謝経路を示した。

嫌氣的土壌中におけるエチプロールの推定代謝経路

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) 代謝物 の嫌氣的土壤中運命試験

(資料 No. 代8)

試験機関：

報告書作成年：2001年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式；

(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；

比放射能；

放射化学的純度；

供試非標識化合物：

純度；

標識位置の設定理由；

供試土壌：

供試土壌の特性を下表に示した。

USDA による分類	砂壤土
採取地	英国エセックス州ホガ-の圃場
砂	60.4%
シルト	30.0%
粘土	9.6%
有機物含量	3.46%
pH	5.0
かさ密度	1.41 g/cc
カation交換容量	11.0 meq/100g
最大容	28.98%
微生物バイオマス (処理前)	247 $\mu\text{gC/g}$
微生物バイオマス (試験終了時)	128 $\mu\text{gC/g}$

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：

処理溶液調製；

^{14}C 標識 をアセトリルに溶解し、 $1.81 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の保存溶液を調製した。保存溶液の比放射能は $167,000 \text{ dpm}/\mu\text{l}$ であった。この保存溶液 1.145 ml にアセトリル 2.185 ml を加え投与溶液 ($111,387 \text{ dpm}/\mu\text{l}$) とした。

土壌の調製；

採取した土壌は半乾燥後、礫および粗大有機物を取り除くため 2mm の篩にかけた後、供試した。フラスコに乾土相当で 100g の土壌を採り、最大容水量の $45\% \sim 5\%$ になるよう水分を調節した。また別に土壌サンプルを用意し、土壌中の微生物バイオマス測定した（測定結果は供試土壌の表中に記載した）。

被験物質の処理および処理量の根拠；

想定最大処理量 ($0.60 \text{ kg a. i. /ha}$) に合わせるため処理溶液 $80 \mu\text{l}$ を試料に添加した。試料中の濃度は 0.53 ppm であり実圃場での $0.53 \text{ kg a. i. /ha}$ に相当した。

土壌試料のインキュベーション；

被験物質を処理する前に試料を、温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節したチャンバー内にてプレインキュベーションを行った。各容器にはエフリングリコール（揮発性有機物質捕集用）および 2-エトキシエタノール：エタノールアミン ($2:1, \text{v/v}$) (CO_2 捕集用) の入った二本の揮発性物質捕集用トラップを接続し、システムに加湿空気を通じ、1週間プレインキュベーションを行った。

プレインキュベーションの後、被験物質を処理した試料および対照試料容器を好気条件下で 30日間インキュベーションを行った。

その後、各試料に脱イオン水 200 ml を加えガス供給を空気から窒素に変え、好気条件から嫌気条件とした。嫌気条件に切り替えた後は試料中の酸化還元電位を測定し、嫌気性を確認した。

試料採取；

処理 30日後（好気条件下）および水添加後 0、14、30、60、90、180、270 および 365 日後に試験容器を取り出し、分析に供した。

分析方法：

揮発性物質の測定；

各試料採取時点で、捕集溶液を一部採取し LSC に供した。

抽出操作；

土壌

土壌試料をアセトリル/水 ($80:20, \text{v/v}$) で 3回抽出した。抽出液を遠心分離し上清を合わせ HPLC 分析を行った。また、放射エネルギーを LSC により測定した。

抽出残渣は燃焼後、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を LSC により測定した。

水

遠心分離後 HPLC により直接分析した。また LSC により総放射能を測定した。

代謝物の確認；

HPLC のクロマトグラフィーにより同定された代謝物は、LC-MS/MS によるマススペクトル分析により確認した。

分析操作のフローチャートを図 1 に示した。

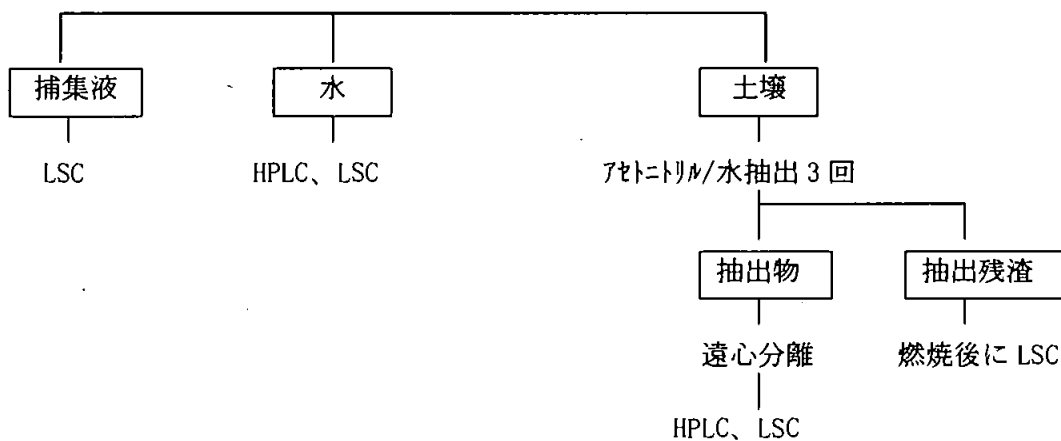


図 1 抽出分析過程のフローチャート

機器分析；

総放射能測定

水試料及び抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。抽出残渣についてはサブオキシダizer (Packard 387 Robotic Oxidizer) で燃焼後、生成した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS6500 等) で放射能を測定する (LSA 法)。

