

② ラットを用いた2年間反復経口投与毒性試験

(資料No. 6)

試験機関 :

報告書作成年 : 1979年

試験の種類		動物種(系統名)		1群当り動物量	投与方法	
2年慢性毒性		ラット(Charles River SD系)		♂70、♀70	飼料添加	
検体の純度 91%	投与量	ppm	300	3,000	10,000	試験項目
		mg/kg	14	141	483	
体重変化		正 常	正 常	♀23カ月目で有意な低下		
摂餌量		♂3週目に有意な低下	正 常	♂17カ月目を除いて対照群より減少 ♀試験期間中を通して対照群より増加		
臨床学的所見		正 常	正 常	正 常		
臓器重量変化		正 常	正 常	正 常 脳、精巣、卵巣、心臓、腎臓、肝臓、脾臓		
血液学的所見		正 常	正 常	正 常 白血球、赤血球、血色素、ヘマトクリット、異型白血球、赤血球指数(MCV, MCH, MCHC)		
尿所見		正 常	正 常	正 常 糖、アルブミン、pH、比重、光学顕微鏡的可視物		
生化学的所見		正 常	正 常	正 常 糖、BUN、ALP、GPT		
病理学的所見		正 常	正 常	正 常 重量測定した臓器及び大腿骨、坐骨神経、脳下垂体、前立腺、唾液腺、骨格筋、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、眼球、胃、リンパ腺、甲状腺、視神経、気管、膵臓、膀胱、副甲状腺、子宮、肺、副腎		
最大無作用量(mg/kg)		3,000ppm(141mg/kg)				
上記の推定根拠とした症状		体重変化、摂餌量				

注) 本試験については厚生省(当時)より信頼性に疑いがあるとの指摘がなされたため、(財)安評センターにて別途再試験した(資料No.補遺13)。

IX. 動物、植物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表(1)>

資料 No.	試験の種類及び項目	供試動植物等	投与化合物 投与量、方法	試験結果の概要	試験機関 報告年	記載 頁																														
11-1	動物体内運命に関する試験 (単回投与) 1) 尿糞中排泄 2) 胆汁中排泄 3) 血中濃度推移 4) 組織中濃度推移 5) 尿中代謝物	JCL-SD 雄マウス	標識イソカロゼート 10mg/kg 経口投与及び 1mg/kg 静脈内投与	1) 排泄及び組織残留 ・尿糞中排泄は 24h までにほぼ終了 ・尿糞中排泄率 (%、0-72h) : <table border="1"> <tr> <td></td> <td>経口投与</td> <td>静脈内投与</td> </tr> <tr> <td>尿</td> <td>86.2</td> <td>86.9</td> </tr> <tr> <td>糞</td> <td>4.0</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>合計</td> <td>90.2</td> <td>87.7</td> </tr> </table> ・組織残留性なし (72h 後の総残留率 : 1.1%以下) ・経口吸収率 : 98%以上 2) 胆汁中排泄 ・胆汁中排泄率 (0-48h) : 経口投与 2.4%、静脈内投与 1.7% 3) 血中濃度推移 <table border="1"> <tr> <td>パラメーター</td> <td>経口投与</td> <td>静脈内投与</td> </tr> <tr> <td>Cmax (µg/mL)</td> <td>13.9</td> <td>2.97 (C₀)</td> </tr> <tr> <td>Tmax (h)</td> <td>0.25</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>AUC (µg·h/mL)</td> <td>11.0 (0-∞)</td> <td>1.03</td> </tr> <tr> <td>T_{1/2} (h) 分布相</td> <td>0.326</td> <td>0.183</td> </tr> <tr> <td>T_{1/2} (h) 消失相</td> <td>3.35</td> <td>1.21</td> </tr> </table> 4) 組織中濃度推移 (経口投与のみ) ・消化管からの放射能消失に伴い、主に腎臓中に高い放射能濃度が検出。投与後 24 時間以降は組織からほとんど検出せず。 5) 尿中代謝物 (経口投与 0-4h) 約 80%が であり、その他に よりも極性が高い未知代謝物が 17%検出。		経口投与	静脈内投与	尿	86.2	86.9	糞	4.0	0.8	合計	90.2	87.7	パラメーター	経口投与	静脈内投与	Cmax (µg/mL)	13.9	2.97 (C ₀)	Tmax (h)	0.25	-	AUC (µg·h/mL)	11.0 (0-∞)	1.03	T _{1/2} (h) 分布相	0.326	0.183	T _{1/2} (h) 消失相	3.35	1.21	1979 年	IX-5
	経口投与	静脈内投与																																		
尿	86.2	86.9																																		
糞	4.0	0.8																																		
合計	90.2	87.7																																		
パラメーター	経口投与	静脈内投与																																		
Cmax (µg/mL)	13.9	2.97 (C ₀)																																		
Tmax (h)	0.25	-																																		
AUC (µg·h/mL)	11.0 (0-∞)	1.03																																		
T _{1/2} (h) 分布相	0.326	0.183																																		
T _{1/2} (h) 消失相	3.35	1.21																																		
11-2	動物体内運命に関する試験 (単回投与) 全身オートラジオグラフィ	SD系 雄マウス	標識イソカロゼート 10mg/kg 経口投与及び 1mg/kg 静脈内投与 経時的に屠殺	投与後24h以内に尿中より排泄され、組織内からは速やかに排泄。 組織残留性なし。	1979 年	IX-12																														
12	植物体内運命に関する試験 ・移行性試験 - 葉面処理 - 根部浸漬 - 果実処理 ・分布・残留・代謝試験	ナツタイ及び温州みかん	標識イソカロゼート ナツタイ : 水溶液処理 温州みかん : 乳剤処理 (200ppm) 処理直後~4ヶ月後経時的に果肉、果皮、葉を分析	ナツタイ 葉面処理 : 上方への移行は少なく、下方移行が顕著。 根部浸漬 : 吸収率は20%以下で、ほとんどが根部に存在。 温州みかん 葉面処理 : 枝及び果実への移行を確認。果実への集積性なし。 果実処理 : 葉への移行性低く枝への移行が主。 果肉中代謝分解 : イソカロゼート(記号A)、	1979 年	IX-16																														

<代謝分解試験一覧表(2)>

資料 No.	試験の種類及び項目	供試動植物等	投与化合物 投与量、方法	試験結果の概要	試験機関 報告年	記載 頁																		
14 GLP	植物体内運命に関する試験	刈	標識イソプロト 1%乳剤 5ppm 溶液を果実以外の植物全体に2回散布 2回目処理30日後に果実及び葉を採取	30日後の総放射性残留物濃度 (TRR) 及び放射能分布 (% TRR) : <table border="1"> <tr> <td rowspan="3">果実</td> <td>TRR</td> <td>0.104ppm</td> </tr> <tr> <td>抽出液</td> <td>77% TRR</td> </tr> <tr> <td>残渣</td> <td>23% TRR</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">葉</td> <td>TRR</td> <td>1.169ppm</td> </tr> <tr> <td>表面洗液</td> <td>9% TRR</td> </tr> <tr> <td>抽出液</td> <td>54% TRR</td> </tr> <tr> <td>残渣</td> <td>37% TRR</td> </tr> </table> <p>30日後の代謝物: 果実; 主要残留物なし (<10% TRR)、 を抽出 葉; 主要残留物なし (<10% TRR)、イソプロト(記号A) を抽出、葉の抽出残渣の酸・アルカリ処理によって が8%TRR 検出</p>	果実	TRR	0.104ppm	抽出液	77% TRR	残渣	23% TRR	葉	TRR	1.169ppm	表面洗液	9% TRR	抽出液	54% TRR	残渣	37% TRR	2006年	IX-26		
果実	TRR	0.104ppm																						
	抽出液	77% TRR																						
	残渣	23% TRR																						
葉	TRR	1.169ppm																						
	表面洗液	9% TRR																						
	抽出液	54% TRR																						
残渣	37% TRR																							
15 GLP	植物体内運命に関する試験	かき	標識イソプロト 20%乳剤 40ppm 溶液を植物全体に2回散布 2回目処理67日後に果実及び葉を採取	67日後の総放射性残留物濃度 (TRR) 及び放射能分布 (% TRR) : <table border="1"> <tr> <td rowspan="4">果実</td> <td>TRR</td> <td>0.096ppm</td> </tr> <tr> <td>表面洗液</td> <td>7% TRR</td> </tr> <tr> <td>抽出液</td> <td>65% TRR</td> </tr> <tr> <td>残渣</td> <td>28% TRR</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">葉</td> <td>TRR</td> <td>8.322ppm</td> </tr> <tr> <td>表面洗液</td> <td>25% TRR</td> </tr> <tr> <td>抽出液</td> <td>38% TRR</td> </tr> <tr> <td>残渣</td> <td>38% TRR</td> </tr> </table> <p>67日後の代謝物: 果実; 主要代謝物は イソプロト(記号A), の植物成分への結合体を示唆 葉; >10%TRR の主要残留物なし、残留物は果実と同様</p>	果実	TRR	0.096ppm	表面洗液	7% TRR	抽出液	65% TRR	残渣	28% TRR	葉	TRR	8.322ppm	表面洗液	25% TRR	抽出液	38% TRR	残渣	38% TRR	2007年	IX-34
果実	TRR	0.096ppm																						
	表面洗液	7% TRR																						
	抽出液	65% TRR																						
	残渣	28% TRR																						
葉	TRR	8.322ppm																						
	表面洗液	25% TRR																						
	抽出液	38% TRR																						
	残渣	38% TRR																						
13	土壌中運命に関する試験 (好氣的土壌中運命試験)	栃木土壌(火山灰堆積土)及び愛知土壌(洪積堆積土)	標識イソプロト 1ppm 及び 10ppm 処理 含水量: 最大容水量の60% 温度: 30℃	イソプロト分解速度(半減期): 1ppm 処理; 1-2日、10ppm 処理; 2-4日 分解生成物最大比率 (>10% dose): 二酸化炭素; 16% (28日, 愛知土壌) 土壌抽出残渣: 18-19% (28日)	1979年	IX-42																		
補遺 18 GLP	水中運命に関する試験 (加水分解運命試験)	Clark and Lubs 0.05M 緩衝液 pH7 及び pH9	標識イソプロト 濃度: 50 mg/L 温度: 25℃	イソプロトの半減期: <table border="1"> <tr> <th>pH</th> <th>半減期</th> <th>相関係数(r²)</th> </tr> <tr> <td>7</td> <td>181日</td> <td>0.773</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>2.3日</td> <td>0.991</td> </tr> </table> <p>注) pH4 の安定性は物化性試験で確認済 主要分解物 (>10%) 及び最大生成量: pH7; 12% (30日) pH9; 97% (14日)</p>	pH	半減期	相関係数(r ²)	7	181日	0.773	9	2.3日	0.991	2003年	IX-48									
pH	半減期	相関係数(r ²)																						
7	181日	0.773																						
9	2.3日	0.991																						

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

1. 動物における運命

①ラットにおける吸収、分布、代謝及び排泄

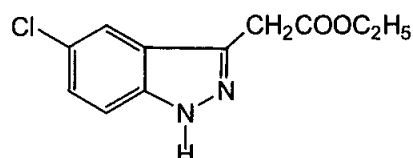
資料No. 11-1

試験機関：

報告書作成年：1979年

供試標識化合物： 標識イコピト

構造式：



比放射能及び放射化学的純度は以下に示した。

Lot No.	比放射能 (MBq/mg)	放射化学的純度 (%)

化学名；5-クロ-3(1H-インダゾリル)酢酸エチル

非標識体純度； %

供試動物：JCL-SD系雄性ラット、表1参照

- ・6週令 (体重 180~215g)；血中濃度、尿糞中排泄、組織内濃度
- ・7週令 (体重 220~290g)；胆汁中排泄

申請者注) 雄性実施理由；毒性試験の結果、雌雄の差が認められなかったため、雄性のみ使用した。

投与方法：標識イコピトあるいは非標識イコピトで希釈した標識イコピトを1mg/mLになるように0.5%好塩基性水溶液に懸濁した。ラットへの投与は全て単回とした。静脈内投与(i. v.)の場合は約0.1mL/100g (1mg/kg)を尾静脈から注入し、経口投与(p. o.)の場合は、約1mL/100g (10mg/kg)を経口リントを用いて投与した。投与後、血中濃度、尿糞中排泄、胆汁中排泄、組織内濃度及び代謝物を調べた(表1参照)。

