

(11) 変異原性

細菌を用いた復帰変異原性試験

(毒性資料 17)

[GLP 対応]

報告書作成年：1996年

試験方法：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)の4株およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株の1株を用い、Aroclor 1254で酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の非存在下および存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。

試験は2回実施し、1回目は4~5000 μ g/プレートの6用量で行った(試験1)。2回目は、1回目の結果(サルモネラ菌株に対し20 μ g以上の用量で毒性を示し、大腸菌株には毒性を示さなかった)から両菌株の感受性の差を考慮し、サルモネラ菌株で0.032~100 μ g/プレート、大腸菌株で4~5000 μ g/プレートの用量で行った(試験2)。

検体はエタノールに溶解した。試験は3連制とした。

陽性対照物質として、S-9 Mix存在下で2-アミノアントラセン、S-9 Mix非存在下でMNNG(N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレンを使用した。

試験結果：(表1, 2)

1. 細胞毒性(指標：自然発生コロニーの低下および細菌叢の明確な希薄化)

試験1：検体の濃度4~5000 μ g/プレートの6用量で行った結果、サルモネラ菌株に対し20 μ g以上の用量で毒性が認められたが、大腸菌株には毒性は認められなかった。

試験2：サルモネラ菌株で0.032~100 μ g/プレート、大腸菌株で4~5000 μ g/プレートの用量で行った結果、サルモネラ菌株に対する毒性は、試験1同様の20 μ g以上の用量で認められた。

2. 変異原性(指標：復帰変異コロニー数の増加)

2回の試験結果より、本検体のすべての用量群では、代謝活性化および非代謝活性化の条件下において、いずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数に有意な増加は認められず、また用量相関性も認められなかった。

陽性対照物質では、すべての使用薬剤(MNNG、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン)において、復帰変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本検体には変異原性は有しないと判断された。

表 1. 変異原性試験 (第 1 回目)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬 剤	用 量 μg/プレ ト	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対交換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA 100	TA1537	TA 98
溶媒対照 (エタノー ル)	0	-	23	11	119	10	26
検体	4	-	24	12	194	12	24
	20		20	1	89	4	5
	100		26	0	0	0	0
	500		23	0	0	0	0
	2500		16	0	0	0	0
	5000		24	0	0	0	0
溶媒対照 (エタノー ル)	0	+	30	11	188	9	23
検体	4	+	30	11	156	15	20
	20		26	3	83	4	5
	100		27	0	5	0	0
	500		27	0	0	0	0
	2500		27	0	0	0	0
	5000		25	0	0	0	0
陽性対照 (2-アミノア ントラセン)	μg/プレート		10	1	0.5	1	0.5
	+		386	108	984	103	673
陽性対照	μg/プレート		2.5	1	1	50	2.5
	-		a) 308	b) 384	c) 703	d) 183	e) 396

a) MNNG, b, c) アジ化ナトリウム, d) 9-アミノアクリジン, e) 2-ニトロフルオレン

表 2a. 変異原性試験 (第2回目)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	用 量 μg/プレート	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対交換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA 100	TA1537	TA 98
溶媒対照 (エタノール)	0	—	24	11	169	11	29
検体	0.032	—	21	12	149	10	24
	0.16			10	178	13	24
	0.8			11	176	12	24
	4			10	131	11	21
	20			0	18	2	2
	100			0	0	0	0
	500			24			
	2500 5000			26 22			
溶媒対照 (エタノール)	0	+	28	12	203	10	25
検体	0.032	+	28	10	141	11	32
	0.16			15	127	11	28
	0.8			13	137	12	31
	4			8	103	10	26
	20			1	42	3	2
	100			0	0	0	0
	500			31			
	2500 5000			24 24			
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	μg/プレート		10	1	0.5	1	0.5
	+		374	150	1327	188	1406
陽性対照	μg/プレート		2.5	1	1	50	2.5
	—		a) 303	b) 362	c) 726	d) 158	e) 417

a) MNNG, b, c) アジ化ナトリウム, d) 9-アミノアクリジン, e) 2-ニトロフルオレン

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料 18)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1997 年

試験試料 : 健康人の血液のリンパ球

試験方法 :

・検体の調製

検体はエタノールに溶解した。陽性対照の Mitomycin C (MMC) および Cyclophosphamide (CYCL) は無菌脱イオン水に溶解した。

・リンパ球の培養

健康人の血液を無菌的に採取し、プールし、16.7%ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 組織培養基で希釈した。得られた細胞懸濁液のアリコート (血液 0.4mL、培地 4.5mL、フィトヘマグルチン 0.1mL) を滅菌した容器にとり、37°C、約 48 時間培養した。

・S-9 画分の調製

Aroclor1254 を 500mg/kg の用量で腹腔内注射した SD 系ラットの肝臓を用い、S-9 画分を調製した。

・用量設定の根拠

・染色体異常試験 (試験は 3 回実施)

1 回目試験

48 時間培養後、検体を S-9 Mix 非存在下および存在下共に 18.8、37.5、75、150、300、600、1200 および 2400 μ g/mL の濃度になるように培養液に添加した。陰性対照群はエタノール (50 μ L) のみ加えた。陽性対照群は、S-9 Mix 非存在下では MMC を 0.2、0.4、0.8 μ g/mL、S-9 Mix 存在下では CYCL を 20、25、30 μ g/mL の濃度になるように添加した。

いずれの条件についても 21 時間培養をおこなった。S-9 Mix を含む培養は処理 3 時間後に遠心分離により培地を分離し、新鮮な培地を加えた後培養を継続した。培養終了 2 時間前に、コルセミドを添加 (0.1 μ g/mL) した。

2 回目試験

48 時間培養後、検体を S-9 Mix 存在下および非存在下共に 600、1200 および 2400 μ g/mL の濃度の培養液を用い、培養 21 および 45 時間後 (2400 μ g/mL のみ) に細胞を回収した。陰性および陽性対照群は 1 回目の試験同様に行った。

S-9 Mix を含む培養は処理 3 時間後に遠心分離により培地を分離し、新鮮な培地を加えた後培養を継続した。培養終了 2 時間前に、コルセミドを添加 (0.1 μ g/mL) した。

3 回目試験

1 回目および 2 回目の試験で認められた結果を確認するため、S-9 Mix 非存在下 2400 μ g/mL 培養 21 時間後のみで同様の操作で行った。

・顕微鏡観察（染色体異常の評価）

標本は、検体群は各濃度 2 枚、陰性対照群では 4 枚作製し、各標本につき細胞 1000 個あたりの分裂細胞数を光学顕微鏡で観察した。

染色体の観察は、各標本 100 個の分裂中期像につき行い、1 および 2 回目試験の 21 時間後の回収では、600、1200 および 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、45 時間後の回収では 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 3 回目試験の 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ観察した。

染色体の分類はギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常とした。

試験結果：

1. 1 回目試験

(1) 細胞分裂の頻度（表 1）

S-9 Mix の有無に関わらず、検体による細胞分裂頻度への影響は認められなかった。

最高濃度の 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞分裂の頻度は、S-9 Mix 非存在下で 121%、存在下で 85%であった。このことから、中期分裂像の観察は、検体投与群 600、1200 および 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、陽性対照の MMC では 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CYCL で 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ行った。

表 1. 細胞分裂頻度

試験群	濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	S-9 Mix の 有無	細胞分裂(1000 個あたり)	
			出現率 (%)	割合 (%)
陰性対照群	0	-	7.0	100
検体投与群	18.8		7.1	101
	37.5		8.3	119
	75.0		9.2	131
	150		9.3	133
	300		9.4	134
	600		9.9	141
	1200		8.9	127
2400	8.5		121	
陰性対照群	0	+	6.7	100
検体投与群	18.8		7.4	110
	37.5		6.7	100
	75.0		6.6	99
	150		7.3	109
	300		6.6	99
	600		5.7	85
	1200		7.3	109
2400	5.7		85	

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) 中期分裂像の観察 (表 2a, 2b)

S-9 Mix の有無に関わらず、検体による染色体異常細胞への有意な影響は認められなかった。

陽性対照群の MMC および CYCL の染色体異常細胞の出現頻度は、統計学的に有意な増加 ($p < 0.001$) を示した。

表 2a. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 非存在下)

試験群	濃度 µg/mL	観察 細胞数	異常							異常細胞数				出現頻度 (%)
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャップを 含まない	平均 (%)	ギャップ を含む	平均 (%)	
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性 対照	10	400	2	0	1	0	0	0	0	3	0.75	3	0.75	100
検体	600	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	141
	1200	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	127
	2400	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0.5	121
陽性 対照	0.4	200	15	7	13	0	0	0	0	13	13***	13	13***	--