HPLC 分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

HPLC-MS/MS 分析

HPLC 分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物は LC-MS/MS によるマススペクトル分析により確認した。

結果：

酸化還元電位の測定結果より水を添加後 30 日以降、試験系は嫌気的狀態を維持したことが確認された。

1) 放射能分布

揮発性放射能は試験期間を通じて認められなかった。処理放射能のほとんどすべてが湛水土壌中に分布していた。

2) 代謝

① 残留放射能の特徴付け

水中の放射能は水添加直後から上昇したが、14 日後には放射能濃度は平衡に達しており、試験終了時まで 25% 前後で推移した。

土壌抽出液及び水中の放射能の合計は試験期間を通じて 92% 以上と、極めて高い回収性を示した。

揮発性放射能は試験期間を通じて認められなかった。

結合残渣中の放射能は経時的に増加し試験終了時には 7.67% に達した。

抽出操作後の画分毎の処理放射能に対する回収放射能を表 1 に示した。

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

表 1 画分毎の処理放射能に対する回収放射能 (%)

	処理後日数								
	30	30(0)	4	60(30)	90(60)	120(9)	210(180)	300(270)	395(365)
土壌抽出液		81.06	69.84	68.16	70.32	74.11	69.49	69.85	68.00
水		14.44	29.01	26.06	24.25	21.62	22.60	25.09	21.83
抽出物合計	95.54	95.50	98.85	94.22	94.57	95.73	92.09	94.94	89.83
揮発性放射能	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
結合残渣	1.84	1.59	1.83	2.06	3.89	3.88	5.88	6.62	7.67
合計回収率	97.38	97.09	100.68	96.28	98.46	99.61	97.97	101.56	97.50
試験期間を通じた平均回収率 : 98.51%									

ND: 検出されず

*カッコ内の数字は水添加後の経過日数

②代謝物の同定

は嫌氣的条件下で代謝されたが、その減衰は緩やかなものであった。

処理後 30 日の好気条件下で土壌中に認められ、その後の嫌気条件下においても試験終了時 () まで増加した。同定された代謝物は 。未同定代謝物は

土壌抽出液ならびに水中の未変化体および代謝物の総放射能に対する割合 (%) を下表に示した。

	処理後日数								
	30	30(0)	44(14)	60(30)	90(60)	120(90)	210(180)	300(270)	
土壌	93.35	80.61	67.84	66.71	67.93	68.21	60.14	56.46	51.32
[B] 水		14.13	27.53	24.69	22.19	17.02	13.23	11.39	6.81
合計	93.35	94.74	95.37	91.40	90.12	85.23	73.37	67.85	58.13
合計	95.54	81.07	69.84	68.16	70.32	74.11	69.49	69.85	68.00
水		14.43	29.01	26.06	24.26	21.63	22.61	25.09	21.83
合計	95.54	95.50	98.85	94.22	94.58	95.74	92.10	94.94	89.83

カッコ内の数字は水添加後の経過日数

空欄は検出されず

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。

③まとめ

の DT50 は 535 日であった。

の嫌氣的条件下における推定代謝経路を下記に示した。

嫌氣的条件下における の推定代謝経路

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. 水中運命に関する試験

(1) 加水分解運命試験

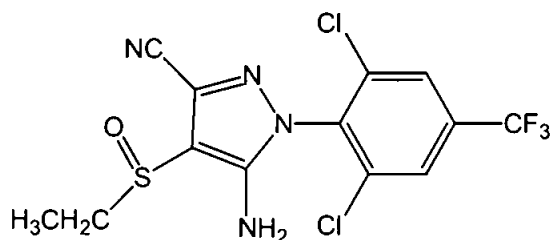
(資料 環 1)

試験機関：

報告書作成年：1998年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能； 放射化学的純度；

標識位置の設定理由；

比放射能； 放射化学的純度；

供試水溶液；

pH4 (測定値=4.00)：クエン酸塩 (0.1M)

pH5 (測定値=4.97)：酢酸塩 (0.1M)

pH7 (測定値=7.06)：リン酸塩 (0.1M)

pH9 (測定値=8.98)：ホウ酸塩 (0.01M)

試験方法；

試験に先立ち、試験容器/器具等をオートクレーブで滅菌処理した。緩衝液については 0.22 μm のフィルターを通すことにより滅菌した。

被験物質処理；

試験溶液は、 ^{14}C 標識エチプロール/アセトニトリル溶液 245 μl を各緩衝液 75 ml に加えて (溶媒濃度は約 0.3%) 3 ppm になるよう調製した。これは水溶解度 (9.2 mg/l) の 3 分の 1 である。

各緩衝液の実測濃度は、以下の通りであった。

pH4：3.00 ppm、pH5：2.99 ppm、pH7：2.94 ppm、pH9：2.99 ppm

インキュベーション；

被験物質を処理した各緩衝液 5ml をネジ栓付きバレルックス管に分注し 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ の暗条件下でインキュベーションした。