表1 動物実験方法 (原報告書Table 1)

実験	週令	前処理	例数	投与経路	投与量	被験薬物		採取試料	試料採取時間 (h)
						標識イソプレト	非標識イソプレト		
						Lot No.	Lot No.		
血中濃度	6	一夜絶食	4	i. v.	0. 154MBq/mg/kg			全血	1/12, 1/6, 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24
			5	p. o.	1. 54MBq/10mg/kg				1/6, 1/4, 1/2, 1, 3/2, 2, 3, 4, 6, 8, 24
尿糞中排泄	6	一夜絶食	5	i. v.	0. 154MBq/mg/kg			尿糞 ケージ洗液 消化管体	0-4, 4-8, 8-24, 24-48, 48-72 0-24, 24-48, 48-72 0-24, 24-48, 48-72 72 72
			6	p. o.	0. 154MBq/10mg/kg				
胆汁中排泄	7	無絶食	5	i. v.	0. 154MBq/mg/kg			胆汁 尿糞	0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-24, 24-48 0-4, 4-8, 8-24, 24-48
			5	p. o.	0. 154MBq/10mg/kg				
組織内濃度	6	一夜絶食	5	p. o.	1. 54MBq/10mg/kg			血清、肺、肝臓、腎臓、大腸筋、胃、小腸、大腸	1/2, 2, 4 24, 48
			5	p. o.	4. 63MBq/10mg/kg				
代謝物分析	6	一夜絶食	4*	p. o.	1. 54MBq/10mg/kg			血清	1/2, 2
			5*	p. o.	4. 63MBq/10mg/kg				

一：非標識イソプレト使用せず、*：内容物含む、*：組織内濃度測定実験における同じ投与量の個体から試料を採取

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

I. 血中濃度；

投与後一定時間毎にカニューレを挿入した大腿動脈より血液を採取し、その100 μ Lを用いて放射能を測定した。

II. 尿糞中排泄；

ラットを1個体毎別個の代謝ケージに入れ、一定時間毎に尿及び糞を採取し、放射能測定試料とした。投与72時間後に消化管を摘出し、残りの屍体とともにそれぞれの放射能を測定した。

III. 胆汁中排泄；

ラットを固定台に背位固定し、総胆管にポリエチレンチューブを挿入して経時的に胆汁を採取した。また、尿は尿道口に試験管を固定して一定時間毎に採取した。糞は一定時間毎に採取した。

IV. 組織内濃度；

規定時間後に屠殺し、心臓から採血後各臓器及び消化管を摘出した。血液は血清とし、消化管は内容物を含めて測定試料とした。肝臓、腎臓及び肺臓は凍結乾燥後乳鉢で粉碎した。筋肉及び消化管は水を加え、ポリロンによって柱状にし、凍結乾燥によって粉末試料とした。

V. 代謝物分析；

血清及び尿中の代謝物分析は薄層クロマトグラフィーにて行った。両試料ともにIV組織内濃度用のものを使用した。

薄層クロマトグラフィー (以下TLC)：

以下のTLC条件で展開したものを適当な区画に分け、各区画内のシグナルを全て削り取り、メタノールで溶解して放射能を測定した。

TLCプレート；Kieselgel 60F₂₅₄、厚さ250 μ m (Merck社製)

展開溶媒；n-ブタノール：イタノール：水=5：4：1 (v/v/v)

結 果：

I. 血中濃度；

静脈内投与及び経口投与における平均血中濃度推移を表2に示した。

表2 血中濃度推移（原報告書Table 2及び3）

採取時間	静脈内投与	経口投与
1/12 時間	2.59	—
1/6 時間	1.64	13.1
1/4 時間	1.23	13.9
1/2 時間	0.545	8.48
1 時間	0.157	2.77
3/2 時間	—	1.15
2 時間	0.054	0.463
3 時間	0.028	0.251
4 時間	0.017	0.166
6 時間	0.009	0.092
8 時間	0.011	0.053
24 時間	0.011	0.020

数値の単位は $\mu\text{g} \cdot \text{イカドレ}^{-1}$ 換算/mL、—：測定せず
血中濃度は4あるいは5例数の平均を示す

静脈内投与における血中からの消失は非常に速やかであった。

経口投与では、投与後1/4時間（15分）で最高濃度に達し、その濃度は $13.9\mu\text{g} \cdot \text{イカドレ}^{-1}$ 換算/mLであった。投与2時間後からは静脈内投与とほぼ同じ推移パターンを示した。

申請者注) 表2より、各投与における時間と血中濃度のグラフを作成し（図1）、各パラメータを表3にまとめた。

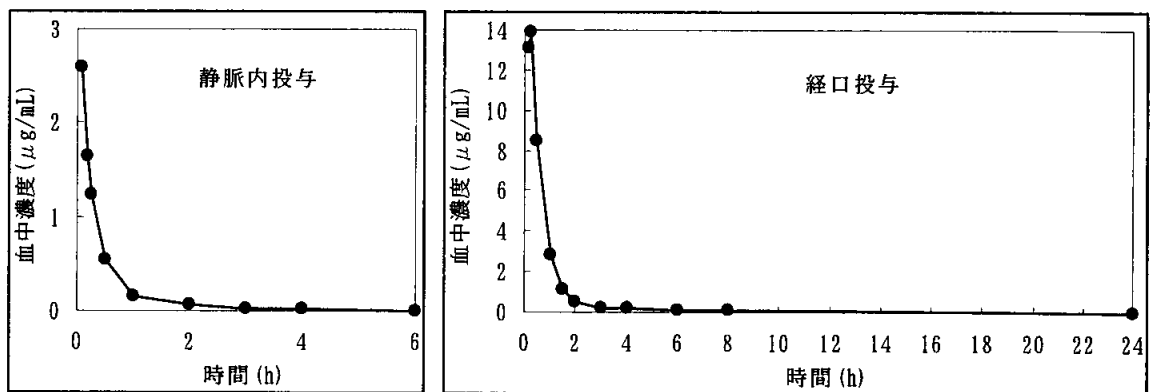


図1 静脈内投与及び経口投与における平均血中濃度推移

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

表3 薬物動態パラメーター

パラメーター	静脈内投与	経口投与
Tmax (h)	-	0.25
Cmax (µg/mL)	2.97 (C ₀)	13.9
T1/2 (分布相, h)	0.183	0.326
T1/2 (消失相, h)	1.21	3.35
AUC (µg·h/mL)	1.03	-
AUC (0-24, µg·h/mL)	-	10.8
AUC (0-∞, µg·h/mL)	-	11.0

II. 尿糞中排泄；

静脈内投与及び経口投与における平均尿糞中排泄率及び屍体中残存率を表4に示した。

表4 尿糞中排泄率及び屍体中残存率（原報告書Table 4及び5）

時間	静脈内投与			経口投与		
	尿	糞	合計	尿	糞	合計
0 ~ 4時間	80.7	-*	80.7	62.5	-*	62.5
4 ~ 8時間	4.6	-*	4.6	17.1	-*	17.1
8 ~ 24時間	1.3	0.8*	2.1	4.9	3.6*	8.5
24 ~ 48時間	0.2	ND	0.2	1.5	0.4	1.9
48 ~ 72時間	0.1	ND	0.1	0.2	ND	0.2
小計	86.9	0.8	87.7	86.2	4.0	90.2
ケージ洗浄液	-	-	0.2	-	-	1.0
消化管 (72時間後)	-	-	0.0	-	-	0.0
屍体 (72時間後)	-	-	1.1	-	-	0.5
合計	-	-	89.0	-	-	91.7

数値は投与放射能に対する%で5例あるいは6例の平均値を示す、-：測定せず

*：糞は0~24、24~48、48~72時間に測定した

申請者注) 合計は申請者が計算して記載した。

尿中排泄は速やかで、静脈内投与の場合、最初の4時間で投与量の81%が排泄された。経口投与の場合、最初の4時間で投与量の63%が排泄された。72時間までの糞中への排泄はそれぞれ0.8%及び4.0%であった。

申請者注) 経口投与における吸収率は、経口投与の尿中排泄率と静脈内投与の尿中排泄率を比較することで算出した。

$$\begin{aligned} \text{吸収率} &= 100 \times \text{経口投与の尿中排泄率} / \text{静脈内投与の尿中排泄率} \\ &= 100 \times 86.2 / 86.9 = 99.2 \% \end{aligned}$$

Ⅲ. 胆汁中排泄；

静脈内投与及び経口投与における平均胆汁中排泄率を表5に示した。

表5 胆汁中排泄率（原報告書Table 6及び7）

時間	静脈内投与			経口投与		
	胆汁	尿	糞	胆汁	尿	糞
0 ~ 2時間	1.3	75.8	0.0	1.2	57.1	0.0
2 ~ 4時間	0.1			0.3		
4 ~ 6時間	0.1	16.5		0.2	20.8	
6 ~ 8時間	0.0			0.1		
8 ~ 24時間	0.1	3.1	0.2	0.5	17.6	1.2
24 ~ 48時間	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	1.7
合計	1.7	95.6	0.2	2.4	95.8	2.9
総合計	97.5			101.1		

数値は投与放射能に対する%で、5例数の平均値を示す。

静脈内及び経口投与いずれの群においても胆汁中排泄率は低かった。Ⅱの尿糞中排泄に比べて排泄速度は遅くなっているが、投与放射能のほとんどが尿中に回収されている点では同じ傾向であった。

申請者注) 経口投与における吸収率を、経口投与の胆汁中排泄率と尿中排泄率との合計として計算すると、98.2%となり、経口投与と静脈内投与の尿中排泄率から算出した吸収率（99.2%）とほぼ同等となる。

Ⅳ. 組織内濃度；

経口投与における平均組織内濃度推移を表6に示した。

表6 組織内濃度推移（原報告書Table 8及び9）

組織	経口投与				
	1.54MBq/10mg/kg			4.63MBq/10mg/kg	
	0.5時間	2時間	4時間	24時間	48時間
血清	5.96	0.79	0.30	0.004	ND
肺	1.34	0.19	0.08	ND	ND
肝臓	4.39	0.80	0.43	0.006	0.003
腎臓	50.22	5.06	1.63	0.008	0.004
大腿筋	0.43	0.06	0.10	0.001	ND
胃*	(21.22)	(3.8)	(2.2)	(0.11)	(0.04)
小腸*	(3.4)	(2.3)	(1.4)	(0.01)	(0.00)
大腸*	(0.2)	(0.1)	(0.9)	(0.03)	(0.00)

数値の単位は $\mu\text{g} \cdot \text{イコゼット換算/g}$ あるいは mL 、()内は投与放射能に対する%であり、5例の平均値を示す。*: 内容物を含む、ND: <0.0019、0.00: <0.004

消化管から放射能が急速に消失し、投与後4時間までに腎臓で高濃度検出されたが、投与後24、48時間にはいずれの調査項目組織においてもほとんど検出されなかった。

V. 代謝物の分析；

経口投与 (10mg/kg) 後0-4時間の尿中における代謝物のTLC分析結果を表7に示した。血清については放射能が低く、TLC分析はできなかった。

表7 尿中代謝物の分析結果 (原報告書Figure 1より数値を抜粋)

画分 No.	化合物名	代謝物比率
1	原 点	0.1
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9	イカゼート (記号A)	0.1
10		
11	溶媒フロント	0.0

数値は尿中放射能に対する%

親化合物であるイカゼート (記号A) はほとんど検出されず、尿中放射能の約80%が のRf値と一致し、 その他にRf値が0.32と0.4のところに各々尿中放射能の1.7%、17%が検出された。

以上のことから、本化合物イカゼート (記号A) はラットにおいて、経口投与後速やかにほぼ完全に吸収され、胆汁からの排泄は少なく、ほとんどが腎臓から速やかに排泄されることが確認された。尿中主要代謝物は

であった。また、10mg/kg経口投与24時間後、主要臓器内の薬物濃度は全て0.01ppm以下で残留性が低いことが示唆された。以下に主要代謝経路を示した。

イカゼートのラットにおける主要代謝経路

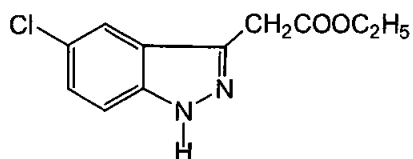
②ラットにおける全身オートラジオグラフィ

資料No. 11-2

試験機関：

報告書作成年：1979年

供試標識化合物：標識イチクロゼート



比放射能； MBq/mg

放射化学的純度； %

化学名；5-クロロ-3-(1H-インダゾリル)酢酸エチル

供試動物；Sprague-Dawley系雄性ラット、6週令（体重 160～185g）、16例数

投与方法；標識イチクロゼートあるいは非標識イチクロゼートで希釈した標識イチクロゼートを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して投与液を調製し、以下の方法で投与した。