*** : $p < 0.001$ (Fisher 直接確率検定)、陰性対照 : エタノール、陽性対照 : MMC

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb: 染色体切断 cse: 染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

表 2b. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 存在下)

試験群	濃度 µg/mL	観察 細胞数	異常							異常細胞数				出現頻度 (%)
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャップを 含まない	平均 (%)	ギャップ を含む	平均 (%)	
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性 対照	10	400	5	0	1	0	0	0	0	6	1.5	6	1.5	100
検体 投与	600	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1.0	2	1.0	85
	1200	200	2	0	0	0	0	1	0	2	1.0	3	1.5	109
	2400	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.5	85
陽性 対照	0.4	200	27	3	1	0	0	0	0	22	11***	22	11***	--

*** : $p < 0.001$ (Fisher 直接確率検定)、陰性対照群 : エタノール、陽性対照群 : CYCL

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb: 染色体切断 cse: 染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

2. 2回目試験 (表 3, 4 : 21 時間後、表 5, 6 : 45 時間後)

(1) 細胞分裂の頻度 (表 3)

S-9 Mix の有無に関わらず、検体による細胞分裂頻度への影響は認められなかった。

最高濃度の 2400µg/mL での細胞分裂の頻度は、S-9 Mix 非存在下で 79%、存在下で 82%と低下が認められた。

このことから、中期分裂像の観察は、検体投与群 600、1200 および 2400µg/mL の濃度で、陽性対照の MMC では 0.8µg/mL、CYCL で 25µg/mL でそれぞれ行った。

表 3. 細胞分裂頻度 (21 時間後)

試験群	濃度 µg/mL	S-9 Mix の 有無	細胞分裂(1000 個あたり)	
			出現率 (%)	割合 (%)
陰性対照	0	+	13.1	100
検体投与	600		15.0	115
	1200		9.7	74
	2400		10.4	79
陰性対照	0		11.5	100
検体投与	600		10.9	95
	1200		10.2	89
	2400		9.4	82

(2) 中期分裂像の観察 (表 4a、4b)

S-9 Mix の非存在下の 2400µg/mL において、染色体異常細胞数の僅かな増加 ($p < 0.001$) が認められた。この増加率は、ギャップを除いて 5.5%と背景値 (0-5.25%) の上限を僅かに上回っていた。

S-9 Mix の存在下では、いずれの用量でも対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群の MMC および CYCL の染色体異常細胞の出現頻度は、統計学的に有意な増加 ($p < 0.001$) を示した。

表 4a. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 非存在下 : 21 時間後)

試験群	濃度 µg/mL	観察 細胞数	異常							異常細胞数			出現頻度 (%)	
			染色体型		染色体		他	ギャップ		平均 (%)	ギャップ を含む	平均 (%)		
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性 対照	10	400	1	4	0	0	0	0	0	2	0.5	2	0.5	100
検体 投与	600	200	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1.0	115
	1200	200	1	0	0	0	0	1	0	1	0.5	1	1.0	74
	2400	200	10	1	1	0	0	1	0	11	5.5***	12	6.0***	79
陽性 対照	0.8	200	25	4	1	0	0	0	0	22	11***	22	11***	--

*** : $p < 0.001$ (Fisher 直接確率検定)、陰性対照 : エタノール、陽性対照 : MMC

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb: 染色体切断 cse: 染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

表 4b. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 存在下: 21 時間後)

試験群	濃度 µg/mL	観察 細胞数	異 常						異常細胞数			出現頻度 (%)		
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャップ を含まない	平均 (%)		ギャップ を含む	平均 (%)
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性 対照	10	400	5	0	0	0	0	0	0	3	0.75	3	0.75	100
検体 投与	600	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95
	1200	200	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1.0	89
	2400	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0.5	82
陽性 対照	0.4	200	18	0	4	0	0	2	0	19	9.5***	21	10.5***	--

*** : p<0.001 (Fisher 直接確率検定)、 陰性対照群: エタノール、 陽性対照群: CYCL

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb: 染色体切断 cse: 染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

(3) 細胞分裂の頻度 (表 5)

最高濃度の 2400µg/mL での細胞分裂の頻度は、S-9 Mix 非存在下で 55% と低下を示したが、S-9 Mix 存在下では影響は認められなかった。

このことから、中期分裂像の観察は、検体投与群 2400µg/mL の濃度で行った。

表 5. 細胞分裂頻度 (45 時間後)

試験群	濃度 µg/mL	S-9 Mix の 有無	細胞分裂(1000 個あたり)	
			出現率 (%)	割合 (%)
陰性対照群	10	-	17.4	100
検体投与群	600		16.2	93
	1200		14.5	83
	2400		9.6	55
陰性対照群	10	+	9.5	100
検体投与群	600		9.9	104
	1200		10.1	106
	2400		11.3	119

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) 中期分裂像の観察 (表 6a、6b)

S-9 Mix の非存在下の 2400µg/ml.において、染色体異常細胞数の僅かな増加 (p<0.001) が認められた。
この増加率は、ギャップを除いて 6.5%と背景値 (0-5.25%) の上限を僅かに上回っていた。
S-9 Mix の存在下では、対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

表 6a. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 非存在下 : 45 時間後)

試験群	濃度 µg/ml	観察 細胞数	異常							異常細胞数				出現頻度 (%)
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャップを含まない	平均 (%)	ギャップを含む	平均 (%)	
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性対照	10	400	3	0	0	0	0	0	0	3	0.75	3	0.75	100
検体投与	2400	200	10	1	2	0	0	2	2	13	6.5***	17	8.5***	55

*** : p<0.001 (Fisher 直接確率検定)、陰性対照群 : エタノール

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb:染色体切断 cse:染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

表 6b. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 存在下 : 45 時間後)

試験群	濃度 µg/ml	観察 細胞数	異常							異常細胞数				出現頻度 (%)
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャップを含まない	平均 (%)	ギャップを含む	平均 (%)	
			ctb	cte	csb	cse		ctg	csg					
陰性対照	10	400	8	0	2	0	0	1	0	10	2.5	11	2.75	100
検体投与	2400	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	119

*** : p<0.001 (Fisher 直接確率検定)、陰性対照群 : エタノール

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb:染色体切断 cse:染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

3. 3回目試験

(1)細胞分裂の頻度 (表 7)

S-9 Mix の非存在下の 2400µg/mL における、細胞分裂の頻度は対照群の 74%であった。

表 7. 細胞分裂頻度 (S-9 Mix 非存在下 : 21 時間後)

試験群	濃度 µg/mL	S-9 Mix の 有無	細胞分裂(1000 個あたり)	
			出現率 (%)	割合 (%)
陰性対照群	10	—	6.2	100
検体投与群	2400		4.6	74

(2) 中期分裂像の観察 (表 8)

S-9 Mix の非存在下の 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、染色体異常細胞数の僅かな増加 ($p<0.001$) が認められた。この増加率は、7.0%を示し、ギャップを除いた背景値 (0-5.25%) およびギャップを含む背景値 (0-6.5%) の上限を僅かに上回っていた。

表 8. 染色体異常細胞数 (S-9 Mix 非存在下 : 21 時間後)

試験群	濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	観察 細胞数	異 常							異常細胞数				出現頻度 (%)
			染色体型		染色体		他	ギャップ		ギャッ プを含 まない	平均 (%)	ギャッ プを 含む	平均 (%)	
			ctb	cte	csb	csc		ctg	csg					
陰性 対照	10	400	1	0	1	0	0	0	0	2	0.5	2	0.5	100
検体 投与	2400	200	13	0	3	0	0	2	2	14	7.0***	14	7.0***	74

*** : $P<0.001$ (Fisher 直接確率検定)、 陰性対照群 : エタノール

ctb: 染色体型切断 cte: 染色体型交換 csb: 染色体切断 csc: 染色体交換 ctg: 染色体型ギャップ csg: 染色体ギャップ

これらのことから、本検体は、S-9 Mix 非存在下では、最高用量 (2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のみで染色体異常細胞の発現頻度が僅かに増加し、極めて弱い染色体異常誘発作用が示唆された。S-9 Mix 存在下では染色体異常誘発性は認められなかった。

マウスを用いた小核試験

(毒性資料 19)

[GLP 対応]

報告書作成年：1997 年

供試動物：NMRI 系マウス雌雄(SHOE:NMRI)、1 群雌雄各 5 匹
投与開始時約 7 週齢、平均体重 雄 37.6g、雌 30.3g

試験方法：検体を 1%メチルセルロースで懸濁し、0 (陰性対照)、200、1000、2000mg/kg を単回経口投与した。陰性対照は 1%メチルセルロースのみを、陽性対照はシクロホスファミド 50mg/kg をそれぞれ経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。
投与 12、24 および 48 時間後に動物を CO₂ を吸入させ屠殺した。
骨髓試料は、大腿骨の骨髓を洗い出し、その懸濁液を遠心分離後、沈殿の 1 滴をスライドグラス上に塗抹した。約 12 時間固定後、ギムザ染色し、検査用標本として作製した。