試料採取時期；0、3、6、14、21 および 31 日目

分析方法；

総放射能測定

試験溶液の一部を直接液体シンチレーションカウンター (LS 6000 IC, Beckman) で測定した。

HPLC 分析

分解物を同定するため標準品とのコクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。

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

LC-MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MSによるマススペクトル分析により確認した。

結果

1) 放射能分布

試験期間を通じ放射能の回収率はほぼ100%であり、処理放射能は緩衝液中に存在した。容器への吸着等による回収の低下は認められず極めて良好な物質収支を得た。従って揮発性物質の測定は省略した。

各採取時点における緩衝液中の放射能濃度と処理放射能に対する割合を下表に示した。

経過日数	pH4		pH5		pH7		pH9	
	放射能* (dpm/mL)	回収率 (%)	放射能* (dpm/mL)	回収率 (%)	放射能* (dpm/mL)	回収率 (%)	放射能* (dpm/mL)	回収率 (%)
処理放射能	359873		357740		353513		359708	
0	365548	101.6	360396	100.7	360282	101.9	359933	100.1
3	367228	102.1	363128	101.5	358481	101.5	365368	101.6
6	353234	98.2	350877	98.1	349412	98.9	355237	98.8
14	356736	99.1	359225	100.5	354607	100.4	357285	99.3
21	356523	99.1	356611	99.7	350045	99.1	356097	99.0
31	354796	98.6	359941	100.6	352734	99.8	361600	100.6
平均回収率		99.8±2.1		100.2±1.3		100.2±1.4		99.9±1.3

*:n=2の平均値であり申請者が計算した。

2) 分解

pH4, 5 および 7 においてエチプロールは安定であった。緩衝液中の放射能はごく僅かな未同定物質を除いては未変化エチプロール(約97~99%)であった。

pH9においてはエチプロールは徐々に分解し(31日後で82.75%)、それに伴い

が生成された(31日後で11.80%)。未同定分解物については他の緩衝液中より若干多く生成された。

親化合物および分解生成物の経時変化を表1に示した。

3) 推定半減期

エチプロールの加水分解反応を、擬一次反応に従うものとし、下記の計算式を用いて半減期を求めた。

但しpH4, 5 および 7 では、速度定数が極めて小さかったので、意味のある半減期は計算できなかった。

$$\text{半減期}(T_{1/2}) = \ln 2 / \text{勾配}$$

[但し勾配はデータの回帰直線より得られる傾き(速度定数)の絶対値]

試験温度	pH	推定半減期	速度定数
25±1℃	9	121日	-0.0057

表 1 水中放射能の経時的変化（処理放射能に対する割合%）

	経過日数	エチプロール[A]		
pH4	0	98.15		
	3	98.28		
	6	97.97		
	14	98.32		
	21	98.35		
pH5	0	98.49		
	3	98.31		
	6	98.15		
	14	98.49		
	21	96.83		
pH7	0	98.66		
	3	98.25		
	6	97.68		
	14	98.31		
	21	96.39		
pH9	0	98.20		
	3	97.20		
	6	96.83		
	14	93.57		
	21	87.31		

n. d. : 検出されず

4) まとめ

加水分解試験においては pH9 の緩衝液中でのみエチプロールの明確な分解が認められ、その推定半減期は 121 日であった。

エチプロールの加水分解による推定分解経路を下記に示した。

エチプロールの推定加水分解経路

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。

(2) 水中光分解試験 (滅菌緩衝液)

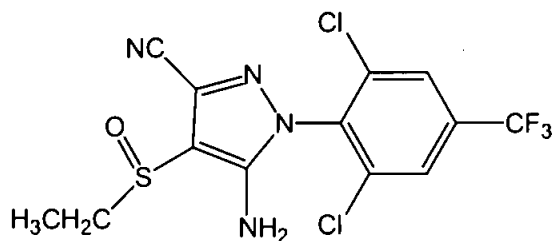
(資料 環 2)

試験機関:

報告書作成年: 2000 年 [GLP 対応]

供試標識化合物:

構造式:



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名; 5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィンビラゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能; 放射化学的純度;

標識位置の設定理由:

供試溶液: 滅菌緩衝液 (20mM クエン酸緩衝液)、pH5 (加水分解試験において分解が認められない pH)

試験方法:

試験に先立ち、試験容器/器具、緩衝液等をオートクレーブで滅菌処理した。

被験物質処理:

試験溶液は、 ^{14}C 標識エチプロール/アセトリル溶液 (0.303 mg/ml) 1.0ml を各緩衝液 99 ml に加えて (溶媒濃度は約 1.0%) 3 ppm になるよう調製した。これは水溶解度 (9 mg/l) の 3 分の 1 である。

インキュベーション;

光照射区

試験温度: $25 \pm 1^\circ\text{C}$

試験容器: パイレックス製光化学リアクター

試験期間: 供試水を入れた容器を光照射器内に 16 時間設置した。

光照射器: Suntest (HERAEUS)、1000W キセノンランプ付き (290nm 以下はフィルターで除去した。)