I. 静脈内投与；

標識イチクロゼートを1mg/0.932MBq/mL/kgの割合で尾静脈から投与し、投与5、15、30分、1、2、4、8、24時間後に排尿させ、エーテル麻酔により屠殺した。

II. 経口投与；

等量の非標識イチクロゼートで希釈した標識イチクロゼートを用い、10mg/4.66MBq/10mL/kgの割合で経口針を用いて投与し、15、30分、1、2、4、8、24、48時間後に排尿させ、エーテル麻酔により屠殺した。

オートラジオグラフィの作製：

両群とも、麻酔後、0.5%メチルセルロース水溶液で包埋し、ドライアイス/ヘキサン混合液で約5分間凍結した。これを5%メチルセルロース水溶液に包埋して完全に凍結後、PMVクライオミクロームステージ上に固定し、 -15°C ～ -20°C でサテプを用いて厚さ60 μm の全身切片を作製した。切片を -20°C フリーザー中で5～7日間乾燥させ、フィルムで被い、X線フィルムに密着させて、静脈内投与の場合は42日間、経口投与の場合は21日間露出させてオートラジオグラムを得た。

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

結 果：

I. 静脈内投与；

ラットに標識イソドールを静脈内投与した後の黒化度評価結果を表1に示した。静脈内投与における体内分布は投与5分後に腎臓、膀胱、陰茎に高濃度で検出された。その他の臓器内濃度は血中濃度と同程度かそれ以下であった。肝臓、肺及び気管で中程度の黒化が、下垂体、舌、食道、鼻粘膜、唾液腺、心筋、褐色脂肪及び皮膚に軽度の黒化が認められた。

投与15分後には腎臓髄質、膀胱内及び陰茎に非常に強い黒化が、腎臓皮質及び小腸内容物の一部にやや強い黒化が認められた。その他の臓器器官の放射能濃度は低かった。

投与30分後には腎臓、膀胱、陰茎及び消化管内容物の一部以外の放射能濃度は非常に低かった。時間の経過にともない、腎臓、膀胱、陰茎及び消化管内容物の一部の放射能濃度も低くなり、投与24時間後にはわずかに黒化が認められる程度であった。また、懸濁液で投与したために、肺、肝臓及び脾臓で標識化合物の粒子が毛細管の一部に残留したと思われる斑点状の黒化が認められた。

II. 経口投与；

ラットに標識イソドールを経口投与した後の黒化度評価結果を表2に示した。経口投与した場合、投与15分後に血中濃度は中程度の黒化となり、腎臓には高濃度の放射能が検出された。肝臓及び皮膚で血中濃度と同程度の濃度が検出されたが、消化管を除くといずれの臓器でも血中濃度より低かった。特に脳内及び脊髄には放射能は検出されず、静脈内投与した場合と異なった。

時間の経過にともない血中濃度は低下し、2時間後には検出されなくなった。組織内濃度も時間とともに低下し、投与24時間後には胃壁を除いて検出されなくなった。

以上のことから、イソドールは投与後24時間以内でその大半が尿中より排泄され、組織内から速やかに消失することが確認された。

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

表1 ラットに標識エカロピート1mg/kgを静脈内投与した後の全身オートラジオグラフィ-黒化度（原報告書 Table 1)

	5分	15分	30分	1時間	2時間	4時間	8時間	24時間
大脳皮質	1	0	0	0	0	0	0	0
海馬	1	0	0	0	0	0	0	0
視床下部	1	0	0	0	0	0	0	0
小脳	1	0	0	0	0	0	0	0
脊髄	1	0	0	0	0	0	0	0
脳下垂体	2	0	0	0	0	0	0	0
ハタゲ腺	1	0	0	0	0	0	0	0
舌	2	1	1	0	1	1	1	0
食道	2	—	1	1	0	1	1	0
鼻粘膜	2	1	1	0	0	0	0	0
唾液腺	2	0	0	0	0	0	0	0
肺	3-5*	1-4*	0-4*	0-4*	0-4*	0-4*	0-4*	0-4*
気管	3	1	0	0	0	0	0	0
胸腺	1	0	0	0	0	0	0	0
心筋	2	0	0	0	0	0	0	0
心臓血	4	1	0	0	0	0	0	0
下大静脈血	4	2	0	0	0	0	0	0
肝臓	3	2	1	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*
脾臓	1	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*	0-1*
副腎	皮質	1	1	0	0	0	0	0
	髄質	1	1	0	0	0	0	0
腎臓	皮質	5	4	2	1	0	0	0
	髄質	5	5	3-4	1	0-3	0	0
消化管内容物	胃	0	0	0-3	0	0	0	0
	小腸	1	1-4	0-4	0-4	0-3	0-3	0-1
	大腸	0	0	0	0	0	1-3	0-2
胃壁	1	1	0	0	0	0	1	0
腸壁	1	1	0	0	0	0	0	0
膀胱	5	5	5	5	—	—	—	—
睪丸	0	1	1	0	0	0	0	0
骨髓	1	1	0	0	0	0	0	0
陰茎	5	5	5	5	3	2	2	0
褐色脂肪	2	1	0	0	0	0	0	0
骨格筋	1	0	0	0	0	0	0	0
皮膚	2	2	1	0	0	0	0	0

黒化度：完全な黒化5，検出可能な黒化1，中程度の黒化3（目視による5段階評価）

0：全く黒化が認められない場合、—：該当組織及び器官を判別できなかった場合

*：斑点状の黒化

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

表2 ラットに標識イソプロト10mg/kgを経口投与した後の全身オートラジオグラフィ-黒化度（原報告書 Table 2）

	15分	30分	1時間	2時間	4時間	8時間	24時間	48時間
大脳皮質	0	0	0	0	0	0	0	0
海馬	0	0	0	0	0	0	0	0
視床下部	0	0	0	0	0	0	0	0
小脳	0	0	0	0	0	0	0	0
脊髄	0	0	0	0	0	0	0	0
脳下垂体	1	1	0	0	0	0	0	0
ハタゲ腺	1	1	0	0	0	0	0	0
舌	3	1	1	3	4	1	0	0
食道	4	5	5	3	4	1	0	0
鼻粘膜	2	1	1	0	0	0	0	0
唾液腺	2	1	1	0	0	0	0	0
肺	2	2	1	0	0	0	0	0
気管	2	1	1	0	0	0	0	0
胸腺	1	0	0	0	0	0	0	0
心筋	1	0	0	0	0	0	0	0
心臓血	3	2	1	0	0	0	0	0
下大静脈血	3	2	1	0	0	0	0	0
肝臓	3	2	1	1	1	0	0	0
脾臓	1	0	0	0	0	0	0	0
副腎	皮質	1	1	0	0	0	0	0
	髄質	1	1	0	0	0	0	0
腎臓	皮質	5	3	3	1	2	1	0
	髄質	5	5	5	2	3	1	0
消化管内容物	胃	5	5	5	5	5	0	0
	小腸	5	5	5	5	5	0	0
	大腸	0	0	0	0	5	5	0
胃壁	—	—	—	0	0	0	1	2
腸壁	2	1	0	0	0	0	0	0
膀胱	—	5	5	5	5	5	—	—
辜丸	1	1	0	0	0	0	0	0
骨髓	1	1	0	0	0	0	0	0
陰茎	5	5	4	—	5	4	0	0
褐色脂肪	1	1	0	0	0	0	0	0
骨格筋	1	1	0	0	0	0	0	0
皮膚	3	2	1	0	0	0	0	0

黒化度：完全な黒化5，検出可能な黒化1，中程度の黒化3（目視による5段階評価）
0：全く黒化が認められない場合、—：該当組織及び器官を判別できなかった場合

2. 植物における運命

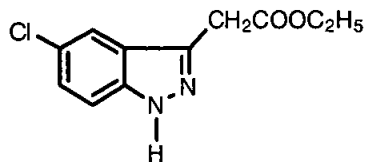
①みかんにおける代謝試験

資料No.12

試験機関：

報告書作成年：1979年

供試標識化合物： 標識イカリピト



比放射能； MBq/mg (mCi/mmol)

放射化学的純度； %

化学名；5-クロロ-3(1H)-インダゾリル酢酸エチル

供試植物： I. ナツタイ (播種後6~7ヵ月の実生幼植物)

II. 宮川系早生温州みかん(3年生；開花 60日後)

方法：

I. ナツタイ実生

1. 葉面からの移行性試験

播種後7ヵ月の実生苗を森氏果樹水耕栽培液で一週間生育させた後に、最上部、中部及び最下部の葉に0.01%の展着剤を含んだ標識イカリピトの280ppm水溶液10 μ Lをマイクロシリンジで処理した。処理後水耕中で30日間生育させ、オートラジオグラフィに供した。最下部処理葉の水耕液は経時的に放射能を測定した。

2. 根部吸収試験

標識イカリピトの0.0024ppm、0.24ppm及び2.4ppm水耕液溶液を調製し、播種後6ヵ月の実生苗の根部のみを30日間浸漬した。経時的に水耕液中の放射能を測定した。浸漬30日後にオートラジオグラフィに供し、各部位毎の放射能を測定した。

II. 宮川系早生温州みかん

200ppm濃度の標識イカリピト乳剤

を調製し処理液とした。

1. 葉面からの移行性試験

直径3.5cmの温州みかん幼果及び2枚の葉をつけた結果枝を3.5~4.0cm切り取り幼果に近い葉を処理液に30秒浸漬後、流水で60秒洗浄し、水滴を拭き取って蒸

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

留水中で4日間生育させた。経時的に部位毎の放射能を測定した。

2. 果実からの移行性試験

鉢植えみかんの地上部全面にエチレート^{*}を処理し、1時間後に上記の処理液を幼果の表面にマイカシジ^{*}を用いて20μLを、また果実内部の果心には果底部^{**}より50μLを注入した。処理4ヶ月後に各部位毎の放射能を測定した。

^{} 申請者注) 報告書原文には「エチレートを全面処理」とあるが、実際は非標識エチレートを処理した。

**^{*} 申請者注) 報告書原文には「果頂部より注入」とあるが、実際は「果底部より注入」した。

3. 分布、残留及び代謝試験

鉢植えみかんの地上部全面に前述の標識処理液を毛筆で丁寧に塗布した。経時的にオートラジオグラフィ^{*}に供し、各部位毎の放射能を測定した。

申請者注) 処理量の設定根拠；地上部への処理は実用処理濃度に合せた。根部からの吸収は適当な3段階の濃度を設定し、濃度変化と吸収率との関係を調べた。

液体シンチレーションスペクトロメーター；

自動燃焼装置；

オートラジオグラフィ；

分 析：Ⅱ-3の試験で経時的に採取した葉及び果皮部と果肉部に分けた果実は以下のスキームに従って分析した。

代謝物の加水分解：

処理4ヵ月後（収穫時期）の葉、果肉及び果皮のn-ブタール画分と果肉及び果皮の80%エタノール抽出液においては、一部の試料を乾固後、β-グルコシダーゼ（pH5の1/10 N 酢酸緩衝液に溶解、37℃、24時間）あるいは6N 塩酸（同溶液に溶解、90℃、24時間）による加水分解を実施した。

各反応終了後、試料をpH2に調整し、酢酸エチルで抽出した。水画分、酢酸エチル画分の放射能を測定後、酢酸エチル画分をTLCにて展開し、代謝物の定性及び定量を行った。

結 果：吸収・移行性

I-1. ナツグイの葉に処理した場合の吸収・移行性

標識イソトープをナツグイの葉に処理した場合、処理30日後のオートラジオグラフィの結果から、上方への移行は極めて少なく、下方移行が顕著に行われ、処理部位より下方の枝及び根部に移行していることが観察された。最下部の葉に処理した場合、経時的に水耕液中への流出率が高くなり、処理30日後では処理量の5%が水耕液中から検出された。