赤血球中の小核出現の有無について調べるために、各骨髓標本について 1000 個の赤血球を観察し、赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。多染性赤血球 1000 個当りの小核を有する多染性赤血球数、および正染性赤血球 1000 個当りの小核を有する多染性赤血球数を計数した。

用量設定根拠：

結果：

1) 一般状態の観察

全動物の一般状態には投与による影響は認められなかった。

2) 突然変異誘発性 (表 1)

全用量群の小核を有する多染性赤血球数は、対照群に比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。正染性赤血球数に対する多染性赤血球数の割合では、12 時間時の 2000mg/kg 用量群で統計学的に有意な増加(p<0.05)が認められた。これは、対照群が比較的低値を示し、また 2000mg/kg 用量群値は対照群値と同程度であり、用量相関性も認められなかったことから毒性的な意味はないものとみなした。

陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球数について、統計学的に顕著で有意な増加(p<0.05)が認められた。

これらのことから、このマウス骨髓小核試験において、本検体には変異原性 (染色体異常誘発性) はないと判断された。

表1. 小核試験

採取時間 (hr)	投与量 (mg/kg)	性	観 察 動物数	MNPCE % (平均値±SD)	P/N (平均値±SD)
12	陰性対照 (1%メチルセルロース) 0	雄	5	0.1 (1.40±0.15)	0.8±0.15
		雌	5	0.2 (1.60±0.09)	0.7±0.18
		雌雄	10	0.2 (1.50±0.12)	0.7±0.16
	検 体 200	雄	5	0.2 (1.60±0.09)	1.0±0.09
		雌	5	0.2 (1.60±0.15)	0.9±0.15
		雌雄	10	0.2 (1.60±0.12)	0.9±0.13
	1000	雄	5	0.1 (0.60±0.05)	0.7±0.07
		雌	5	0.1 (1.20±0.04)	0.7±0.09
		雌雄	10	0.1 (0.90±0.06)	0.7±0.08
	2000	雄	5	0.2 (1.60±0.11)	0.9±0.08
		雌	5	0.2 (1.60±0.09)	0.9±0.08
		雌雄	10	0.2 (1.60±0.10)	0.9±0.07*
24	陰性対照 (1%メチルセルロース) 0	雄	5	0.1 (1.40±0.11)	0.6±0.19
		雌	5	0.2 (2.00±0.07)	0.9±0.06
		雌雄	10	0.2 (1.70±0.09)	0.7±0.20
	検 体 200	雄	5	0.1 (1.20±0.13)	1.0±0.08
		雌	5	0.1 (1.00±0.07)	1.0±0.20
		雌雄	10	0.1 (1.10±0.10)	1.0±0.15
	1000	雄	5	0.1 (0.80±0.08)	1.0±0.21
		雌	5	0.1 (0.60±0.09)	0.9±0.23
		雌雄	10	0.1 (0.70±0.08)	0.9±0.21
	2000	雄	5	0.0 (0.40±0.09)	0.8±0.25
		雌	5	0.1 (1.00±0.00)	0.8±0.09
		雌雄	10	0.1 (0.70±0.07)	0.8±0.18
	陽性対照 (シクロホスファミド) 50	雄	5	3.7 (37.2±0.61)	0.9±0.09
		雌	5	3.1 (30.8±1.09)	0.8±0.05
		雌雄	10	3.4 (34.0±0.90)*	0.9±0.09
48	陰性対照 (1%メチルセルロース) 0	雄	5	0.1 (1.40±0.11)	0.8±0.16
		雌	5	0.1 (1.00±0.17)	1.0±0.06
		雌雄	10	0.1 (1.20±0.14)	0.9±0.16
	検 体 200	雄	5	0.1 (1.00±0.10)	0.8±0.10
		雌	5	0.1 (0.60±0.05)	0.7±0.22
		雌雄	10	0.1 (0.80±0.08)	0.8±0.17
	1000	雄	5	0.2 (1.60±0.15)	0.±0.03
		雌	5	0.0 (0.40±0.09)	0.9±0.23
		雌雄	10	0.1 (1.00±0.13)	0.9±0.15
	2000	雄	5	0.1 (0.60±0.09)	0.9±0.13
		雌	5	0.1 (1.40±0.11)	0.8±0.08
		雌雄	10	0.1 (1.00±0.11)	0.9±0.11

Wilcoxon 検定、 * : p<0.05、 検定は雌雄両性で行った。

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうちの、小核を有する多染性赤血球数

P/N : 多染性赤血球数 / (染性赤血球(1000 個))

P : 多染性赤血球数、 N : 正染性赤血球数、

(12) 生体機能に及ぼす影響

一般薬理試験

(毒性資料 20)

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

試験方法

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na)・注射用水の混液中に懸濁して、0、200、600、2000mg/kg の用量で単回経口投与した。

投与容量は、体重 100g 当たり 1mL とした。

投与用量設定理由

試験項目および結果

1) 一般状態の観察 (ラット)

供試動物：ラット SD 系(Crj: CD) 雄、7 週齢、体重 181.0~197.9g、1 群 5 匹

方法： 検体投与後、Irwin 法 (多次元観察法) に従って、一般状態の観察や行動変化について調べた。

結果： 対照群を含む全ての投与群において、一般状態や行動に異常所見は認められなかった。また、身づくろい、排尿、排糞等の発現回数に対照群と検体投与群の間に差は認められなかった。

2) 中枢神経系への影響

① 自発運動量に及ぼす影響 (マウス)

供試動物：マウス ICR 系(Crj: CD-1) 雄、6 週齢、体重 22.1~27.1g、1 群 6 匹

方法： 検体投与前 30 分間および投与直後から 360 分後まで継続して自発運動量測定装置を用い測定した。自発運動量の集計は、30 分毎に行った。

結果： 自発運動量の測定より、いずれの集計時間においても、対照群と検体投与群の間に統計学的な有意差は認められなかった。

② 痙攣誘発作用 (マウス)

供試動物：マウス ICR 系(Crj: CD-1) 雄、6 週齢、体重 23.1~25.7g、1 群 6 匹

方法： 検体投与 60 分後に両耳介より小型動物用電撃刺激装置を用い、電撃刺激後に発現する後肢の痙攣(間代性痙攣、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣)および死亡の有無を観察した。

結果： 対照群、投与群とも 6 例中 5~6 例に間代性痙攣、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣および死亡

がみとめられたが対照群と検体投与群の間に差は認められなかった。

用量(mg/kg)	0	200	600	2000
検査動物数	6	6	6	6
間代性痙攣	6	6	6	6
強直性屈曲痙攣	6	6	6	5
強直性伸展痙攣	5	6	6	5
死亡数	1	3	2	3

③ 正常体温に及ぼす影響 (ラット)

供試動物：ラット SD 系(Crj: CD) 雄、7 週齢、体重 185.5~204.9g、1 群 5 匹

方法： 検体投与前、投与後 30、60、120、180 および 360 分にデジタル温度計を用いて直腸温を測定した。

結果： 体温測定より、いずれの測定時においても対照群と検体投与群の間に差は認められなかった。

3) 循環器系への影響

① 血圧および心拍数の測定 (無麻酔ラット)

供試動物：ラット SD 系(Crj: CD) 雄、7 週齢、体重 156.0~213.6g、1 群 5 匹、無麻酔

方法： 検体投与前、投与後 60、120、180 および 360 分に非観血式自動血圧測定装置を用いて収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧および心拍数を測定した。測定はそれぞれ 3 回繰り返した。

結果： 血圧測定より、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧については、対照群と検体投与群との間で統計学的に有意な変化は認められなかった。心拍数では、対照群に比し 600mg/kg 群で投与 1 時間後の測定値が統計学的に有意な低値を示したが、用量との関連性は認められなく、偶発的なものと考えられた。なお、投与前値からの変化値については、対照群と検体投与群との間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

4) 腎機能に対する作用

① 尿量、尿中電解質および尿浸透圧の測定 (ラット)

供試動物：ラット SD 系(Crj: CD) 雄、7 週齢、体重 179.8~213.3g、1 群 5 匹

方法： 生理食塩水を 2.5mL/100gBW を経口投与後、検体を投与した。検体投与直後に個別に採尿ケージに收容し、無給餌・無給水条件下で投与後 6 時間までの尿を採取した。