光強度; 730W/m² (測定波長範囲 290nm~800nm)

暗対照区

試験温度: $25 \pm 1^\circ\text{C}$

試験期間: 供試水を入れた容器を、インキュベーター内に暗黒下 16 時間設置した。

試験容器: SCHOTT ボトル (硼珪酸ガラス)

加水分解試験の結果より揮発性物質が生成されないことから、揮発性物質の捕集は行わなかった。

試料採取時期; 照射 0、3、5、8、12.3 および 16 時間後に試料を採取した。

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。

分析方法；

総放射能測定

試験溶液の一部を直接液体シンチレーションカウンター(Tricarb 4430 Minaxi β Packard)で測定した。

HPLC分析

分解物を同定するため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。試料は標準溶液と共に直接注入した。

LC-MS分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はLC-MSによるマスペクトル分析により確認した。

結果

1) 放射能収支

試験期間を通じて照射区および暗対照区とも放射能の回収率は90%以上であり、処理放射能は緩衝液中に存在した。

各採取時点における緩衝液中の放射能濃度と処理放射能に対する割合を下表に示した。

	照射区						暗対照区
	0時間	3時間	5時間	8時間	12時間	16時間	16時間
初期放射能	72863 dpm/200 μ l						
放射能(dpm/200 μ l)	72863	74174	70972	70603	71987	68931	71305
回収率(%)	100.00	98.46	97.41	96.90	98.80	94.60	97.87
平均回収率(%)	97.34						

2) 分解物の同定

照射区試料において、HPLC分析により 種類の分解物が認められた。

照射区における各試料採取時点での放射能特性を下表に示した。

暗対照区においては供試水中の放射能は全て未変化のエチプロールであった。

	照射区						暗対照区
	0時間	3時間	5時間	8時間	12時間	16時間	16時間
エチプロール[A]	100.00	70.67	56.38	39.62	24.48	18.55	100.00

(数値は初期放射能に対する%)

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

3) 推定半減期

エチプロールの水中分解反応を、擬一次反応に従うものとし ($r^2=0.995$)、下記の計算式により半減期を求めた。

$$DT_{50}(\text{半減期}) = \ln(1/2)/k, \quad \ln(C/C_0) = kT$$

C_0 = エチプロールの初期濃度

C = 時間 T におけるエチプロールの濃度

k = 速度定数

	Suntest 時間	夏期太陽光日数	春期太陽光日数
		(北緯 20° ~ 50°)	(北緯 35°)*
DT_{50}	6.46 時間	1.3 日	2.0 日

*: 申請者の計算による

以上の結果から、緩衝液中におけるエチプロールの光分解経路を下記のとおり推定した。

エチプロールの緩衝液中における推定光分解経路

(3) 水中光分解試験 (滅菌自然水)

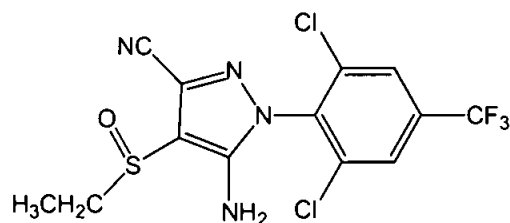
(資料 環 3)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式；



(*: ^{14}C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニル ^{14}C -ラゾール-3-カルボニトリル
(以下 ^{14}C 標識エチプロール)

比放射能； 放射化学的純度；

標識位置の設定理由；

供試溶液：滅菌自然水 (水面下 10~20 cm より採取し、0.2 mm のフィルターで濾過した池水)

試験方法：

試験に先立ち、試験容器/器具、供試水等をオートクレーブで滅菌処理した。

被験物質処理；

試験溶液は、 ^{14}C 標識エチプロール/アミノトリル溶液 (2.22 mg/1.4ml) 0.66 ml を供試水に加えて 235 ml (溶媒濃度は約 0.3%) とし、4.354 ppm 溶液として調製された。これは水溶解度 (9.2 mg/l) のおよそ 2 分の 1 である。

インキュベーション；

光照射区

試験温度：25 \pm 0.2 $^{\circ}\text{C}$

試験容器：パイレックス製インキュベーション瓶に 2 本の捕集管 (揮発性有機物および CO_2 の捕集) を接続したもの。

試験期間：供試水を入れた容器を光照射器内に 96 時間設置した。

光照射器：Suntest CPS (HERAEUS)、1800 W キセノンランプ付き (290 nm 以下はフィルターで除去した。)

光強度；765 W/m^2 (測定波長範囲 300 nm~800 nm)