I-2. ナツグイの根部浸漬処理した場合の吸収・移行性

標識イソトープ水耕液溶液にナツグイの根部を浸漬した場合の根部からの吸収性については、濃度が低いほど比較的良好に吸収されており、30日後における水耕液からの放射能の消失が $10^{-2}\mu\text{M}$ (0.0024ppm)で19%、 $1\mu\text{M}$ (0.24ppm)で13%、 $10\mu\text{M}$ (2.4ppm)で11%であった。吸収速度は4日目まで比較的速かったが4日目以降はほとんど吸収されなかった。

また、 $1\mu\text{M}$ 処理後30日におけるナツグイのオートラジオグラムより、吸収された放射能のほとんどが根部に集積していることが確認された。

$1\mu\text{M}$ 及び $10\mu\text{M}$ 処理後30日のナツグイの根部、枝及び葉への移行性を表1に示した。

表1 水耕液にナツグイの根部を30日間浸漬した場合の放射能分布 (原報告書 Table 3)

処理濃度	根部	枝	葉
$1\mu\text{M}$ (0.24ppm)	11.4	0.6	0.2
$10\mu\text{M}$ (2.4ppm)	7.0	0.3	0.1

数値は処理放射能に対する%

以上の結果より、ナツグイによるイソトープの上方への移行は極めて少なく、下方移行が大であることが確認された。

II-1. 早生温州みかんに葉面処理した場合の移行性

早生温州みかんの2枚の葉を残した結果枝の幼果に近い葉に標識イソトープを処理した場合の放射能分布を表2に示した。

表2 早生温州みかんの結果枝の幼果に近い葉に処理した場合の放射能分布 (原報告書Table 4)

分析部位	2時間	5時間	24時間	48時間	72時間	96時間
処理葉	98.3	97.0	63.2	55.8	52.4	52.6
枝	0.1	1.6	13.6	25.3	31.8	41.0
無処理葉	0.3	0.5	0.5	0.5	0.8	0.5
果実	1.1	0.9	22.0	16.4	11.9	3.6
水耕液	0.2	<0.1	0.7	2.0	3.1	2.3

数値は処理放射能に対する%

処理葉からの移行は速やかにおこなわれ、24時間で処理量の約40%が他の部位に移行し、以後96時間まではほぼ一定であった。枝への移行は24時間目において急激に増大しており、96時間までに処理量の約40%が集積していた。また、幼果への移行は24時間で最大であり、処理量の約20%が移行集積したが、時間の経過と共に減少し、96時間では4%にまで減少した。無処理葉への移行は最も少なく、最大で72時間後の0.8%にすぎなかった。水耕液からも放射能が回収された。経時的に増加傾向であり、72時間で処理放射能の3%が検出された。

II-2. 早生温州みかんに果実処理した場合の移行性

実用処理に合わせて、1kg/Lの200ppm水溶液*)を散布機で鉢植え温州みかん樹全面に処理し、1時間乾燥後、外果皮あるいは幼果内部の果心に¹⁴C-1kg/Lを処理した場合の移行性を調べた。果皮処理及び果心処理した場合の果皮と果肉への移行性を表3に、果心処理後の果実近傍の葉及び枝への移行性を表4に示した。

*) 申請者注) 報告書原文には「1kg/Lを全面処理」とあるが、実際は非標識1kg/Lを処理した。

表3 果心処理及び果皮処理した4ヶ月後の早生温州みかんの放射分布 (原報告書Table 5)

分析部位	果心処理	果皮処理
果 肉	51.3	12.7
果 皮	11.9	50.6
合 計	63.2	63.3

果実に処理した放射能に対する%

果心処理及び果皮処理の場合のいずれの条件においても処理部位には処理量の50%しか残留しておらず、約10%が果心部から果皮部へ、果皮部から果心部へ移行していることが認められた。

表4 果心処理した4ヵ月後の早生温州みかんの果実中近傍の葉及び枝の放射能分布 (原報告書Table 6)

採取部位	比 率
葉-1 (果実に1番近い葉)	0.222%
葉-2 (果実に2番目に近い葉)	0.258%
葉-2 (果実に3番目に近い葉)	0.287%
枝	5.069%

果実に注入した放射能に対する%

葉への移行は極めて少なく、枝への移行が主であった。また移行は下方への移行であった。

II-3-1. 早生温州みかんに全面処理した場合の分布

早生温州みかんの全面に200ppmの標識¹⁴C-トリチウムを丁寧に塗布した場合の経時的な放射能の分布は、トリチウムより確認された。処理1ヵ月後では、果盤部及び果頂部に多くの放射能が認められ、処理された外果皮のほか中果皮、内果皮及び果心に放射能が確認された。一方、汁肉部には放射能はほとんどみられなかった。処理4ヵ月後の枝及び根部では、皮部及び木質部に多く分布しており、篩管及び導管を通して果実内部へ移行していることが確認された。

II-3-2. 早生温州みかんに全面処理した場合の放射能残留量

早生温州みかんの全面に200ppmの標識¹⁴C-トリチウムを丁寧に塗布した場合の経時的な放射能の残留量を表5に示した。

表5 早生温州みかん全面塗布した場合の経時的な残留量 (原報告書 Table 7)

分析部位	処理直後	1ヵ月後	2ヵ月後	4ヵ月後
果 肉	—	0.091	0.048	0.083
果 皮	2.167 (100.0)	1.452 (67.0)	1.075 (49.6)	0.769 (35.5)
葉	11.501 (100.0)	7.051 (61.3)	6.233 (54.2)	4.569 (39.7)

数字の単位はppm、—：分析せず

()内数値：果皮及び葉の処理直後を100とした時の比率を申請者が計算して表記した。

果実(果皮部及び果肉部)の残渣部も含めた放射能を分析し、¹⁴C-トリチウム換算濃度を検討した結果、果肉部の濃度の変化は少なく、0.05~0.09ppmであった。これに対して果皮部及び葉に残留している組織内濃度は減少しており4ヵ月後(収穫時期)には処理直後の35~40%にまで減少した。しかし、果実1個あたりの果皮部及び果肉部への移行集積はともに増加することが確認された。

II-3-3-1. 早生温州みかんに全面処理した場合の代謝分解

早生温州みかんの全面に200ppmの標識 I^{14}C を塗布した場合の経時的な放射能の分布比率を表6に示した。

表6 早生温州みかんの全面に処理した場合の経時的な放射能分布比率 (原報告書Table 8)

画分	1ヵ月後			2ヵ月後			4ヵ月後		
	果肉	果皮	葉	果肉	果皮	葉	果肉	果皮	葉
中性酢酸 I^{14}C 画分	29.4	49.0	57.4	24.2	37.5	40.3	14.9	25.4	25.4
酸性酢酸 I^{14}C 画分	5.9	9.1	9.3	8.6	12.6	17.0	19.2	16.1	17.5
n-ブタール画分	—	—	—	—	—	—	37.0	36.9	14.2
水画分	37.7*	27.7*	13.3*	42.6*	29.7*	16.1*	9.5	5.1	1.7
抽出残渣	27.0	14.2	20.0	24.6	20.2	26.6	19.4	16.5	41.2

数値は各分析部位毎の回収放射能に対する%、—：分画せず、*：酸性下酢酸 I^{14}C 抽出後の水画分

いずれの組織においても中性酢酸 I^{14}C 画分は経時的に減少したのに対し、酸性酢酸 I^{14}C 画分及びn-ブタール画分を含めた水画分は増大した。

処理4ヵ月後の中性及び酸性酢酸 I^{14}C 画分中の代謝分解物の比率を表7に示した。

表7 早生温州みかん全面処理した4ヵ月後 (収穫時期) の中性及び酸性酢酸 I^{14}C 画分中代謝分解物の比率 (原報告書Table 9-A, B及びC)

分析部位	I^{14}C (A)				水画分	抽出残渣	合計
果肉	4.0 (0.003)				46.5 (0.038)	19.4 (0.016)	100.0 (0.083)
果皮	10.0 (0.077)				42.0 (0.323)	16.5 (0.127)	100.0 (0.769)
葉	5.4 (0.247)				15.9 (0.726)	41.2 (1.881)	100.0 (4.569)

数値は各分析部位毎の回収放射能に対する% (%TRR)、()内は I^{14}C 換算濃度 (ppm) 申請者注) I^{14}C 換算濃度の一部は申請者が算出した。

収穫時に遊離代謝物の中で確認されたものは I^{14}C (記号A) のほか
であり、主に葉及び果皮中に検出された。
果肉中には検出されなかった。

II-3-3-2. 早生温州みかんに全面処理した場合の代謝分解 (抱合体評価)

処理4ヵ月後の各試料におけるn-ブタール抽出画分を酵素あるいは塩酸加水分解し、酢酸 I^{14}C で分画した結果を表8に示した。

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

表8 n-ブタール抽出画分を酵素あるいは塩酸加水分解した場合の抽出比率(原報告書Table 10)

画分	果肉		果皮		葉	
	酵素処理	6N-塩酸処理	酵素処理	6N-塩酸処理	酵素処理	6N-塩酸処理
酢酸エチル画分	11.5	58.3	15.5	29.2	54.3	70.9
水画分	88.5	41.7	84.5	70.8	45.7	29.1

数値はn-ブタール抽出画分を100とした時の比率。

酵素処理により葉のブタール画分が最も多く加水分解を受けており(54%)、果肉、果皮では12~16%程度であった。塩酸処理によってどの部位も酵素処理以上の加水分解を受けており、特に果肉部は酵素処理との差が47%と最も大きかった。塩酸処理の酢酸エチル画分をTLC分析に供したところ、葉においては

TLC上に検出された。果皮では、果肉ではが少量検出された。酵素及び塩酸による加水分解の結果から、葉組織中ではが、果肉中ではが比較的多く存在しているものと推察された。

申請者注) 葉の水画分の評価については原報告書を参考に以下のように計算した。

果皮及び果肉中の抱合体の評価のために、処理4ヵ月後の各試料を用いて80%エタール抽出液を酵素あるいは塩酸で加水分解し、酸性下での酢酸エチル抽出画分をTLC分析に供した。表9にTLC分析結果を示した。

表9 早生温州みかん処理4ヶ月後抽出液の加水分解後の代謝分解物比率 (原報告書Table 11)

分析部位及び処理方法		イソカテート (A)		その他	水面分	残渣	合計
果肉	β-グルコシダーゼ処理	5.9 (0.005)		22.7 (0.019)	44.5 (0.037)	19.4 (0.016)	100.0 (0.083)
	6N-塩酸処理	6.7 (0.006)		15.9 (0.013)	26.0 (0.022)		
果皮	β-グルコシダーゼ処理	13.2 (0.102)		23.6 (0.182)	33.6 (0.258)	16.5 (0.127)	100.0 (0.769)
	6N-塩酸処理	9.4 (0.072)		11.4 (0.088)	29.0 (0.223)		

数値は各分析部位毎の回収放射能に対する% (%TRR)、()内はイソカテート換算濃度 (ppm) 申請者注) イソカテート換算濃度は申請者が算出した。

果皮及び果肉において、確認された化合物はイソカテート (記号A)、
であり、他はTLC上の原点部近くに局在する
極性分解物であった。中性酢酸エステル画分及び酸性酢酸エステル画分のみ代謝物を示
している表7と比較すると、 の比率はいずれの加水分解によっても増大
した。特に、果肉部では塩酸加水分解によって大きく増大したことから、
が多く存在していることが推察された。

みかんにおけるイソカテートの吸収・移行及び代謝についてまとめた。

みかん処理されたイソカテートは下方部及び根部にもよく移行していたが、上方及び葉への移行は少なかった。葉及び枝から果実内部への移行部位は主に維管束が走っている果心部及び内果皮部であり、これに対して汁肉部への移行はほとんどみられなかった。果皮から果実内部へ、及び果実内部から果皮への相互移行もみられ、また、果実内部の果心部からは果梗を通して枝への移行も確認された。収穫時に残留している化合物 (遊離代謝物) のうちイソカテート (記号A) は葉で0.247ppm、果皮部で0.077ppm、果肉部で0.003ppmであった。

抱合体を酵素及び塩酸により加水分解した結果、葉では が、果皮及び果肉では の比率が増大した。実用濃度処理した場合、収穫時の果肉中での総放射能濃度はイソカテート換算で0.083ppmであった。そのうちイソカテート (記号A) の残留量は最大で0.005ppm、抱合体を含めた 検出されたが、 は検出されなかった (<0.001ppm)。また、汁肉中に放射能は検出されなかった。