尿量、尿浸透圧、ナトリウム濃度、カリウム濃度、塩素濃度、ナトリウム総排泄量、カリウム総排泄量、塩素総排泄量を測定、算出した。

結果： 尿検査より、いずれの測定項目についても、対照群と検体投与群の間に差は認められなかった。

5) 自律神経系

① 瞳孔径の測定 (ラット)

供試動物：ラット SD 系(Crj: CD) 雄、7 週齢、体重 198.9~238.1g、1 群 5 匹

方法： 検体投与前、投与後 30、60、120、180 および 360 分にデジタルノギスを用いて瞳孔径 (片側) を測定した。

結果： 瞳孔径の測定より、対照群と検体投与群の間に差は認められなかった。

以上の結果より、本検体は、最高投与用量である 2000mg/kg まで、投与後の 一般状態/症状、中枢神経系 (自発運動量、痙攣誘発、体温)、循環器系 (血圧、心拍数)、腎機能 (尿量、尿中電解質および尿浸透圧) および自立神経系 (瞳孔径) に対する影響は、認めなかった。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般状態 [Irwin 法] (ラット)	経口 (CMC-Na+注射用 水)	0 200 600 2000	♂ 5	—	2000	検体投与による影響 は認められなかった。
中枢神経系 自発運動量 (マウス)			♂ 6	—	2000	
中枢神経系 痙攣誘発作用 (マウス)			♂ 6	—	2000	
中枢神経系 正常体温 (ラット)			♂ 5	—	2000	
循環器系 血圧・心拍数 [Tail-cuff 法] (無麻酔ラット)			♂ 5	—	2000	
腎機能 尿量・電解質・ 浸透圧 (ラット)			♂ 5	—	2000	
自律神経系 瞳孔径 (ラット)			♂ 5	—	2000	

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

(13) その他

ラットを用いた 28 日間反復経口投与神経毒性試験

(毒性資料 21)

[GLP 対応]

報告書作成年：2009 年

供試動物：Wistar Han Crl:WI (HAN)系ラット、1 群雌雄各 12 匹

投与開始時 約 8 週齢、体重：雄 185.6~295.9g、雌 146.6~193.7g

投与期間：28 日間

投与方法：検体を 0、3750 および 15000ppm の濃度で試料に混和し最低 28 日間混餌投与した。

用量設定根拠：

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）一般状態及び生死を観察した。また、詳細な身体検査は毎週実施し記録した。

投与に関連する死亡は認められなかった。

投与に関連する一般症状の変化は認められなかった。高用量雄 1 匹で痲皮、対照群雌 2 匹ならびに低用量群雌 2 匹で脱毛、および低用量群雌 1 匹で飼料の掻き出し行動 (spiller) が見られたが、いずれも発生頻度は低く通常のラットで認められる変化であり投与の影響とは考えられなかった。

認められた主な一般症状

性	雄			雌		
用量 (ppm)	0	3750	15000	0	3750	15000
検査動物数	12	12	12	12	12	12
痲皮 (肩部、右側)	0	0	1	0	0	0
脱毛 (肩部、右部)	0	0	0	1	0	0
脱毛 (前肢、両側)	0	0	0	1	2	0
行動、spiller	0	0	0	0	1	0

体重；全動物の体重を毎週測定した。還流動物については最終屠殺日にも体重を測定し最終体重とした。

試験期間を通じて投与群の体重は対照群と同等であり投与の影響は認められなかった。

摂餌量；摂餌量は毎週測定した。

試験期間を通じて投与群の摂餌量は対照群と同等であり投与の影響は認められなかった。

検体摂取量：全投与期間にわたる平均検体摂取量は以下のとおりであった。

用量 (ppm)		3750	15000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	307.0	1208
	雌	362.4	1415

FOB； 全生存動物について、投与前週および投与4週日目の2回実施した。FOB 検査室にて、以下の項目を検査した。

ホームケージでの観察

姿勢、立毛、不随意運動、歩行異常、発声、運動量低下、反復的頭部上下動(repetitive head bobbing)、反応亢進

ハンドリング間の観察

取りだし時の難易、ハンドリングに対する反応、筋緊張、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、鼻汁、着色(涙、鼻、肛門周囲、尿、口)、脱毛、痩せ、噛み跡、眼球突出、歯の破折/不正咬合、爪欠損、脱水、体温(触診による)

オープンフィールド観察

立毛、呼吸異常、姿勢、不随意運動、常同行動、異常行動、歩行異常、発声、覚醒レベル、排泄量

反射/生理的観察/測定

接近反応、接触反応、聴覚反応、テイルピンチ、通常照明下での瞳孔サイズ、瞳孔反射、正向反射、握力、体重、体温、着地開脚幅

投与に関連する FOB 検査項目の変化は認められなかった。試験4週時の検査で高用量雄1匹で痂皮、低用量群雌2匹で脱毛が見られたが、いずれも発生頻度は低く通常のラットで認められる変化であり投与の影響とは考えられなかった。

雄				
用量 (ppm)		対照	3750	15000
	検査動物数	12	12	12
4週目	ハンドリング-痂皮(軽度)	0	0	1
雌				
用量 (ppm)		対照	3750	15000
	検査動物数	12	12	12
投与前週	ハンドリング 尿着色(軽度)	0	1	0
4週目	ハンドリング-脱毛(軽度)	0	2	0

自発運動量； FOB 検査と同日に FOB 検査終了後、全動物について自発運動量 (motor activity：ビームを横切った回数として記録) および移動運動量 (locomotor activity：ビームを横切った回数から連続して同一のビームを横切った回数を減じた回数として記録) を測定した。測定は8の字迷路を用いて10分/インターバル、6インターバル/セッションで実施した。自発運動量および移動運動量に関し対照群に対し±20%を超える変動が認められた場合に投与の影響を疑った。

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

自発運動量および移動運動量に生物学的に優位な変化は認められなかった。

表. 自発運動量および移動運動量

性	雄		雌	
用量(ppm)	3850	15000	3750	15000
自発運動量				
投与前週	99	103	90	94
4週	94	93	97	98
移動運動量				
投与前週	97	106	98	92
4週	92	92	97	87

表中の数値は対照群の値に対する比(%)
統計学的有意差なし (p>0.05、ANOVA)

眼科学的検査；投与前および投与4週目に全生存動物について眼科学的検査を実施した。

投与に関連する変化は認められなかった。

剖検、組織採取および脳重量： 投与終了後全生存動物について剖検し、全臓器、体腔、切断面、開口部および外表の検査を実施した。各群雌雄各6匹ずつを、パントバルビタールの腹腔内投与(50mg/kg)による深麻酔下、左心室から(リン酸緩衝液中)亜硝酸ナトリウムを流した後、リン酸緩衝液中Universal固定液(1%グルタルアルデヒドおよび4%EM級ホルムアルデヒド)で灌流した。各動物から脳および脊髄全体、両眼(視神経含む)、末梢神経(坐骨、脛骨、腓腹)、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、神経組織または骨格筋の肉眼的病変部を採取し、10%緩衝ホルマリンに後固定した。脳はホルマリン固定前に重量を測定した。灌流に用いなかった生存動物はCO₂窒息による屠殺した。

灌流および非灌流の何れにおいても脳重量に投与の影響は認められなかった。

神経病理学的検査；初回試験の高用量群雌雄の灌流動物の以下の組織について兼備強酸病理検査を実施した。

- ・ 脳(8冠状断面)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、馬尾、眼、視神経、腓腹筋；パラフィンに包埋しヘマトキシリン&エオシン染色
- ・ 背根神経節(頸膨大および腰膨大、背後根繊維および腹根繊維を含む)、ガッセル神経節、末梢神経組織(坐骨、脛骨、腓腹神経)；メタクリル酸グリコール(GMA)に包埋し、2~3μmに細切後Lee染色変法により染色

投与に関連する所見は認められなかった。

本試験の結果、投与による毒性影響は認められなかった。

以上より、本試験において神経毒性は認められず、神経毒性に関する無毒性量は雌雄とも15000ppm(雄1208mg/kg/day、雌1415mg/kg/day)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。

2. 製剤を用いた試験成績

トリビュート OD のラットに対する急性経口毒性試験

(毒性資料 製剤 1)

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

被験物質：	組成	有効成分	ホラムスルフロシ	2.2%(表示値*)
		その他	植物油、界面活性剤等	97.7 %

供試動物： SD系ラット(Crl:CD)、1群 雌3匹
投与時の週齢および体重：8 週齢、 雌 197~203g

観察期間： 14 日間

試験方法： 試験法は、毒性等級法の手順に従って行った。
開始投与量は、2000mg/kg とし、第2段階の投与量も2000mg/kg を選択した。

投与方法： 所定量の被験物質を秤量後、蒸留水を加え所定濃度の懸濁液を調製した。
投与は、投与前一夜（約 16 時間）絶食させた動物に胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。
投与容量は、体重 100g あたり 1mL とした。