暗対照区

試験温度：25 \pm 0.2 $^{\circ}\text{C}$

試験期間：供試水を入れた容器を、インキュベーター内に暗黒下 48 時間設置した。

試験容器：パイレックス製インキュベーション瓶に 2 本の捕集管 (揮発性有機物および CO_2 の捕集) を接続したもの。

加水分解試験の結果より揮発性物質が生成されないことから、暗対照区については揮発性物質の捕集は行わなかった。

試料採取時期；光照射区、暗対照区とも 0、2、4、8、24、48 および 96 時間 (光照射区のみ) 後に試料を採取した。

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。

分析方法；

総放射能測定

各試料採取時の試験溶液（捕集管中の捕集溶液も同時に採取）の一部を直接液体シンチレーションカウンター(Tricarb 2500TR, Packard)で測定した。

HPLC分析

分解物を同定あるいは特徴付けするため標準品とのクロマトグラフを行った。また、親化合物およびその分解生成物の定量を行った。試料は標準溶液と共に直接注入した。

TLC分析

HPLC分析におけるクロマトグラフィーにより同定された分解物はTLC分析により確認した。

結果

1) 放射能収支

試験期間を通じて光照射区および暗対照区とも放射能の回収率は94%以上であった。各採取時点における供試水中および捕集液中の放射能濃度と処理放射能に対する割合を下表に示した。

光照射区の放射能回収率（処理放射能に対する%）

	0 時間	2 時間	4 時間	8 時間	24 時間	48 時間	96 時間
供試水中の放射能	100.0	96.4	98.5	98.7	95.1	92.1	80.2
¹⁴ CO ₂		<0.1	<0.1	<0.1	0.3	2.0	14.7
揮発性放射能		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
合計	100.0	96.4	98.5	98.7	95.4	94.1	94.9

暗対照区の放射能回収率（処理放射能に対する%）

	0 時間	2 時間	4 時間	8 時間	24 時間	48 時間
供試水中の放射能	100.0	98.4	95.9	96.7	98.5	95.5
¹⁴ CO ₂		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
揮発性放射能		<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.2
合計	100.0	98.4	95.9	96.8	98.6	95.7

2) 分解物の同定

光照射区試料において、HPLC分析により 種類の分解物が認められた。

光照射区における各試料採取時点の放射能分布を表1に示した。

暗対照区においては供試水中の放射能は全て未変化のエチプロールであった。また少量の揮発性分解物も認められた。

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

図1 自然水中の推定光分解経路

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。

5. 土壌吸着試験

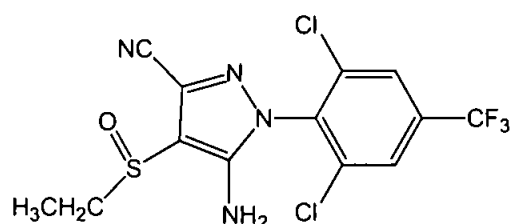
(資料環4)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：



化学名：5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスフイルニルイミダゾール-3-カルボニトリル
(以下エチプロール)

純度：

供試土壌：本試験においては、OECDテストガイドラインに示されている7つの土壌タイプのうち、タイプ2、3、4ならびに5として、Hatzenbeler土壌、Oregon土壌、栃木土壌ならびに宮崎土壌の4土壌を用いた。このうち栃木土壌は農林水産省の試験指針に示されている火山灰土壌として選定した。各供試土壌の性質を下表に示した。

土壌番号	EFS-192	EFS-150	IET-002	JPPA-20
土壌名	Hatzenbeler	Oregon	栃木	宮崎
採取場所	Painesville, Ohio St., USA	Washington Country, Oregon St., USA	栃木県鹿沼市	宮崎県宮崎郡 砂土原町
土性 (USDA)	Clay Loam	Silt Loam	Clay Lome	Sand
砂	32%	22%	31.0%	90.1%
シルト	36%	60%	44.5%	5.2%
粘土	32%	18%	24.5%	4.7%
有機炭素含有率	3.1%	2.2%	11.0%	0.96%
有機物含有率	5.4%	3.8%	19.0%	1.67%
窒素含有率	0.211%	0.154%	0.416%	0.09%
pH 0.01mol/L CaCl ₂	7.1	5.5	4.6	4.6
陽イオン交換用量 (me/100g)	18.9	13.1	16.8	6.4
リン酸吸収係数	740	910	2590	510
粘土鉱物の種類	イライト クロライト	クロライト	アロフェン	アロフェン ハロサイト
土壌水分量 (乾土 10g 相当)	6.23% (10.62g)	2.81% (10.28g)	47.35% (14.74g)	0.94-1.49% (10.09-10.15g)

試験方法：

1) 土/水比の設定

予備平衡化した試料に初期水相中濃度として4 mg/Lの被検物質を施用後、25°Cに設定した恒温振とう機で24時間振とうした。振とう後、遠心分離により得た上澄液面分と土壌面分の被検物質濃度を測定し、吸着率(A)ならびに吸着係数(Kd)を算出した。得られた吸着係数に基づき吸着率が20%以上となるように土/水比を設定した。

2) 吸着平衡時間の設定

予備平衡化した試料に初期水相中濃度として 4mg/L の被検物質を施用後、25°C に設定した恒温振とう機で振とうし、4、8、16、24 時間および 48 時間後に試料を採取し、各時点における上澄液中の被検物質濃度を測定し、吸着平衡時間を定めた。

次いで、吸着平衡時における吸着率(Aeq)、吸着係数(Kd(eq))、有機炭素含有率により補正した吸着係数(Koc(eq))を算出した。

3) 吸着等温線の作成

吸着平衡振とうを、Oregon ならびに宮崎土壌では 24 時間、Hatzenbeler ならびに栃木土壌では 48 時間とし、各々 0.08、0.2、0.5、2、4 の 5 濃度で試験を実施した。