以下にイソカテートの早生温州みかん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日産化学工業株式会社にある。

1,4-ジオキサンの早生温州みかんにおける推定代謝経路

②)における代謝試験

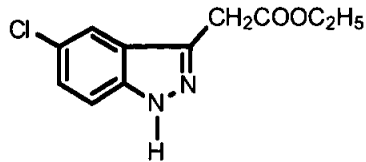
資料No. 14

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2006年

供試標識化合物：標識イコピート



比放射能； MBq/mg (GBq/mmol)

放射化学的純度； %

化学名；5-クロロ-3(1H-インダゾリル)酢酸エチル

供試植物：トウモロコシ (品種；雅)

培土の入った約30cm四方の発砲スチロールポット中で生育させ (1個体/1ポット)、1果実/1個体となったものを購入し、2個体を試験に供した。

処理方法：5ppm濃度の標識イコピート乳剤を調製し処理液とした。

交配27日及び29日後にガラス製噴霧器を用いて手動で散布処理した。慣行施用量である0.0005 g a. i. /株となるように散布水量は100 mL/ポットとした。散布時、トウモロコシ果実は施用液がかからないようにビニールで被覆した。

第2回目処理後30日に果実 (1個/ポット) 及び葉 (2枚/ポット) を採取した。

分析機器：液体シンチレーションカウンター；

自動燃焼装置；

薄層クロマトグラフィー (TLC) ；

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

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ;

HPLC/質量分析計 (LC/MS) ;

分析 方法 : 採取した葉及び果皮部、果肉部と胎座部 (種子を含む) に分けた果実は以下の分析手順に従って分析した。

* : 葉は中性酢酸E71画分と酸性酢酸E71画分を別々に分析に供した。

注) 2個体より採取した各試料はそれぞれ葉、果皮、果肉、胎座 (種子を含む) に分けた後、各部位をあわせて分析に供した。

水面分の特徴付け：果肉、果皮及び葉の水面分①においては、凍結乾燥後、一部を β -グルコシダーゼ (pH4.9の0.1 M酢酸緩衝液に溶解、37℃、16時間)、1 M水酸化ナトリウム (室温、1時間) あるいは7 M水酸化ナトリウム (100℃、3時間) 処理した。アルカリ処理条件は、インドール-3-酢酸におけるエステル型 (糖) 抱合体及びアミド型 (アミノ酸) 抱合体のアルカリ遊離条件にそれぞれ基づいた。各反応終了後、試料をpH2に調整し、酢酸エチルで抽出した。水面分、酢酸エチル画分の放射能を測定後、酢酸エチル画分 (分析用酢酸エチル画分③) をTLCにて展開し、分解物の定性及び定量を行なった。また、一部分解物についてHPLCにより定性を行った。

抽出残渣の特徴付け：葉の抽出残渣①においては、試料の一部を6 M塩酸 (100℃、3時間) あるいは6 M水酸化ナトリウム (100℃、3時間) 処理した。各反応終了後、試料を中和し、含水メタノールにより抽出した。ろ液を減圧下で溶媒留去し、pH2に調整し、酢酸エチルで抽出した。水面分、酢酸エチル画分の放射能を測定後、酢酸エチル画分 (分析用酢酸エチル画分④) をTLCにて展開し、分解物の定性及び定量を行なった。

未知代謝物の構造推定：葉試料より未知代謝物を分離精製した。葉試料を含水メタノールにより抽出し、溶媒留去後酢酸エチルにより抽出した。抽出液をTLCにて展開し、UK-3を分離精製した。また、酢酸エチル抽出後の水面分を7 M水酸化ナトリウム中100℃で1時間処理し、pH2に調整し、酢酸エチルで抽出した。抽出液をTLCにて展開し、UK-1及びUK-2を分離精製した。得られたUK-1、UK-2及びUK-3について、LC/MSにより構造推定を行った。

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

結 果：

果実の放射能分布；前述した分析70-に基づいた果実の放射能分布を表1にまとめた。

表1 果実中放射能分布（原報告書Table 3）

画分	果肉		果皮		胎座(種子含む)		果実合計	
	%TRR	濃度	%TRR	濃度	%TRR	濃度	%TRR	濃度
含水メノール抽出	44.1	0.046	29.6	0.031	3.1	0.003	76.7	0.080
中性酢酸エステル画分①	1.6	0.002	4.2	0.004	0.2	0.000	6.0	0.006
酸性酢酸エステル画分②	14.4	0.015	8.6	0.009	0.9	0.001	23.8	0.025
水画分①	28.1	0.029	16.8	0.018	2.0	0.002	46.9	0.049
抽出残渣①	0.8	0.001	22.5	0.023	0.1	0.000	23.3	0.024
合計	44.8	0.047	52.0	0.054	3.2	0.003	100.0	0.104

濃度：μgイソカドレート換算/g

果実中代謝物；中性酢酸エステル画分①及び酸性酢酸エステル画分②における代謝物を表2にまとめた。

表2 果実中代謝物（原報告書Table 4）

化合物（記号）	果肉	果皮	胎座(種子含む)	合計	
	%TRR	%TRR	%TRR	%TRR	濃度
イソカドレート(記号A)	未検出	0.2	未検出	0.2	0.000
TLC原点部	11.2*	9.6**	0.7	21.6	0.023
その他	0.5	0.5	0.1	1.2	0.001
合計	16.0	12.8	1.1	29.8	0.031

濃度：μgイソカドレート換算/g、*：6代謝物に分離(最大4.3%TRR, 0.004 μgイソカドレート換算/g)、

**：6代謝物に分離(最大5.8%TRR, 0.006 μgイソカドレート換算/g)

果実の総放射能残留量(TRR)は0.104 μg/gであった。果肉、果皮及び胎座（種子を含む）の放射能分布は各々45%TRR、52%TRRおよび3%TRRであった。各部位とも放射能の多くは酸性酢酸エステル画分もしくは水画分に分画された。果皮では抽出残渣に多くの放射能が検出されたが、約0.02 μg/g程度であった。遊離の代謝物で主要であったのは であり(4%TRR)、 が2%TRR以下の割合で検出された。また、果皮にのみ少量のイソカドレート(記号A)が検出された(0.2%TRR、0.001 μg/g未満)。

葉の放射能分布；前述した分析70-に基づいた葉の放射能分布を表3にまとめた。

表3 葉中放射能分布（原報告書Table 3）

画分	%TRR	濃度
表面洗浄液	8.5	0.099
含水メノール抽出	54.2	0.633
酢酸エテル画分(中性)	11.6	0.135
酢酸エテル画分(酸性)	20.3	0.237
水画分	22.3	0.260
抽出残渣	37.3	0.436
合計	100.0	1.169

濃度：μgイソプレノール換算/g

葉中代謝物；表面洗浄、中性酢酸エテル画分①及び酸性酢酸エテル画分②における代謝物を表4にまとめた。

表4 葉中代謝物（原報告書Table 5）

化合物（記号）	表面洗浄	中性酢酸エテル画分①	酸性酢酸エテル画分②	合計	
	%TRR	%TRR	%TRR	%TRR	濃度
イソプレノール（記号A）	1.8	1.3	未検出	3.1	0.036
TLC原点部	2.1	5.3*	14.8**	22.3	0.260
その他	3.3	1.4	1.1	5.8	0.067
合計	8.5	11.6	20.3	40.4	0.472

濃度：μgイソプレノール換算/g、*：5代謝物に分離（最大3.5%TRR, 0.040 μgイソプレノール換算/g）、

**：7代謝物に分離（最大6.3%TRR, 0.073 μgイソプレノール換算/g）

葉のTRRは1.169 μg/gであった。アセトニトリル表面洗浄及び葉（洗浄後）の放射能分布は各々9%TRR及び92%TRRであり、散布されたイソプレノールの葉内部への移行が大きいことが示唆された。表面洗浄中主要であったのはイソプレノール（記号A）及びTLC原点部の極性代謝物であった。また、

が検出された。このうち、

は光分解に

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

よる生成物と考えられた。一方、表面洗浄後の葉では、54%TRRが含水メタノールに抽出され、37%TRRは抽出残渣であった。含水メタノール抽出画分中放射能の多くは酸性酢酸Efl画分もしくは水画分に分画された。遊離の代謝物の様相は表面洗浄とほぼ同様であったが、そのうち主要であったのは
であった(3~4%TRR)。葉におけるEflの残留量は3%TRR (0.036 µg/g)であった。

果実及び葉の水画分の特徴付け；各試料の水画分に関する特徴付け結果を表5（酵素処理）及び表6（Alkali処理）にまとめた。

表5 水画分酵素処理（原報告書Table 6）

画分/化合物（記号）	果肉		果皮		葉	
	酵素ブランク	酵素処理	酵素ブランク	酵素処理	酵素ブランク	酵素処理
酢酸Efl画分	5.7	6.0	3.0	3.0	4.8	8.9
TLC原点部	5.0	5.1	2.7	2.7	3.6	3.0
その他	0.8	0.9	0.3	0.3	0.2	0.4
水画分	22.4	22.1	13.8	13.8	17.5	13.4
合計	28.1	28.1	16.8	16.8	22.3	22.3

数値は%TRR

表6 水画分Alkali処理（原報告書Table 7及び8）

画分/化合物（記号）	果肉		果皮		葉	
	1 M処理	7 M処理	1 M処理	7 M処理	1 M処理	7 M処理
酢酸Efl画分	6.9	18.8	4.6	9.6	7.1	15.4
TLC原点部	6.2	2.3	4.0	2.7	4.8	3.7
その他	0.6	0.9	0.3	0.7	0.3	1.2
水画分	21.2	9.3	12.2	7.2	15.2	6.9
合計	28.1	28.1	16.8	16.8	22.3	22.3

数値は%TRR

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

水画分中の代謝物は酢酸エチル画分中TLC原点部代謝物と類似していることが示唆され、さらに酵素およびアルカリ処理の結果から、果肉、果皮及び葉ともが主要であると考えられた。また、少量ではあるがの存在が示唆された。

葉の抽出残渣の特徴付け；葉の抽出残渣を酸あるいはアルカリ処理した結果を表7にまとめた。

表7 葉抽出残渣酸・アルカリ処理（原報告書Table 9）

画分/化合物（記号）	6 M酸処理	6 Mアルカリ処理
含水メノール抽出	19.5	24.6
酢酸エチル画分	15.9	19.2
TLC原点部	1.6	3.8
その他	2.4	3.1
水画分	3.6	5.4
抽出残渣	17.9	12.7
合計	37.3	37.3

数値は%TRR

葉抽出残渣中には、あるいはその修飾された代謝物が主に存在していた。

推定代謝分解経路；

エチルエステルのメチンにおける代謝分解反応は、エステル加水分解とそれに続く糖およびアミノ酸抱合化、側鎖水酸化及びエステル加水分解とそれに続く糖およびアミノ酸抱合化、また一部脱炭酸されたり、カルボン酸がメチル化されることが推定された。エチルエステルのメチンにおける推定代謝経路を以下の図に示した。

図 17 カロゼートの反応における推定代謝経路

③かきにおける代謝試験

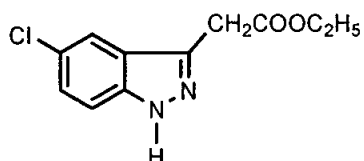
資料No. 15

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

供試標識化合物： 標識イフェト[®]-ト



比放射能； MBq/mg (1.98 GBq/mmol)

放射化学的純度； %以上

化学名；イフェ=5-クロロ-3(1*H*)-インダゾリルアセート

供試植物：かき（品種；富有）

米国カリフォルニア州の果樹園で生育された典型的な成熟木を処理区及び無処理区用に各々1本ずつ選択した。

処理方法：慣行施用にあわせるために、20% イフェト[®]-ト乳剤を調製し、水で希釈して40 mg/Lの処理濃度とし、処理水量は500 L/10aとした。BBCH 74（満開から70-80日後）及びその18日後に噴霧器を用いて処理した。処理面積(3 m²)から処理量は、200 g ai/haと算出された。

試料採取：2回目処理67日後に処理区及び無処理区からそれぞれ果実及び葉を採取した。

分析機器：液体シンプレクションカウンター；

試料燃焼装置；

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)；

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

分析方法：採取した果実及び葉を以下の70-に従って分析した（原報告書Figure 1-8）。

酢酸Et₂O及び水画分のAl₂O₃処理：一部の酢酸Et₂O画分及び水画分は乾固後、それぞれ7M水酸化ナトリウム水溶液を加え、100℃で3時間処理した。反応終了後、pH2に調整し、酢酸Et₂Oで抽出した。酢酸Et₂O画分をTLC及びHPLCに供し、分解物の定性及び定量を行なった。