観察・検査：

一般状態の観察および体重の測定

一般状態の観察は、投与日は頻繁に、翌日からは 1 日 1 回、14 日間にわたって注意深く行った。
体重の測定は、投与前（直前）、投与後 1、3、7 および 14 日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、体外表、胸部および腹部等の器官・組織を肉眼的に観察した。

結 果：

投与方法	経 口
投与量(mg/kg)	第1投与段階 雌：2000 第2投与段階 雌：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌： >2000
死亡開始時間および終了時間	雌： —
症状発現時間および消失時間	雌： 発現：投与後1時間 消失：投与後6時間
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌： <2000
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌： 2000

1) 一般状態の観察および体重の測定

一般状態では、各投与段階いずれの動物にも、投与1時間後から自発運動の減少が認められたが、投与6時間後には消失した。

体重では、各投与段階いずれの動物もほぼ順調な体重増加を示し、検体投与による影響は認められなかった。

2) 剖検

各投与段階いずれの動物にも、検体投与による影響は認められなかった。

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

トリビュート OD のラットにおける急性経皮毒性試験

(毒性資料 製剤 2)

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

被験物質：	組成	有効成分	ホラムスルフロシ	2.2%(表示値*)
		その他	植物油、界面活性剤等	97.7 %

供試動物：SD系ラット(Crl:CD)、1群 雌雄各5匹
投与時の週齢および体重；8週齢、雄246～255g・雌214～227g

観察期間：14日間

投与方法：投与は、所定量の被験物質をリント布(約20cm²)にのせ、投与前日に刈毛(約30cm²)した動物の背部皮膚に貼付した。更に粘着性伸縮テープを用い固定した。塗布時間は24時間とし、終了後リント布および粘着性伸縮テープを除去し、温水およびガーゼを用いて塗布部位を清拭した。

観察・検査：

一般状態の観察および体重の測定

一般状態の観察は、投与日は頻繁に、翌日からは1日1回、14日間にわたって注意深く行った。

また、塗布部位の状態も観察した。

体重の測定は、投与前(直前)、投与後3、7および14日に行った。なお、投与前の体重を塗布量算出の基準にした。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、体外表、胸部および腹部等の器官・組織を肉眼的に観察した。

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。

結 果：

投与方法	経 皮
投与量(mg/kg)	雄 : 2000 雌 : 2000
L.D ₅₀ (mg/kg)	雄 : > 2000 雌 : > 2000
死亡開始時間および終了時間	雄 : - 雌 : -
症状発現時間および消失時間	雄 : - 雌 : -
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄 : 2000 雌 : 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄 : 2000 雌 : 2000

1) 一般状態の観察および体重の測定

観察期間中、一般状態に雌雄いずれの動物にも異常は認められなかった。
また、皮膚の塗布部位においても刺激性を示す変化は認められなかった。
雌雄いずれの動物も、観察期間を通じてほぼ恒調な体重推移を示した。

2) 剖検

雌雄いずれの動物にも、塗布部位を含み異常は認められなかった。

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

トリビュート OD のウサギにおける皮膚刺激性試験

(毒性資料 製剤 3)

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

被験物質	： 組成	有効成分	ホラムスルフロシ	2.2% (表示値*)
		その他	植物油、界面活性剤等	97.7 %

供試動物 : 日本白色種 雌ウサギ、1群3匹
投与時の週齢および体重；17～18 週齢、 2.95～3.37 kg

観察期間 : 14 日間

投与方法 : 投与は、被験物質 0.5mL をリント布 (2.5cm×2.5cm) に塗布し、刈毛したウサギの背部皮膚部の一方に貼付し、白着性弾力包帯およびテープで固定した。貼付は 4 時間とし、その間動物を首枷式固定器に保定した。
貼付 4 時間後、リント布を除去し、注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭し、動物をケージに戻した。
対照部位には、リント布 (2.5cm×2.5cm) のみ刈毛したウサギの背部皮膚部の他方に 4 時間貼付した。

観察項目 : 一般状態の観察は、貼付直後、投与 1、4 および 5 時間後に、投与翌日以降は、投与 14 日後まで 1 日 1 回行った。
体重は、投与日、投与 7 日後および投与 14 日後 (観察終了日) に測定した。
皮膚刺激性の観察は、検体除去後 1、24、48 および 72 時間に紅斑および痂皮の形成と浮腫の形成について行い、皮膚反応の評価法 (Draize 法) に従って採点し、記録した。また皮膚のその他の反応についても観察した。なお、検体除去後 72 時間に皮膚反応が認められたことから、その可逆性を確認するため検体除去 14 日後まで観察した。

評価 : 刺激性の評価は皮膚一次刺激性指数 (P.L.I) を算出して行った。刺激性指数は、検体除去後 1、24、48 および 72 時間における紅斑および痂皮の形成と浮腫の形成について個別の値を求め、更に供試した動物 3 匹の値を平均して算出した。また、観察時期ごとに平均評点を算出した。

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

結 果 :

一般状態の観察および体重

全例ともに一般状態に特記すべき変化は観察されなかった。

また検体投与に起因した体重の変動は認められなかった。

皮膚刺激性

検体投与後における皮膚反応の結果を下表に示した。

動物	項目	最高 評点	調査時点														P.I.I	
			1 時 間	24 時 間	48 時 間	72 時 間	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日	11 日	12 日	13 日		14 日
1	紅斑・痂皮	4	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5
	浮腫	4	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	合計	8	0	4	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	紅斑・痂皮	4	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	合計	8	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	紅斑・痂皮	4	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	合計	8	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
合計	紅斑・痂皮	12	0	5	6	6	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	5.4
	浮腫	12	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	合計	24	0	7	7	7	4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
平均	紅斑・痂皮	4	0	1.7	2.0	2.0	1.3	1.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8
	浮腫	4	0	0.7	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	合計	8	0	2.3	2.3	2.3	1.3	1.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	

検体除去後 24 時間に紅斑（評点：1 又は 2）が全例、浮腫（評点：2）が 1 例に認められた。除去後 48 および 72 時間にはほぼ同等の皮膚反応が認められたが、浮腫は除去後 4 日、紅斑は除去後 7 日にそれぞれ消失した。その他の皮膚反応として、刺激反応の二次的変化と考えられる鱗屑が、除去 6 日から 14 日まで認められた。

対照部位における皮膚に変化は認められなかった。

各観察時間の結果から得られた皮膚一次刺激性指数(P.I.I.)は、1.8 であり、刺激性区分は、「軽度刺激物」と評価された。

以上の結果から、検体は、本試験条件下 ウサギの皮膚に対し「軽度刺激性あり」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。

トリビュート OD のウサギにおける眼刺激性試験

(毒性資料 製剤 4)

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

被験物質 : 組成 有効成分 ホラムスルフロン 2.2% (表示値*)
その他 植物油、界面活性剤等 97.7 %

供試動物 : 日本白色種 雌ウサギ、1 群 3 匹
投与時の週齢および体重 ; 15 週齢、 2.60~2.97kg

観察期間 : 3 日間

投与方法 : 非洗眼群では、検体 0.1mL を動物の左眼の下眼瞼を穏やかに眼球から引き離し、その結膜囊内に投与した。検体の漏出を防ぐため、約 1 秒間上下の眼瞼を穏やかに合わせ保持した。右眼は無処置の対照眼とした。
洗眼群では、非洗眼群と同様に検体 0.1mL を動物の左眼の結膜囊内に投与し、投与 30 秒後に 100mL の注射用水で 30 秒間洗眼した。右眼は 30 秒間の洗眼のみを行い、洗眼対照群とした。

観察項目 : 一般状態の観察は、投与直後および投与 1 時間後から 6 時間後まで 1 時間ごとに、投与翌日以降は、投与 3 日後まで 1 日 1 回行った。
体重は、投与日および投与 3 日後 (観察終了日) に測定した。

角膜、虹彩および結膜の観察は、投与 1、24、48 および 72 時間に肉眼および検眼鏡を用いて実施した。

各観察項目は、眼の局所反応の判定基準 (Draize 法) に従って採点し、評価した。投与 24 時間後の観察直後には、2%フルオレセインナトリウム水溶液を点眼し、速やかに注射用水で洗眼した後、角膜の染色斑の有無を観察した。
また眼のその他の変化についても観察した。