上澄液中の被検物質濃度を測定し、Freundlich の吸着定数(KF)等のパラメーターを求めた。

分析方法；

上澄液画分

C18 および SCX ミニカラムで精製し、HPLC で定量した。

土壌画分

アセトニトリルで抽出、C18 およびアルミナミニカラムで精製し、HPLC で定量した。

結果

1) 土/水比

最も有機炭素含有率の高い栃木土壌と低い宮崎土壌を用い試験を行った。

土/水比 1/5 における各土壌の吸着率は 47% ならびに 24% であり、吸着係数は 4.44 ならびに 1.56 であった。得られた吸着係数に基づき、土/水比を 1/5(10g/50ml) に設定した。

2) 吸着平衡時間

連続する 2 時点の濃度差が 10% 以内となることを考慮し、各土壌における吸着平衡時間を Oregon ならびに宮崎土壌で 24 時間、Hatzenbeler ならびに栃木土壌で 48 時間とした。吸着平衡時の土壌特性パラメーターを下記に示した。

試料	振とう時間	吸着率 (%)	吸着係数	有機炭素含有率 (%)	有機炭素含有率により補正した吸着係数
Hatzenbeler	48	47	4.50	3.10	145
Oregon	24	28	1.96	2.20	89.1
栃木	48	53	5.56	11.1	50.5
宮崎	24	24	1.56	0.96	163

3) 吸着等温線

各土壌において得られた Freundlich の吸着等温式の相関係数(γ^2)はいずれも 0.998 以上と有意な直線性が認められ、エチプロールの土壌に対する吸着性は Freundlich の吸着等温式に従うと判断された。

Freundlich の吸着等温式から得られたパラメーターを表 1 に示した。

有機炭素含有率と Freundlich の吸着係数(KF)の相関係数は 0.688 であり、有意な相関関係は認められなかった。

4) 物質収支

各土壌において物質収支は 93~98% と良好であった。

表 1 Freundlich の吸着係数

試料	1/n	K _F	γ^2	有機炭素含有率 % _{oc}	K _{Foc}
Hatzenbeler	0.921	4.90	1.000	3.10	158
Oregon	0.935	2.12	1.000	2.20	96.4
栃木	0.899	5.93	1.000	11.1	53.9
宮崎	1.010	1.48	0.998	0.96	154

以上、エチプロールの土壌吸着性については K_{Foc} が 53.9~158 と特に高いものではないと考えられる。

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

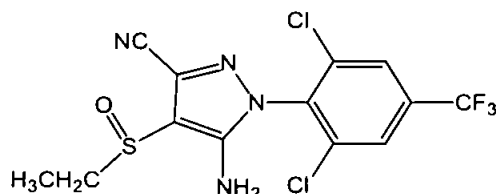
6. 生物濃縮性に関する試験
魚類濃縮性試験

(資料 環5)

試験機関：

報告書作成年：2004年 [GLP 対応]

被験物質：¹⁴C 標識エチプロール
構造式；



(*: ¹⁴C の標識位置を示す)

化学名；5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トリル)-4-エチルスルフィニル
ピラゾール-3-カルボニトリル

比放射能；

放射化学的純度；

供試生物：ゼブラダニオ (*Danio rerio*)、

1群 80 匹、対照群 40 匹、体重：0.316~0.933g

試験方法：室温 23±2℃、検体濃度 0.01mg/L 及び 0.1mg/L の半止水式条件下 (24 時間毎の換水) で 6 日間ゼブラダニオに暴露し、その後 4 日間排泄期間を設けた。無処理対照区も設けた。

予め通気した希釈水 15L を入れたステンレススチール製水槽 (45×25×25.5cm) に、低濃度用に 10mg/L に調製した検体溶液、高濃度用に 100mg/L に調製した検体溶液をそれぞれ 15ml 入れて、0.01mg/L の低濃度試験水と 0.1mg/L の高濃度試験水を調製した。試験期間中、1 日 1 回、pH、溶存酸素 (D.O) 及び水温を測定し、試験水を採取して分析した。魚体中の検体の分析は取込期間中は 0、3、6、12 時間、1、2、3、4、5 及び 6 日後、排泄期間中は 1、2、3 及び 4 日後に試験区は 4 匹、対照区は 2 匹採取して実施した。

結果：

(1) 観察

試験期間中の死亡率は全体で 4.5% であった。一般状態に異常は認められなかった。

(2) 環境条件

試験期間中の試験水は、水温 23.4~24.1℃、pH 7.50~7.68、D.O 6.99~7.18mg/L であった。

(3) 魚体内の検体濃度 (mg/kg)

試験区 (mg/L)	取込期間									
	0 時	3 時	6 時	12 時	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
0.01	0.005	0.024	0.031	0.043	0.099	0.107	0.111	0.088	0.089	0.303
0.1	0.108	0.235	0.282	0.416	0.827	1.170	1.122	0.958	1.090	0.661