残渣の加水分解：各残渣の一部に6 M塩酸あるいは6 M水酸化ナトリウム水溶液を加え、100℃で3時間処理した。各反応終了後、試料を中和し、含水メタノールにより抽出した。ろ液を減圧下で溶媒留去し、pH2に調整し、酢酸Et₂Oで抽出した。水画分、酢酸Et₂O画分の放射能を測定後、酢酸Et₂O画分をTLC及びHPLCに供し、分解物の定性及び定量を行なった。

酵素処理：上記の酸あるいはアルカリ処理後の残渣をセルラーゼ及びペクチナーゼを含むpH5酢酸緩衝液中でインキュベートした（50-60℃、一晚）。残渣が完全に溶解した状態で酢酸エチルで抽出した。水面分、酢酸エチル画分の放射能を測定後、酢酸エチル画分をTLC及びHPLCに供し、分解物の定性及び定量を行なった。

結 果：

放射能分布；果実及び葉中の放射能分布を表1にまとめた。

表1. 果実及び葉中放射能分布（原報告書Table 2及び3）

画分	果実		葉	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
表面洗浄	6.6	0.006	24.5	2.039
含水メタノール抽出	65.3	0.063	37.9	3.151
酢酸エチル画分	37.6	0.036	22.3	1.856
7Mアルカリ処理後酢酸エチル画分	32.3	0.031	19.6	1.631
7Mアルカリ処理後水面分	5.3	0.005	2.7	0.225
水面分	27.7	0.027	15.6	1.298
7Mアルカリ処理後酢酸エチル画分	19.8	0.019	11.3	0.940
7Mアルカリ処理後水面分	7.9	0.008	4.3	0.358
残渣	28.1	0.027	37.6	3.133
6Mアルカリ処理	23.6	0.023	28.8	2.399
アルカリ処理後酢酸エチル画分	21.2	0.020	19.7	1.639
アルカリ処理後水面分	2.4	0.002	9.1	0.757
酵素処理（アルカリ処理後）	4.6	0.004	8.8	0.733
酵素処理後酢酸エチル画分	1.3	0.001	3.1	0.258
酵素処理後水面分	3.3	0.003	5.7	0.474
6M酸処理	11.2	0.011	16.0	1.334
酸処理後酢酸エチル画分	8.0	0.008	11.1	0.924
酸処理後水面分	3.2	0.003	4.9	0.408
酵素処理（酸処理後）	16.9	0.016	21.6	1.799
酵素処理後酢酸エチル画分	2.8	0.003	1.7	0.141
酵素処理後水面分	14.1	0.014	19.9	1.656
合計	100.0	0.096	100.0	8.322

合計＝表面洗浄＋含水メタノール抽出＋抽出残渣

果実及び葉の総放射能残留量（TRR）はそれぞれ0.096 mg/kg及び8.322 mg/kgであった。果実中の放射能分布は、含水メタノール抽出が主要であり（65%）、残渣に28%、表

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

面洗浄に7%であった。水画分中の放射能の7割程度がアルカリ処理後に酢酸エチルによって抽出された。残渣中の一部の放射能はアルカリ及び酸処理によって抽出され、その抽出率はアルカリ処理で24%、酸処理で11%であった。その後の酵素処理によって残渣は完全に溶解された。葉中の放射能分布は、表面洗浄に25%、含水メタノール抽出に38%、残渣に38%であった。水画分中の放射能の7割程度がアルカリ処理後に酢酸エチルによって抽出された。残渣中の一部の放射能はアルカリ及び酸処理によって抽出され、その抽出率はアルカリ処理で29%、酸処理で16%であった。その後の酵素処理によって残渣は完全に溶解された。無処理区の果実及び葉中放射能レベルは0.001 mg/kg未満であった。

残留代謝物；分析70-中の①～⑥の分析結果に基づいて、果実及び葉中代謝物をそれぞれ表2及び表3にまとめた

表2. 果実中代謝物 (原報告書Table 6、7、12及び14)

化合物 (記号)	アルカリ処理及び酵素処理を含む有機画分		酸処理及び酵素処理を含む有機画分	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
イソカトール (記号A)	6.3	0.006	6.3	0.006
原点部	8.4	0.008	9.6	0.009
未知代謝物合計	36.0	0.035	18.8	0.019
最大未知代謝物	6.5	0.006	5.1	0.005

()内はアルカリ及び酵素処理あるいは酸及び酵素処理によって遊離された比率を示す。

申請者注) 原点部及び未知代謝物合計は酸、アルカリ処理後の結果を基に申請者が算出した。

果実中のイソカトールの比率は、6.3%TRR (0.006 mg/kg) であった。主要残留物は
検出、同定された。

は、アルカリあるいは酸処理によって17.2%TRRあるいは21.4%TRR増加したことから、大部分が植物成分との結合体及び抱合体として存在することが示唆された。その他の代謝物として5%TRR未満で

が検出、同定された。の一部は植物

成分との結合体及び抱合体であることが示唆された。一方、原点部を含むその他の未知代謝物は数多く確認されたが、個々の残留レベルは低く、0.006 mg/kgを超えて検出される代謝物は見られなかった。

表2. 葉中代謝物 (原報告書Table 8、9、13及び15)

化合物 (記号)	アルカリ処理及び酵素処理を含む有機画分		酸処理及び酵素処理を含む有機画分	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
イソロブロン (記号A)	8.9	0.739	8.9	0.739
原点部	20.4	1.695	13.5	1.126
未知代謝物合計	25.1	2.087	23.9	1.989
最大未知代謝物	4.0	0.334	4.0	0.334

()内はアルカリ及び酵素処理あるいは酸及び酵素処理によって遊離された比率を示す。

申請者注) 原点部及び未知代謝物合計は酸、アルカリ処理後の結果を基に申請者が算出した。

葉中で5%TRR以上の残留物はイソロブロン (記号A)、

であり、それぞれ最大で8.9%TRR (0.739 mg/kg)、

検出、同定された。

の一部は、植物成分との結合体及び抱合体として存在することが示唆された。その他に4%TRR未満で、イソロブロンが検出、同定された。一方、原点部を含むその他の未知代謝物は数多く確認され、個々の最大残留レベルは4%TRR (0.334 mg/kg) であった。

イソロブロンのかきにおける代謝分解反応は、エステル加水分解、側鎖の酸化に続く脱炭酸及びカルボン酸を有するイソロブロンの植物成分との結合及び抱合体が推定された。また、数多くの極性代謝物が確認されており、それらの一部は植物成分との結合が示唆された。イソロブロンのかきにおける推定代謝経路を以下の図に示した。

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

図 エフェートのかきにおける推定代謝経路

植物代謝試験のまとめ (資料 No. 12、14、15)

14C-エチレートの適用作物である温州みかん、りん及びかきでの植物代謝試験を実施した。試験方法の概要を表1に示した。

表1 植物代謝試験方法の概要

作物	温州みかん	りん	かき
資料No.	12	14	15
処理剤型/処理方法	乳剤/塗布	乳剤/散布	乳剤/散布
処理濃度	200ppm	5ppm	40ppm
処理回数	1回	2回	2回
試料採取日	処理1、2、4ヶ月後	2回目処理30日後	2回目処理67日後
試料分析部位	果実及び葉	果実及び葉	果実及び葉

(1) 果実及び茎葉における放射能分布

温州みかんでの処理4ヶ月後、りんでの2回目処理30日後、かきでの2回目処理67日後の果実及び葉における総放射性残留物濃度 (TRR) 及び各画分への分布比率 (%TRR) を表2に示した。

表2 ¹⁴C-エチレート処理後の温州みかん、りん及び柿における放射能分布

作物名	温州みかん			りん		かき	
分析時点	処理4ヶ月後			2回目処理30日後		2回目処理67日後	
分析部位	果実		葉	果実	葉	果実	葉
	果肉	果皮					
TRR (ppm)	0.083	0.769	4.569	0.104	1.169	0.096	8.322
表面洗液 (%TRR)	-	-	-	-	8.5	6.6	24.5
抽出 (%TRR)	80.6	83.5	58.8	76.7	54.2	65.3	37.9
残渣 (%TRR)	19.4	16.5	41.2	23.3	37.3	28.1	37.6

- : 実施せず

いずれの作物においても、葉のほうが果実よりも抽出残渣が多く、これらはりんとかきの特徴付けから植物成分との結合に起因していると考えられた。

(2) 果実及び葉における代謝物

温州みかんでの処理4ヶ月後、りんでの2回目処理30日後、かきでの2回目処理67日後の果実及び葉において検出された代謝物の比率 (%TRR) を表3に示した。

表3 果実及び葉におけるエチレート代謝物の比率

代謝物 (記号)	温州みかん			りんご		かき	
	処理4ヶ月後			2回目処理30日後		2回目処理67日後	
	果肉	果皮	葉	果実	葉	果実	葉
エチレート(A)	4.0	10.0	5.4	0.2	3.1	6.3	8.9

ND：検出せず、空白：確認せず

()内は酸、アルカリ及び酵素処理によって遊離された最大比率を示す。

各果実中の可食部の残留成分に関し、エチレート(記号A)の比率は温州みかん果肉で4.0% TRR (0.003 ppm)、りんご果肉で未検出、かき果実で6.3% TRR (0.006 ppm)であり、その他成分の比率は全て10% TRR未満(0.01 ppm未満)であった。検出された代謝分解物の様相は、各作物間で類似しており、加水分解による

の生成、

の生成が確認された。また、

の植物成分との結合が推定された。これらの中でエチルエステルの加水分解に

よる

の生成が植物体内での主要代謝反応であることが示唆された。

3. 土壌における運命

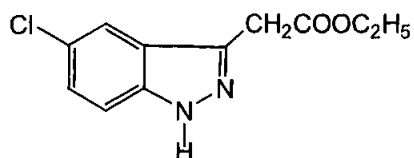
好氣的土壌中運命試験

資料No. 13

試験機関：

報告書作成年：1979年

供試標識化合物： 標識エチルピコレート



比放射能； MBq/mg (mCi/mmol)

放射化学的純度； %

化学名； 5-クロロ-3(1H-インダゾリル)酢酸エチル

供試土壌：以下の2種類の土壌を用いた。

採取地	土壌の種類	土性	粘土含量 (%)	全炭素 (%)	C. E. C. * (me/100g)	pH (H ₂ O)
栃木	火山灰土壌	埴壤土	18.4	9.2	35.3	6.4
愛知	洪積土壌	埴壤土	22.5	0.5	7.0	6.2

* : 陽イオン交換容量

試験方法：各土壌25g(乾土換算)を30℃で30日間前培養した。水分含量を最大容水量の60%に調整した後、標識エチルピコレートを1ppm (25μg/25g乾土) 及び10ppm (250μg/25g乾土) の濃度で処理し、30℃の暗所で培養した。処理後、0、1、3、7、14及び28日後に採取し、次頁に示した分析手順に従って分析した。炭酸ガスの捕集には、1Nの水酸化カリウム水溶液を用いた。

一方、栃木土壌100g(乾土換算)に標識エチルピコレートを20mg処理し、30日間培養し、代謝物同定用試料とした。

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

処理量の設定根拠；本化合物の20%製剤の1000倍希釈液を107-ルあたり500L処理した場合（土壌深10cm、比重1として）の土壌中濃度は1ppmとなる。

薄層クロマトグラフィー (TLC) ；

代謝物の定量及び同定；

結果：畑条件の栃木土壌及び愛知土壌における各画分の放射能の経時的な変化を表1-1～表1-4に示した。

表1-1 栃木土壌1ppm処理における各画分の放射能の経時的変化（原報告書Table 4）

画分	処理後日数					
	0	1	3	7	14	28
酢酸エフル画分*	101.4	90.95	82.57	73.68	74.46	57.92
第1画分 ¹⁾	99.20	38.06	23.54	15.11	10.59	7.02
第2画分 ²⁾	2.20	52.89	59.03	58.57	63.87	50.90
水溶性画分	0.13	0.26	0.85	0.41	0.86	2.95
抽出残渣	0.63	6.92	13.87	22.71	19.00	30.54
¹⁴ C ₂	—	—	—	2.81	4.82	7.25
合計	102.16	98.13	97.29	99.61	99.14	98.66