評価 : 刺激性の評価は、2 段階評価法 (Kay and Calandra の方法) を参考にその程度を区分した。

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。

結 果：

一般状態の観察および体重

非洗眼群および洗眼群共に、一般状態に異常は認められなかった。また体重の推移に検体に起因する変動も認められなかった。

刺激性

検体投与後における眼の反応の結果を下表に示した。

項 目	最高 評点	適用後時間						
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間			
動物 1	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹 彩	2	0	0	0	0		
	結 膜	発 赤	3	1	0	0	0	
		浮 腫	4	1	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	
	ITS	110	8	0	0	0		
	動物 2	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩	2	0	0	0	0	
結 膜		発 赤	3	1	1	1	0	
		浮 腫	4	1	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	
ITS		110	8	2	2	0		
動物 3	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹 彩	2	0	0	0	0		
	結 膜	発 赤	3	1	1	0	0	
		浮 腫	4	1	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	
	ITS	110	8	2	0	0		
合 計	角膜混濁	程度	12	0	0	0	0	
		面積	12	0	0	0	0	
	虹 彩	6	0	0	0	0		
	結 膜	発 赤	9	3	2	1	0	
		浮 腫	12	3	0	0	0	
		分泌物	9	6	0	0	0	
	MTS	330	24	4	2	0		
平 均	角膜混濁	程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0	
		面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0	
	虹 彩	2	0.0	0.0	0.0	0.0		
	結 膜	発 赤	3	1.0	0.7	0.3	0.0	
		浮 腫	4	1.0	0.0	0.0	0.0	
		分泌物	3	2.0	0.0	0.0	0.0	
	MTS	110	8.0	1.3	0.7	0.0		

ITS : Individual total score = 混濁程度×面積×5+虹彩×5+(結膜発赤+浮腫+分泌物)×2

MTS : Mean total score = ΣITS/動物数

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

洗 眼 群	平均	角膜	程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0
		混濁	面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0
		虹	彩	2	0.0	0.0	0.0	0.0
		結 膜	発赤	3	1.0	0.0	0.0	0.0
			浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
			分泌物	3	0.0	0.0	0.0	0.0
		MTS			110	2.0	0.0	0.0

MTS : Mean total score = Σ ITS/動物数

非洗眼群では、投与1時間後の観察で結膜発赤（評点:1）、浮腫（評点:1）および分泌物（評点:2）が全例で認められ、MTSは8.0であった。投与24時間後では結膜発赤（評点:1）が2例で認められたが、浮腫および分泌物は消失し、MTSは1.3となった。投与24時間後に実施したフルオセインによる角膜検査では、いずれの動物においても染色斑は認められなかった。

投与48時間後に結膜発赤（評点:1）が1例のみに認められたが、72時間後までに全ての刺激反応は消失した。投与48および72時間後のMTSは、各々0.7および0であった。これらの結果から、非洗眼群におけるMMTSは、投与1時間後の8.0であった。

眼のその他の変化としては、閉眼が投与直後に全例で認められた。

対照眼の観察では、各動物とも観察期間を通じて角膜、虹彩および結膜に異常はなく、眼のその他の変化も認められなかった。

これらのことから、刺激性の最終評価は、「軽度の刺激性あり」と区分された。

洗眼群では、投与1時間後の観察で結膜発赤（評点:1）が全例で認められ、MTSは2.0であった。投与24時間後では、結膜発赤は消失し、MTSは0となった。フルオレセインによる角膜検査では、いずれの動物においても染色斑は認められなかった。

眼のその他の変化は、いずれの動物においても認められなかった。

洗眼群でのMMTSは、投与1時間後の2.0であり、非洗眼群と比較して刺激反応は軽度であり、刺激性の消失も速やかであった。このことから、検体による刺激性は洗眼処置により軽減することは明らかであると思われた。

以上の結果から、検体は、本試験条件下 ウサギの眼粘膜に対して「軽度の刺激性あり」と判断された。また洗眼処置により刺激性は明らかに軽減されるものと判断した。

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。

トリビュート OD のモルモットに対する皮膚感作性試験 (Buehler 法)

(毒性資料 製剤 5)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

被験物質	組成	有効成分	ホラムスルフロロン	2.2% (表示値) *
		その他	植物油、界面活性剤等	97.7 %

試験動物 : ハートレー系白色雌モルモット; 感作群 20 匹 非感作群 10 匹
感作開始時の週齢および体重; 6 週齢、体重 321~394g

観察期間 : 48 時間観察

試験方法 : Buehler 法により行った。

試験濃度設定の理由

本試験の濃度は、予備試験の結果に基づいて設定した。予備試験では、4 濃度 (10、25、50 および 100w/v%) の各 0.2mL/1 例をパッチに塗布し、4 例の動物に 6 時間閉塞貼付した。貼付 6 時間後、パッチを除去し 24 および 48 時間後に観察を行った。その結果、100%の濃度までいずれの観察時間とも皮膚反応は認められなかった。

このことから、本試験の感作濃度および惹起濃度は、投与可能な最大濃度であり、無刺激濃度と判断された 100%(原液)として設定した。

感作および惹起処置

感作; 感作開始日 (0 日) にあらかじめ刈毛・剃毛 (5×5cm) した左側胴部の皮膚に、100%濃度の検体 0.2mL をパッチ (直径 2.5cm) に塗布し、6 時間閉塞貼付した。貼付 6 時間後、パッチを除去し、注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。この操作を感作開始日、7 日後および 14 日後に行った。

非感作群は、同様に注射用水 0.2mL をパッチに塗布して閉塞貼付した。

惹起; 感作 27 日後に、右側胴部を刈毛・剃毛 (5×5cm) し、100%濃度の検体 0.2mL をパッチに塗布し、6 時間閉塞貼付した。貼付後、パッチを除去し、注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。

非感作群は、同様に 100%濃度の検体 0.2mL をパッチに塗布して閉塞貼付した。

観察項目 :

一般状態の観察は、感作開始日 (0 日) から惹起後の皮膚の観察終了日 (30 日後) まで 1 日 1 回行った。体重測定は、感作開始日 (0 日)、最終感作日 (14 日後)、惹起日 (28 日後) および観察終了日 (30 日後) に行った。

皮膚反応の観察は、惹起貼付除去 24 および 48 時間後に紅斑および浮腫の形成について行い、皮膚反応の評価表 (Magnusson & Kligman の基準) に従って判定した。また、紅斑および浮腫以外のその他の皮膚反応についても観察した。

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。

評 価 :

皮膚反応の評価表により、採点した個体別の評点を合計し、観察時ごとに各試験群の平均評点を算出するとともに、評点1以上を陽性とする陽性率（感作陽性動物数／供試動物数×100）を求め、感作群と非感作群の平均評点および陽性率を比較し、皮膚感作性を評価した。

結 果

一般状態の観察および体重

一般状態の観察において、検体に起因する異常所見は認められなかった。

体重の測定では、感作群および非感作群のいずれの動物においても、検体に起因する異常は認められなかった。

感作性

皮膚反応の判定結果を以下の表に示す。

群	供試動物数	感 作 濃 度	誘 発 濃 度	感作反応動物数								平均 評 点		陽 性 動 物 数	感 作 陽 性 率 (%)	
				24 時間				48 時間				24 時間	48 時間			
				皮 膚 反 応 評 点												
				0	1	2	3	0	1	2	3					
検 体	感 作 群	20	100%	100%	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
	非 感 作 群	10	0%	100%	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

感作陽性率 (%) = 感作陽性動物数 / 供試動物数 × 100

皮膚反応は、惹起貼付除去後 24 時間および 48 時間の観察で、感作群および非感作群のいずれの動物にも認められず、平均評点は各々0であり、陽性率は0%であった。

これらの結果から、本試験条件下において検体はモルモットの皮膚に対して、「皮膚感作性はない」と判断された。

なお、既知の皮膚感作性である陽性物質 DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) について、同系統の動物で Buchler 法により実施した試験結果を示す。

(試験実施日:2008年1月10日~3月28日)

群	供試動物数	感 作 濃 度*	誘 発 濃 度**	感作反応動物数								平均 評 点		陽 性 動 物 数	感 作 陽 性 率 (%)	
				24 時間				48 時間				24 時間	48 時間			
				皮 膚 反 応 評 点												
				0	1	2	3	0	1	2	3					
検 体	感 作 群	10	10%	0.25%	0	0	0	10	0	0	0	10	3.0	3.0	10	100
				0%	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
	非 感 作 群	5	0%	0.25%	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
				0%	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0