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。

試験区 (mg/L)	排泄期間				
	0日	1日	2日	3日	4日
0.01	0.303	0.043	0.031	0.016	0.010
0.1	0.661	0.468	0.242	0.158	0.180

魚体中の検体濃度は、曝露5日後では低濃度区で0.089mg/kg魚、高濃度区で1.090mg/kg魚であった。4日間の排泄期間終了時には低濃度区で0.01mg/kg魚、高濃度区で0.180mg/kg魚であり、それぞれ、蓄積された検体の88.76%、83.49%が排泄された。なお、曝露6日後の分析結果は両区とも同じ取込パターンを示さなかったため、評価には使用しなかった。

(4) 試験水中の検体濃度 (mg/L)

濃度 (mg/L)	取込期間 (日)												
	0		1		2		3		4		5		6
	魚無し	魚有り	換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	換水前
0.01	0.011	0.009	0.010	0.010	0.009	0.009	0.010	0.010	0.012	0.010	0.010	0.010	0.015
0.1	0.088	0.094	0.114	0.100	0.104	0.123	0.153	0.075	0.115	0.116	0.113	0.092	0.105

試験水中の6日間の平均検体濃度は、低濃度区で0.01mg/L、高濃度区で0.11mg/Lであった。

(5) 濃縮係数

BCF_k

試験区 (mg/L)	取込速度定数	排泄速度定数	濃縮係数
0.01	0.1991 ± 0.0557	0.0223 ± 0.0013	8.9243 ± 1.9576
0.1	0.2002 ± 0.0768	0.0195 ± 0.0045	10.2422 ± 1.5661

BCF_{ss}*

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)					
	1	2	3	4	5	平均
0.01	10.2927	10.8897	11.4391	7.7330	8.5936	9.7107
0.1	7.9527	11.4543	8.1396	10.0987	9.5092	9.3354

BCF_kは低濃度区が8.92、高濃度区が10.24、BCF_{ss}は低濃度区が9.71、高濃度区が9.34であった。

*：申請者が算出した。

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

代謝のまとめ

[動物体内運命試験]

¹⁴C標識エチプロール を用いて、ラットにおけるエチプロールの動物体内運命を検討した。

吸収

低用量群 (5mg/kg) ではエチプロールは比較的良好に吸収され、その吸収率は雄で 79.7%、雌で 85.5%であった。高用量群 (1000mg/kg) では吸収率は低下し、雄で 10.4%、雌で 13.3%であり、なおかつ血中濃度曲線下面積 (AUC_{0-∞}) も投与量に比例していないため吸収の飽和の可能性が考えられた。

分布

吸収・分布・代謝・排泄試験の低用量群において雌雄共に、腎臓、肝臓、甲状腺および皮膚・被毛で他の臓器および組織と比較して高い放射能が認められた。また雌では血漿に比べ全血での放射能が高かった。高用量群ならびに低用量反復投与群においても同様の傾向が認められた。

組織内分布試験において各組織中のエチプロール濃度は T_{max} 以降速やかに減少したが、高用量群の雌では他の投与群と比較してやや緩慢であった。

代謝

ラット体内におけるエチプロールの一次代謝は、

このうち重要な一次代謝は

排泄

投与されたエチプロールの排泄は比較的速やかであり、168 時間後には投与放射能の 90%以上が排泄された。

主排泄経路は雌雄とも低用量群では胆汁排泄であり、高用量群では糞中排泄であった。また胆汁排泄試験において、胆管カニューレ挿入ラットの尿中排泄の低下が認められた。これは腸肝循環により再吸収された代謝物が尿を介して再排泄されることを示唆するものである。

[植物体内運命試験]

¹⁴C標識エチプロール を用いて、植物体におけるエチプロールの運命を検討した。供試植物は稲 (茎葉散布及び湛水处理)、綿およびピーマンの 3 種である。

分布

散布されたエチプロールは収穫時いずれの植物においてもその大部分が茎葉部に分布していた。稲およびピーマンの可食部または綿の綿実における分布率は約 1%以下と低いものであった。

代謝

エチプロールは植物体内において広範な代謝を受けた。

可食部における残留放射能の大部分は未変化のエチプロールおよび

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。

これらの結果より作物残留試験における分析対象化合物としてエチプロールおよび
を選定した。についてはその毒性が弱いこと()、動物体内運命試験で認め
られていること、植物代謝試験においてピーマン及び稲で認められたが可食部での残留は少ない
(ピーマン完熟果実において、玄米では検出されず)こと等により分析対象から除外し
た。また は実残留値が と極めて低く、残留毒性的に意義があるものではない
と考えられるので分析対象から除外した。

[土壌中運命試験]

¹⁴C標識エチプロール()を用いて、土壌中におけるエチプロールの運命を検討した。
試験条件は好氣的湛水、好気および嫌気の3条件であった。
また好気試験において、主要代謝物である の推定半減期が100日を超えたので
本代謝物の嫌気試験も併せて行った。

好氣的湛水条件

エチプロールは好氣的湛水条件下で速やかに分解し、DT50は5日であった。
主要代謝物は であり最大で1ヶ月後に処理放射能の であった。試験
終了時の365日後にあっても処理放射能の が本代謝物であった。
他の代謝物として 認められた。