数値は処理放射能に対する%

*：申請者が計算して記載した。—：該当なし

1)：80%エタノール抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

2)：エタノール/1N塩酸(4/1)抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

表1-2 栃木土壌10ppm処理における各画分の放射能の経時的変化（原報告書Table 4）

画分	処理後日数					
	0	1	3	7	14	28
酢酸エフル画分*	96.04	90.82	85.57	80.93	74.83	71.77
第1画分 ¹⁾	94.46	50.75	51.91	17.00	14.41	12.98
第2画分 ²⁾	1.58	40.07	33.96	63.93	60.42	58.79
水溶性画分	0.04	0.08	0.07	0.15	0.15	0.28
抽出残渣	0.49	5.94	9.39	15.43	22.02	25.90
¹⁴ C ₂	—	—	—	0.80	1.12	1.54
合計	96.57	96.84	95.33	97.31	98.12	99.49

数値は処理放射能に対する%

*：申請者が計算して記載した。—：該当なし

1)：80%エタノール抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

2)：エタノール/1N塩酸(4/1)抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

表1-3 愛知土壤1ppm処理における各画分の放射能の経時的変化 (原報告書Table 5)

画 分	処理後日数					
	0	1	3	7	14	28
酢酸エフル画分*	100.80	95.35	92.21	80.31	56.77	42.23
第1画分 ¹⁾	98.70	55.70	48.75	42.20	26.85	13.68
第2画分 ²⁾	2.10	39.65	43.46	38.11	29.92	28.55
水溶性画分	0.89	0.86	1.34	2.11	2.74	4.87
抽出残渣	0.18	2.45	3.98	13.30	13.58	19.48
¹⁴ C ₂	—	—	—	3.51	12.50	15.83
合 計	101.87	98.66	97.53	99.23	87.59	82.42

数値は処理放射能に対する%

* : 申請者が計算して記載した。— : 該当なし

1) : 80%エタノール抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

2) : エタノール/1N塩酸 (4/1) 抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

表1-4 愛知土壤10ppm処理における各画分の放射能の経時的変化 (原報告書Table 5)

画 分	処理後日数					
	0	1	3	7	14	28
酢酸エフル画分*	98.77	93.92	94.63	91.67	82.49	73.52
第1画分 ¹⁾	98.06	74.26	64.79	51.86	43.99	35.68
第2画分 ²⁾	0.71	19.66	29.84	39.81	38.50	37.84
水溶性画分	0.06	0.14	0.40	0.59	0.99	1.53
抽出残渣	0.06	1.83	3.78	6.61	8.36	18.03
¹⁴ C ₂	—	—	—	2.04	3.51	5.84
合 計	98.89	95.89	98.91	100.91	95.35	98.87

数値は処理放射能に対する%

* : 申請者が計算して記載した。— : 該当なし

1) : 80%エタノール抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

2) : エタノール/1N塩酸 (4/1) 抽出液を酢酸エフルで抽出した画分

畑条件でのエチレート 1ppm及び10ppm濃度処理における代謝物の結果をそれぞれ表2-1 (原報告書Table. 7, 9を合せて表記) 及び表2-2 (原報告書Table. 8, 10を合せて表記) に示した。

表-2-1 1ppm処理した土壤中のイソプロパノール代謝物の経時的変化 (原報告書Table 7及び9)

土壌名 及び 処理後日数		イソプロパノール				原 点	その他 代謝物	合計*
		A						
栃木 土壌	0日	87.1				—	11.8	100.1
	1日	45.0				4.8	12.7	90.9
	3日	15.1				4.3	11.1	82.6
	7日	8.9				3.6	11.3	73.7
	14日	6.0				4.1	10.3	74.5
	28日	7.0				4.0	9.9	57.9
愛知 土壌	0日	81.2				2.4	10.0	100.8
	1日	22.4				4.8	21.3	95.4
	3日	6.8				4.6	18.8	92.2
	7日	3.9				3.0	12.5	80.3
	14日	2.2				4.2	10.6	56.9
	28日	2.1				5.4	10.2	42.2

数値は処理放射能に対する%、*：合計値は申請者が計算して記載した。

表-2-2 10ppm処理した土壤中のイソプロパノール代謝物の経時的変化 (原報告書Table 8及び10)

土壌名 及び 処理後日数		イソプロパノール				原 点	その他 代謝物	合計*
		A						
栃木 土壌	0日	80.8				1.6	12.0	95.7
	1日	58.6				3.5	13.3	90.8
	3日	44.9				2.0	11.7	85.9
	7日	10.7				2.0	10.6	80.9
	14日	11.1				2.2	11.9	74.8
	28日	11.5				2.7	14.8	70.8
愛知 土壌	0日	83.8				1.6	11.0	98.8
	1日	47.8				1.6	10.2	93.9
	3日	35.0				3.0	10.9	94.6
	7日	7.5				3.1	9.5	91.7
	14日	6.8				5.6	6.3	82.6
	28日	3.5				5.5	7.7	73.5

数値は処理放射能に対する%、*：合計値は申請者が計算して記載した。

イソプロパノール(記号A)はいずれの土壌においても速やかに分解し、その半減期は1ppm濃度においては1~2日、10ppm濃度では2~4日であった。分解物としては、

が検出された。これらの生成量については親化合物イソプロパノールの分解に伴い が急激に増加したが、処理3~7日以降は次第に減少した。一方、 の減少に伴い、増加したが、これも経時的に減少していく傾向が認められた。また、 は少量しか検出されなかった。

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

炭酸ガスの生成は愛知土壌で処理28日後に処理量の15%に達したが、栃木土壌では10%以下であった。土壌の抽出残渣は処理28日後で、愛知土壌で18~19%、栃木土壌で26~31%であった。以上のことから、1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)は畑土壌中で処理後速やかに減衰することによって、処理後の早い時期においては土壌中に残留している化合物のほとんどが1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)となり、処理後日数の経過に伴い、1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)が減少し、1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)が増加して代謝物の大半を占めるようになるが、経時的に炭酸ガスへ分解して行くことが確認された。以下に1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)の好気性土壌における推定代謝経路を示した。

1,4-ジオキサベンゼン(1,4-DIOXABENZENE)の好気性土壌における推定代謝経路図

4. 水中運命に関する試験

①加水分解運命試験

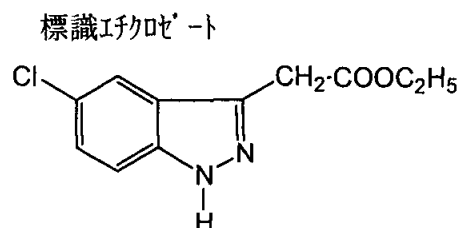
資料 No. 補遺 18

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

供試標識化合物：



比放射能； MBq/mg

放射化学的純度； %以上

非標識体純度； %

化学名；5-クロロ-3-(1H-イミダゾール)酢酸エチル

供試水溶液：CLARK AND LUBS の 0.05 mol/L 緩衝液 pH 7.0、9.0 を滅菌して使用した (試験時：0.025mol/L)。

申請者注) pH 4 におけるイフェドールは安定であることが物化性試験で確認されており、本試験では pH 7 及び 9 での試験を行なった。

試験方法：試験濃度は 50 mg/L (被験物質の水溶解度は 20 °C で 189.7 mg/L) とし、ガラス製試験管に 5 mL の試験水を注入し、25 °C、暗所下でインキュベートした。下表に示す処理後日数に試料を採取した。

pH 7

採取時間 (単位：日)						
0	5	9	15	20	26	30

pH 9

採取時間 (単位：時間)							
0	6	24	48	72	144	216	336

試験水の分析は以下の分析方式に従って行った。

各 pH におけるイフェドールの半減期は該当成分の残存率の対数と処理後日数より回帰式を作成して算出した。

結果：各 pH の 分布を表 1 及び 2 に示した。

表 1 pH 7 における 分布 (原報告書 Table 6)

画分	処理後の日数						
	0	5	9	15	20	26	30
酢酸エチル画分	101.8 (50.9)	105.4 (52.7)	103.8 (51.9)	101.3 (50.7)	107.5 (53.8)	102.6 (51.3)	105.5 (52.8)
エチルクロゼート(A)	101.8 (50.9)	103.2 (51.6)	99.4 (49.7)	95.0 (47.5)	98.3 (49.2)	90.5 (45.3)	93.1 (46.6)
水画分	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)
合計	101.8 (50.9)	105.3 (52.7)	103.7 (51.9)	101.3 (50.7)	107.4 (53.7)	102.6 (51.3)	105.5 (52.8)

数値は処理放射能に対する%

申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 50 mg/L を基に申請者が濃度(mg/L)を算出した。

表 2 pH 9 における 分布 (原報告書 Table 7)

画分	処理後の時間							
	0	6	24	48	72	144	216	336
酢酸エチル画分	98.7 (49.3)	97.9 (49.0)	97.6 (48.8)	99.2 (49.6)	98.9 (49.4)	97.9 (48.9)	95.0 (47.5)	98.5 (49.3)
エチルクロゼート(A)	98.2 (49.1)	90.5 (45.3)	72.0 (36.0)	51.8 (25.9)	38.7 (19.3)	16.6 (8.3)	7.0 (3.5)	1.4 (0.7)
水画分	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)
合計	98.6 (49.3)	97.9 (48.9)	97.6 (48.8)	99.2 (49.5)	98.9 (49.4)	97.9 (48.9)	95.0 (47.5)	98.5 (49.3)

数値は処理放射能に対する%

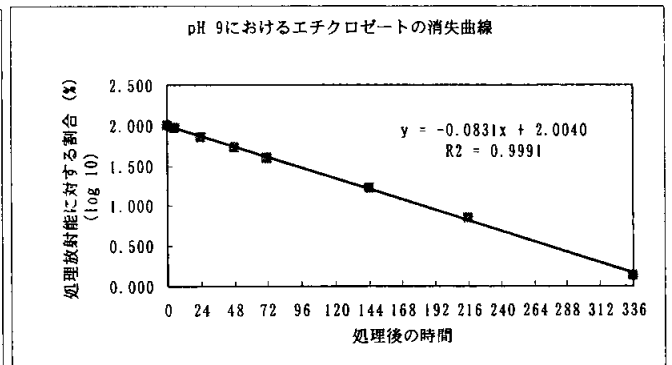
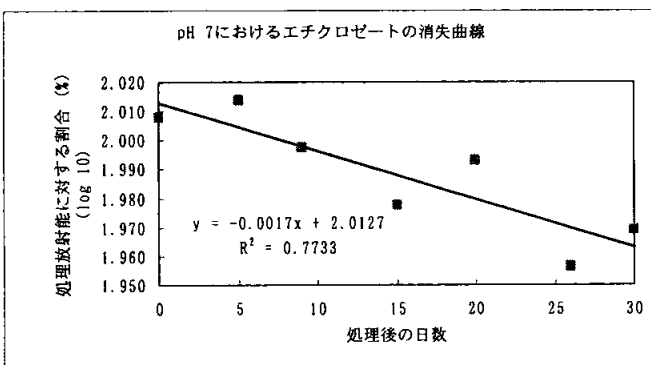
申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 50 mg/L を基に申請者が濃度(mg/L)を算出した。

pH 7 において 10 %以上検出された分解物は であつた。

pH 9 において 10 %以上検出された分解物は であつた。

両 pH とも J-455 酸以外の分解物は検出されなかつた。

pH 7 及び 9 におけるエチルクロゼートの推定半減期は、以下の消失曲線より算出した。



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

推定半減期

試験温度	pH	DT50
25 °C	7	181.2 日
	9	2.3 日

エチレートの推定加水分解経路を以下に示した。

エチレートの推定加水分解経路

②水中光分解運命試験

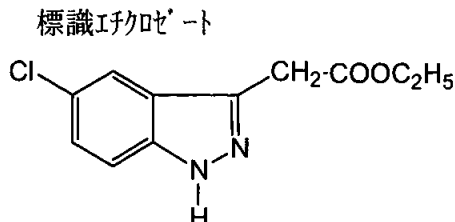
資料 No. 補遺 19

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

供試標識化合物：



比放射能； MBq/mg

放射化学的純度； %以上

非標識体純度； %

化学名；5-クロロ-3-(1H-インダゾリル)酢酸エチル

供試水：日本薬局方精製水（以下蒸留水）及び小貝川河川水を滅菌して使用した。河川水は2003年7月23日に茨城県水海道市箕輪町じょうそう橋付近にて採取した。蒸留水及び河川水の滅菌後のpHはそれぞれ6.02及び8.02であった。