* : 溶媒 / エタノール ** : 溶媒 / アセトン

上記の表に示す様に、既知の皮膚感作性物質の DNCB には明らかな感作性が認められ、本方法のモルモットでの感作性物質に対する感受性が確認された。

IX. 動物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
1	動物における動態と代謝 (予備試験)	ラット	<p>供試化合物： ¹⁴C 標識ホラムスルフロン 標識位置 [Phe-UL-¹⁴C] [Pyr-2-¹⁴C]</p> <p>試験項目 吸収、分布、代謝及び排泄ならびに血中薬物動態</p> <p>投与用量 低用量：10 mg/kg bw 高用量：1000 mg/kg bw</p> <p>投与回数 単回</p>	<p>排泄 放射能の回収は投与量の96～98%であった。いずれの試験群でもほぼ定量的に尿(4～11%)及び糞(85～94%)から回収された。呼気への放射能の排泄はほとんど認められなかった(0.02%未満)。尿あるいは糞に排泄された放射能量の大部分は投与後48時間以内に排泄された。主要排泄経路はいずれの場合も糞であった。</p> <p>血漿中放射能濃度 血中放射能濃度は雌雄いずれあるいはいずれの投与量でも投与1時間後にC_{max}に達した。半減期は低用量投与の雄で約61時間ならびに雌で約79時間、高用量投与の雄で約56時間ならびに雌で約57時間と算出された。</p> <p>屠殺時の動物体中残留量及び分布 屠殺時の動物体の臓器・組織における残留量は低く、ピリミジン標識投与後の雌雄の肝臓以外では放射能残留量は定量限界未満であった。</p> <p>代謝 尿からは未変化の親化合物ホラムスルフロン及び [M01]並びに AE F153745 が同定された。また、未同定の高極性物質 も検出された。糞からは未変化の親化合物ホラムスルフロンと AE F15374 が同定された。</p>	(1999)	運命-11
2	動物における動態と代謝 - 吸収、分布、排泄	ラット	<p>供試化合物： ¹⁴C 標識ホラムスルフロン 標識位置 [Phe-UL-¹⁴C]</p> <p>試験項目 吸収、分布及び排泄</p> <p>投与用量 低用量：10 mg/kg bw 高用量：1000 mg/kg bw</p> <p>投与回数 単回</p>	<p>排泄 放射能の回収は投与量の95～99%であった。いずれの試験群でもほぼ定量的に尿(1～6%)及び糞(90～97%)から回収された。尿あるいは糞に排泄された放射能量の大部分は投与後24時間以内に排泄された。主要排泄経路は投与量あるいは雌雄によらず糞であった。</p> <p>屠殺時の動物体中残留量及び分布 屠殺時の動物体の臓器・組織における残留量は低かった。低用量投与ではほとんどの臓器・組織で定量限界未満であり、放射能が検出された臓器は少なく、検出されたとしてもその残留濃度は低く、最大で0.002～0.003 ppm(筋肉及び肝臓)であった。高用量投与では大部分の臓器・組織で放射能が検出されたが、その残留濃度は低かった。肝臓、心臓、脾臓及び脂肪で比較的高い濃度(約0.5 ppm以上)が検出された。</p>	(1999)	運命-16

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動物植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁
3	動物における動態と代謝-胆汁排泄	ラット	供試化合物： ¹⁴ C 標識ホラムスルフロ ン 標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C] 試験項目 胆汁排泄 投与用量 低用量：10 mg/kg bw 投与回数 単回	排泄 投与量の 96.2%が胆汁、尿及び糞、屠殺時の動物体、ケージ洗浄液ならびにケージ屑から回収された。胆汁に排泄された放射能量は 4.2%と少なく、一方、糞からは約 76%が回収された。 動物体中残留量 投与 48 時間後に屠殺した動物体中の残留量は 1.5%であった。 吸収率 ホラムスルフロンの吸収率は 20%程度であり、大部分が未吸収として糞中に排泄された。	(2000)	運命-20
4	動物における動態と代謝-臓器・組織への分布	ラット	供試化合物： ¹⁴ C 標識ホラムスルフロ ン 標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C] 試験項目 臓器・組織への分布 投与用量 低用量：10 mg/kg bw 高用量：1000 mg/kg bw 投与回数 単回	血液及び血漿中放射能濃度の経時変化 低用量で投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雄ラットで 30 分後、雌ラットで 1 時間後に最高濃度に達した。その後の血液中及び血漿中からの放射能の消失も比較的速やかであり、雌雄とも消失半減期は 20 時間未満であった。高用量で投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雌雄いずれでも投与 4 時間後に最高濃度に達し、低用量投与に比べて明らかに遅延した。しかし、その後の消失は速やかであった。 臓器・組織における放射能濃度の経時変化 低用量で投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雄で 0.5~1 時間後、雌で 1 時間後に最高濃度に達した。雌雄いずれでも肝臓で最高濃度が検出され、腎臓における濃度も比較的高かった。雌雄いずれでも投与 30 時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で最高濃度の 1/10 未満となった。 高用量で投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雌雄いずれでも 4 時間後に最高濃度に達した。比較的高濃度が肝臓及び腎臓から検出された。雌雄いずれでも投与 30 時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で定量限界未満となった。雌雄いずれでも、投与 30 時間後の甲状腺あるいは副腎で高濃度の放射能が検出されたが、低用量では 30 時間後に検出されないことから、脂肪等との分離が十分出来ていなかった可能性も考えられる。 いずれの投与量でも、投与 30 時間後における臓器・組織中放射能濃度は最高濃度に比べて有意に減少し、ホラムスルロン関連代謝物等が臓器・組織に蓄積する可能性は示唆されなかった。	(1999)	運命-22

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。

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動物植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
5	動物における動態と代謝	ラット	供試化合物： ^{14}C 標識ホラムスルフロ ン 標識位置 [Phe-UL- ^{14}C] [Pyr-2- ^{14}C] 試験項目 代謝 投与用量 低用量：10 mg/kg bw 高用量：1000 mg/kg bw 投与回数 単回	排泄 投与量の 96～98%が回収された。雌雄あるいは投与用量によらず主要排泄経路はいずれの場合も糞であった(85～94%)。 代謝 雌雄あるいは投与用量の違いによらず、未変化の親化合物ホラムスルフロ ンが主要成分であった(投与量の約 75～80%)。ホラムスルフロ ンの吸収率が低いことから、大部分が未吸収のまま排泄されたと推定された。フェニル標識投与試験ではいずれの投与量でも [M01]及び AE F153745[M02]の 2 成分が同定され、ピリミジン標識投与では [M01]のみが同定された。いずれの標識位置の投与でも未同定の高極性成分が検出されたが、その量は比較的少なかった。	(2000)	運命 -27
6	動物における動態と代謝 反復投与後の分布、代謝	ラット	供試化合物： ^{14}C 標識ホラムスルフロ ン 標識位置 [Phe-UL- ^{14}C] 試験項目 排泄、分布及び代謝 投与用量 低用量：10 mg/kg bw 投与回数 1～14 回(1 回/日)	排泄 最終投与から 48 時間後までの放射能回収量に対する尿中及び糞中の排泄割合はそれぞれ尿で雄の約 5%及び雌の約 7%、糞で雄の約 61%及び雌の約 89%であった。雄では消化管を含む残体中から約 25%が回収され、この大部分は未排泄の糞と推定され、14 回反復投与後においても糞が主要排泄経路であった。先の試験(動物代謝 2)で認められた単回投与後の尿及び糞への排泄割合と 14 回反復投与後の尿及び糞への排泄割合は同等であった。 臓器・組織中放射能濃度の経時変化 9回あるいは 14 回の反復投与後にも、大部分の臓器・組織でその放射能濃度は単回投与の場合に比べてほとんど増加しなかったが、肝臓では投与回数の増加に伴い、僅かに増加した。しかし、肝臓における増加も投与回数に比例せず、14 回投与後においても単回投与に比べ雄で約 3 倍、雌で約 2 倍程度の増加となった。従って、ホラムスルフロ ンあるいはその代謝物が臓器・組織に蓄積する可能性はほとんど考えられなかった。 代謝 14 日間の反復投与後においても、未変化の親化合物ホラムスルフロ ンが主要成分であった。単回投与の場合と同様に、ホラムスルフロ ン以外に [M01]及び AE F153745[M02]の 2 成分が同定された。排泄物中の代謝物の定性的及び定量的分布に投与回数による違いは認められなかった。	(1999)	運命 -31