好気条件

エチプロールは好気条件下で比較的速やかに分解し、DT50はシルト質壤土で30日、砂壤土で
71日であった。
主要代謝物は
365日後の試験終了時においてこれらの代謝物の合計は処理放射能の80%以上を占めていた。
他の代謝物の生成は僅かであった。

は本試験において推定半減期が100日を超えたため、 の嫌気土壌中 運
命試験を行った。また も同様に推定半減期が100日を超えたが、 は
エチプロールの嫌氣的土壌中運命試験 の嫌氣的土壌中運命試験の代謝経路中に
認められており、その挙動が把握されているため試験を省略した。

嫌気条件

-エチプロール-
エチプロールは嫌気条件下で速やかに分解し、DT50は11日であった。
主要代謝物は好氣的湛水試験と同様、 であり、最大で57日後に処理放射
能の が認められた。試験終了時の118日後においても依然 が本代謝物であった。
他の代謝物としては が同定されたが最大でも各々
であった。
嫌気下では揮発性放射能が認められたが、極く微量であった。

の嫌気条件下での分解は緩慢であり、推定半減期は535日であった。

これらの結果に基づき土壌残留試験における分析対象化合物としてエチプロール、
を選定した。については参考として分析を行った。

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

[加水分解運命試験]

^{14}C 標識エチプロール () を用い、pH4, 5, 7, 9 の緩衝液中における加水分解運命について検討した。

エチプロールは pH4, 5, 7 において非常に安定であり有意な半減期は求められなかった。pH9 においては明確な加水分解が認められ、推定半減期は 121 日であった。

同定された分解物 。未同定分解物も確認されたがそれらの合計は であった。

[水中光分解運命試験]

^{14}C 標識エチプロール () を用い、pH5 の緩衝液及び自然水中における水中光分解運命について検討した。

緩衝液

光照射区の緩衝液中でエチプロールは速やかに分解した。光照射区における半減期は 6.46 時間であり、これは北緯 35° における春期太陽光日数に換算して 2.0 日であった。また暗対照区においては有意な分解は認められなかった。

緩衝液中での主要分解物は

であった。

自然水

光照射区の緩衝液中でエチプロールは速やかに分解した。光照射区における半減期は 4.8 時間であり、これは北緯 35° における春期太陽光日数に換算して 1.3 日であった。また暗対照区においては有意な分解は認められなかった。

自然水中での主要分解物は緩衝液と同様、

であった。

[土壌吸着試験]

3 種の非火山灰土壌 (埴壤土、シルト質壤土および砂土) および 1 種の火山灰土壌 (埴壤土) を用いて土壌吸着試験を行った。吸着平衡時の吸着率は 24~53%、吸着係数(K)は 1.56~5.56、有機炭素含有率により補正した吸着係数(Koc)は 50.5~163 であった。また Freundlich の吸着等温式による吸着係数(KF)は 1.48~5.93 であり、有機炭素含有率による補正值(KFoc)は 53.9~158 であった。

[生物濃縮試験]

ゼブラダニオを用いて、試験濃度 0.01mg/L 及び 0.1mg/L、24 時間毎の換水の半止水条件下で、6 日間曝露後、4 日間の排泄期間を設けた。BCF_k は低濃度の 0.01mg/L 区で 8.92、高濃度の 0.1mg/L 区で 10.24 であった。また、BCF_{ss} は定常状態にあると考えられる 1~5 日の濃縮係数から、低濃度の 0.01mg/L 区で 9.71、高濃度の 0.1mg/L 区で 9.34 と算出された。

代謝分解の概要 (続き)

		0日後	3日後	7日後	14日後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月						
土壌代謝試験	好気的湛水条件 (420g a. i. /ha)	0日後										処理放射能に対する割合 (%)					
		3日後															
		7日後															
		14日後															
		1ヶ月															
		2ヶ月															
		3ヶ月															
		6ヶ月															
		9ヶ月															
		12ヶ月															
		好気条件 (600g a. i. /ha)	シルト質壤土	0日後											処理放射能に対する割合 (%)		
				7日後													
	14日後																
	30日後																
	60日後																
	90日後																
	180日後																
	270日後																
	365日後																
	砂壤土		0日後														
			7日後														
			14日後														
			30日後														
			60日後														
			90日後														
			180日後														
			270日後														
			365日後														
	嫌気条件 (500g a. i. /ha)	0時間後											処理放射能に対する割合 (%)				
		6時間後															
		1日後															
		2日後															
		3日後															
		7日後															
		14日後															
		28日後															
57日後																	
87日後																	
118日後																	
好気土壌中主要代謝物 RPA097973(B)の 嫌気性土壌中運命試験 (530g a. i. /ha)		0日後												処理放射能に対する割合 (%)			
	14日後																
	30日後																
	60日後																
	90日後																
	180日後																
	270日後																
	365日後																

n.d. : 検出されず。なお、空欄は当該代謝試験において認められなかったことを示す。

%TRR : 総放射能に対する%

代謝分解の概要 (続き)

本資料に 示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社にある。

エチプロールの代謝分解経路

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。

[附]エチプロールの開発年表