光源：キノンランプ（波長範囲290nm～800nm、UV特殊ガラスフィルター付）を設置した人工光照射装置SUNTEST XLS+を使用した。

光強度：450W/m²（測定波長範囲300nm～800nm）

試験方法：試験濃度は50 mg/L（被験物質の水溶解度は20℃で189.7 mg/L）とし、照射区用としてガラス製光分解試験容器（光入射面：石英ガラス製）、暗所区用としてガラス製試験管にそれぞれ10mLの試験水を注入し、25±2℃、光照射及び暗所下でインキュベートした（溶解補助剤としてアセトリルを0.9%で使用）。揮発性有機物のトラップとして2-エトキシエタノール、炭酸ガストラップとして0.2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を使用した。

下表に示す処理後時間に試料を採取した。

供試水	光条件	処理後時間 (h)						
		0	4	12	16	24	48	72
滅菌蒸留水	照射区	○	○	○	○	○	○	○
	暗所区	-	-	-	-	-	-	○

供試水	光条件	処理後時間 (h)						
		0	6	16	24	48	96	168
滅菌河川水	照射区	○	○	○	○	○	○	○
	暗所区	-	-	-	-	○	-	○

○：試験水を採取、-：未実施

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

各トラップ中の放射能の測定は、試験水を塩酸で酸性にし、試験系内の気体を1時間以上吸引後、LSCにて測定した。試験水の分析は以下の分析70-に従って行った。

イソトープ及び減少が確認された10%以上の主要分解物における半減期は該当成分の残存率の対数と処理後日数より回帰式を作成して算出した。自然太陽光下における半減期は本試験の半減期に4.551を乗じて求めた。

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

結果：滅菌蒸留水及び滅菌河川水中の¹⁴C分布をそれぞれ表1及び表2に示した。

表1 滅菌蒸留水中の¹⁴C分布（原報告書 Table 8）

画分	処理後時間 (hour)							
	照射区							暗所区
	0	4	12	16	24	48	72	
酢酸エチル画分	99.7 (49.9)	98.0 (49.0)	88.0 (44.0)	73.3 (36.7)	81.3 (40.7)	61.9 (31.0)	53.7 (26.9)	98.8 (49.4)
エチルピレート(A)	98.4 (49.2)	92.2 (46.1)	41.1 (20.6)	3.5 (1.8)	23.2 (11.6)	<1.6 (0.8)	<1.5 (0.8)	98.2 (49.1)
水面分	0.1 (0.1)	1.3 (0.7)	9.8 (4.9)	19.8 (9.9)	13.0 (6.5)	25.0 (12.5)	31.7 (15.9)	0.1 (0.1)
有機トラップ	—	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	—
アルカリトラップ	—	<0.1 (<0.1)	0.8 (0.4)	4.8 (2.4)	2.3 (1.2)	9.8 (4.9)	9.7 (4.9)	—
合計 (回収)	99.8 (49.9)	99.2 (49.6)	98.6 (49.3)	97.8 (48.9)	96.6 (48.3)	96.7 (48.4)	95.0 (47.5)	98.9 (49.5)

数値は処理放射能に対する%、—：未実施

申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 50 mg/L を基に申請者が濃度 (mg/L) を算出した。

表2 滅菌河川水中の¹⁴C分布（原報告書 Table 9）

画分	処理後時間 (hour)								
	照射区							暗所区	
	0	6	16	24	48	96	168	48	168
酢酸エチル画分	99.9 (50.0)	97.9 (49.0)	87.6 (43.8)	71.5 (35.8)	66.0 (33.0)	46.2 (23.1)	39.5 (19.8)	99.8 (49.9)	101.0 (50.5)
エチルピレート(A)	98.6 (49.3)	91.3 (45.7)	72.5 (36.3)	48.1 (24.1)	41.9 (21.0)	8.5 (4.3)	<0.7 (<0.4)	81.3 (40.7)	71.1 (35.6)
水面分	0.1 (0.1)	2.8 (1.4)	12.3 (6.2)	26.0 (13.0)	31.0 (15.5)	46.4 (23.2)	52.0 (26.0)	0.1 (0.1)	0.2 (0.1)
有機トラップ	—	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	—	—
アルカリトラップ	—	<0.1 (<0.1)	0.1 (0.1)	0.3 (0.2)	0.4 (0.2)	1.8 (0.9)	3.8 (1.9)	—	—
合計 (回収)	100.0 (50.0)	100.7 (50.4)	100.0 (50.0)	97.8 (48.9)	97.5 (48.8)	94.4 (47.2)	95.3 (47.7)	100.0 (50.0)	101.2 (50.6)

数値は処理放射能に対する%、—：未実施

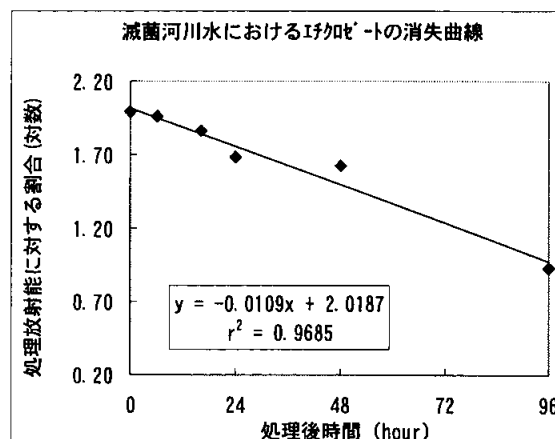
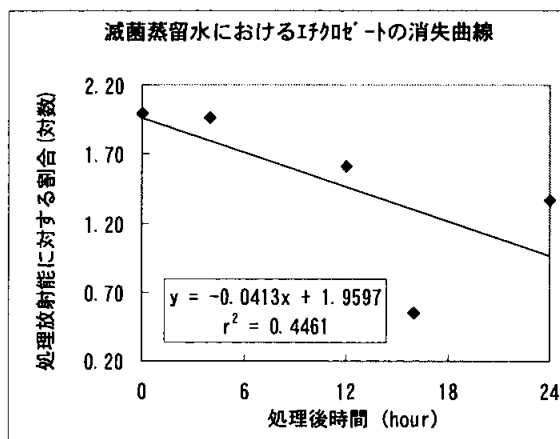
申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 50 mg/L を基に申請者が濃度 (mg/L) を算出した。

滅菌蒸留水中においてイソプロピレート(記号 A)は光照射時間の経過とともに速やかに減少し、10 %以上の主要な分解物として $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2\text{H}$ が検出された。水面分中の比率が増加したが、10 %以上の分解物はなかった。マイナー分解物として $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2\text{H}$ が検出された。

は更に分解し、極性分解物を經由し、二酸化炭素を生成することが示唆された。一方、暗所下ではイソプロピレートはほとんど分解しなかった。滅菌河川水中においてもイソプロピレートは光照射時間の経過とともに減少した。主要分解物は検出されなかった。水面分中の比率が増加したが、10 %以上の分解物はなかった。マイナー分解物として

が検出された。滅菌蒸留水の場合と同様、イソプロピレートは極性分解物を經由し二酸化炭素を生成することが示唆された。暗所下では pH の影響により、イソプロピレートが加水分解し、主要分解物として $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2\text{H}$ が検出された。

イソプロピレート、の照射区における推定半減期は、消失曲線より算出した。以下に滅菌蒸留水及び滅菌河川水におけるイソプロピレートの消失曲線を示した。



推定半減期

	光照射区 (日)				暗所区 (日)	
	実験値		北緯 35° 春の太陽光換算値		実験値	
	滅菌蒸留水	滅菌河川水	滅菌蒸留水	滅菌河川水	滅菌蒸留水	滅菌河川水
イソプロピレート (A)	0.3034	1.154	1.381	5.254	> 3	16.14

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

エポキシ樹脂の推定分解経路を以下に示した。

エポキシ樹脂の推定水中光分解経路

代謝分解のまとめ

イソプロトの動物、植物及び土壌等における代謝分解の要約は下記のとおりであり、代謝分解経路をIX-58頁に、結果の概要をIX-59頁に示した。

1. 動物における代謝分解

標識イソ

プロトを用いて、ラット代謝試験を実施した。

静脈内投与 (1mg/kg) 及び経口投与 (10mg/kg) のいずれの群でも速やかに排泄された。主要な排泄経路は尿中であり、いずれの投与群でも24時間までに投与量の約85%が排泄された。胆汁中への排泄は少なく (投与量の3%以下) であり、胆汁排泄は主要な排泄経路ではなかった。両投与群の尿中排泄率の比較及び胆汁排泄試験より推定した吸収率は98%以上であった。一方、経口投与で行った組織内濃度の検討では、特に腎臓で比較的短い時間に最高濃度に達することが確認されたが、以後急速に減少し、24時間後では0.01ppm以下にまで減少し、組織への蓄積性はなかった。この傾向は血中においても同様であった。

代謝物の分析は経口投与したラットの24時間までに排泄された尿及び2時間までに採取した血清を用いて検討した。尿中では親化合物はほとんど検出されず (尿中放射能の0.1%)、尿中放射能の約80%が である。その他にTLC上で2個のスポット (尿中放射能に対する比率：約2%、約17%) が検出されたが、同定には至らなかった。血清中の代謝物は放射エネルギーが少なく、分離も悪かったため、代謝物の同定及び定量はできなかった。

2. 植物における代謝分解

標識イソプロトを用いて、温州みかんの代謝試験を、また、

標識イソプロトを用いて、アロニア及びかきの代謝試験を実施した。

温州みかんの葉面及び果実処理では、果実に近い葉からの果実内への移行がみられたが、同時に果実からの移行も行われており、果実部への集積性はなかった。また、アロニア茎葉部から果実へ移行が確認された。

いずれの作物においても、葉のほうが果実よりも抽出残渣が多く、これらはアロニアとかきの特徴付けから植物成分との結合に起因していると考えられた。

各果実中可食部の残留成分について、イソプロト (記号A) の比率は温州みかん果肉で4.0% TRR (0.003 ppm)、アロニア果肉で未検出、かきの果実で6.3% TRR (0.006 ppm) であった。かきの果実で 検出されたが、その他代謝物の比率は全て10% TRR未満 (0.01 ppm未満) であった。検出された代謝分解物の様相は、各作物間で類似しており、 の生成が主要であり、次いで

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

の生成が確認された。また、を有するの植物成分との結合が推定された。

3. 土壌における代謝分解

標識エフェクトを用いて、好氣的土壌代謝試験を実施した。

エフェクトは両土壌(火山灰土、洪積土)において速やかに分解し、その半減期は1ppm濃度処理では1~2日、10ppm濃度処理では2~4日であった。

分解物は、が検出されたが、処理放射能に対して10%を越える代謝分解物は、であった。一次代謝物であるの減衰に伴い、が増加したが、炭酸ガスの増加に伴い、経時的に減少した。炭酸ガスは処理後28日で1.5~16%に達し、土壌の抽出残渣は最大で約30%(処理後28日)に達した。

4. 水中における代謝分解

4-1. 加水分解

標識エフェクトを用いて、pH7及び9の滅菌緩衝液中50 mg/L、25℃条件下の加水分解性について検討した。分解速度はpH依存性であり、アルカリ条件下で速やかに分解した(pH7 半減期:181日、pH9 半減期:2.3日)。主要分解物はJ-455酸(記号B)のみであった。

4-2. 水中光分解

標識エフェクトを用いて、滅菌蒸留水及び滅菌自然水中50 mg/L、25℃条件下にフロンランプ光分解性について検討した(下表)。両試験水中でエフェクトは速やかに光分解し、多くの分解物を生成した。いずれの場合も最終的に極性化合物及び二酸化炭素へ変換されることが確認された。

供試水	半減期(日)		主要分解物(光照射区)
	光照射区	暗所区	
滅菌蒸留水	0.30	>3	
滅菌自然水	1.15	16.1	なし

()内の数値は処理放射能に対する最大生成比率と処理後の経過時間

5. 土壌吸着性

エフェクトは土壌中での分解が速やかであり、土壌吸着試験の実施は不可能であった。

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

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

エチクロゼートの開発年表