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
7	好氣的土壤における分解	土壤	<p>供試化合物： ¹⁴C 標識ホラムスルフロ ン 標識位置 [Phe-UL-¹⁴C] [Pyr-2-¹⁴C]</p> <p>試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失</p> <p>供試土壤： Maquoeta (シルト質壇壤土、 米国アイオワ州) Pikeville (壤質砂上、 米国ノースカロライナ州)</p> <p>処理量：0.069 ppm 試験温度：25℃</p>	<p>物質収支、放射能の分布 土壤からの放射能の回収はベンゼン環標識では Maquoeta 土壤で平均 98%、Pikeville 土壤で平均 96%であり、ピリミジン環標識では Maquoeta 土壤で平均 97%、Pikeville 土壤で平均 93%であった。いずれの標識位置でも、抽出可能な放射能量は速やかに減少し、それに伴い未抽出残留物の量が増加した。未抽出残留物の量はベンゼン環標識では処理 188 日後(両土壤とも処理量の約 88%)、ピリミジン環標識では処理 60~120 日後に最大に達した(Maquoeta 土壤で約 75%、Pikeville 土壤で約 56%)。 二酸化炭素の生成量はベンゼン環標識で少なく(約 1%)、ピリミジン環標識で多かった(Maquoeta 土壤で 12%、Pikeville 土壤で 22%)。揮発性有機化合物の生成はいずれの標識位置でもほとんど認められなかった。</p> <p>ホラムスルフロンの分解速度 ホラムスルフロンはいずれの土壤でも 14 日後には 50%以下に減衰した。両標識位置の平均により求めた半減期は Maquoeta 土壤で 13 日、Pikeville 土壤で 10 日と算出された。</p> <p>分解物の生成及び消長 アミン[M01]が両土壤中速やかに生成し、3 日後に最大(約 10%)となった後、速やかに減少した。</p> <p>未抽出残留物の特徴付け 0.25M 塩酸で抽出可能な放射能量は少なかったが、その後の腐植酸への両分化における 0.5M 水酸化ナトリウム処理により、未抽出放射能の約 40~70%が可溶化した(フルボ酸両分と腐植酸両分の合計)。いずれの標識位置でも Maquoeta 土壤ではヒューミン画分中の放射能量が比較的多かった。</p>	(1999)	運命-36

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
8	嫌氣的土壤における分解	土壤	<p>供試化合物： ¹⁴C 標識ホラムスルフロンの 標識位置 [Phe-UL-¹⁴C] [Pyr-2-¹⁴C]</p> <p>試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失</p> <p>供試土壤： Shuttleworth (砂壤土、英国 Bedfordshire)</p> <p>処理量：0.092 ppm</p> <p>試験温度：20℃</p> <p>1cm 温水、窒素気流下嫌氣 条件に維持</p>	<p>物質収支、放射能の分布</p> <p>両標識化合物の試験期間中の放射能の回収率はそれぞれ 85.1～106.4% および 86.9～107.1% であった。表層水中の放射能量は最初の 14 日間に徐々に減少し、それに伴い土壤抽出液中及び未抽出残留物中の放射能量は増加した。14 日後以降、未抽出残留物中の放射能量が増加し、128 日後には約 19% および 23% となった。揮発性有機物の生成は認められず、二酸化炭素もほとんど生成しなかった。</p> <p>ホラムスルフロンの分解速度</p> <p>親化合物ホラムスルフロンの分解は比較的緩やかであり、一次速度式による推定半減期は 165 日であった (両標識位置の平均)。</p> <p>分解物の生成及び消長</p>	(1999)	運命-44

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁																									
9	加水分解	緩衝液 pH 4 pH 5 pH 7 pH 9	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの 標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C] [Pyr-2- ¹⁴ C] 試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失 試験濃度： 5.0 ppm (Phe)及び 5.5 ppm (Pyr) 試験温度：25℃及び40℃	<p>分解速度 ホラムスルフロンはいずれの pH でも分解した。分解速度は pH が低いほど速やかであり、それぞれの pH で以下の半減期が得られた(25℃)。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>pH 4</th> <th>pH 5</th> <th>pH 7</th> <th>pH 9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>半減期(h)</td> <td>3.7</td> <td>10.1</td> <td>128</td> <td>132</td> </tr> </tbody> </table> <p>分解経路及び分解物</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>pH 4</th> <th>pH 5</th> <th>pH 7</th> <th>pH 9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>主要分解物 (>=10%)</td> <td>[M02] [M04]</td> <td>[M02] [M04]</td> <td>なし</td> <td></td> </tr> <tr> <td>少量分解物 (<10%)</td> <td>[M01] [M03] [M05] [M06]</td> <td>[M03] [M05]</td> <td>[M01] [M02] [M04]</td> <td>[M01] [M02] [M04]</td> </tr> </tbody> </table>		pH 4	pH 5	pH 7	pH 9	半減期(h)	3.7	10.1	128	132		pH 4	pH 5	pH 7	pH 9	主要分解物 (>=10%)	[M02] [M04]	[M02] [M04]	なし		少量分解物 (<10%)	[M01] [M03] [M05] [M06]	[M03] [M05]	[M01] [M02] [M04]	[M01] [M02] [M04]	(2000年)	運命-49
	pH 4	pH 5	pH 7	pH 9																											
半減期(h)	3.7	10.1	128	132																											
	pH 4	pH 5	pH 7	pH 9																											
主要分解物 (>=10%)	[M02] [M04]	[M02] [M04]	なし																												
少量分解物 (<10%)	[M01] [M03] [M05] [M06]	[M03] [M05]	[M01] [M02] [M04]	[M01] [M02] [M04]																											
10	水中光分解-1	緩衝液 pH7	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの 標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C] 試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失 試験濃度：100.4 ppm 試験温度：25℃ 光強度：51.7~77.2MJ/m ² /日 (300~3000 nm)	<p>物質収支 処理量の 99.6~100%が溶液及び捕集液から回収された。</p> <p>分解 緩衝液中におけるホラムスルフロンの直接光分解による分解はほとんど認められなかった。</p>	(1999)	運命-55																									

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁
11	水中光分解-2	自然水	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの標識位置 [Pyr-2- ¹⁴ C] 試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失 試験濃度：1.2 ppm 試験温度：25℃ 光強度：680 W/m ² (290～800 nm)	物質収支 照射後の溶液からの回収率は良好であり、処理量の100～101.9%が回収された。 分解速度 ホラムスルフロンは自然水中で光分解を受け、照射5日後には処理量の13.5%まで減少した。暗対照試料では処理5日後に92.8%残存していた。ホラムスルフロンの自然水光分解半減期は1.9日(東京の自然条件で13.2日)と算出された。 分解物	(2008)	運命-58
12	水中光分解-3	自然水 pH7	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C] 試験項目 分解速度 分解物の生成及び消失 試験濃度： 1.0 ppm 試験温度：25℃ 光強度：680 W/m ² (290～3000 nm)	物質収支 溶液からの回収率は良好であり、処理量の95.4～102.1%が回収された。 分解速度 ホラムスルフロンは自然水中で光分解を受け、照射5日後には処理量の11.0%まで減少した。実験条件における半減期は2.1日と計算された。この値から4～6月の東京の自然太陽光下における半減期は14.6日と算出された。 分解物	(2009)	運命-61

<代謝分解試験一覧表(続き)>

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁								
13	土壌吸着-1	畑地土壌 5 種	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの標識位置 [Phe-UL- ¹⁴ C]	安定性(物質収支) 被験物質の安定性はいずれの土壌においても比較的良好であり、処理量の約 90%以上が回収された。 吸着係数 各土壌における吸着係数(K_F^{ads} 及び $K_F^{ads}_{OC}$)を下表に示す。	(2000)	運命-64								
							土壌	粘土含量 (%)	土性	OC%	pH (CaCl ₂)	OECD 型	K_F^{ads}	$K_F^{ads}_{OC}$
							Maquoketa、米国	29.2	SiCL	1.73	7.2	≒3	2.61	151
							Pikeville、米国	4.8	LS	0.47	6.2	≒5	0.42	89
							Muenster、ドイツ	6.0	LS	1.80	5.5	≒5	0.91	51
							Shuttleworth、英国	6.0	S	0.81	6.4	≒5	0.31	38
							Chantepie、フランス	40.0	C	1.84	5.4	≒3	1.17	63
14	土壌吸着-2	畑地上土壌 2 種	¹⁴ C 標識ホラムスルフロンの標識位置 [Pyr-UL- ¹⁴ C]	安定性(物質収支) 被験物質の安定性はいずれの土壌においても比較的良好であり、処理量の約 90%以上が回収された。 吸着係数 各土壌における吸着係数(K_F^{ads} 及び $K_F^{ads}_{OC}$)を下表に示す。	(2008)	運命-69								
							土壌	粘土含量 (%)	土性	OC%	pH (CaCl ₂)	OECD 型	K_F^{ads}	$K_F^{ads}_{OC}$
							牛久、日本	11	砂壤土	4.3	5.6	2 に類似	11.741	273.0
							上川、日本	19	壤土	2.1	4.9	4 に類似	6.827	325.1

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。

<代謝分解物 一覧表>

記号	由来	名称	化学名	構造式
	親化合物	ホラムスルフロ ン	1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イ ル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5- ホルムアミドフェニルスルホニル] 尿素	
[M01]				
[M02]				
[M03]				
[M04]				
[M05]				
[M06]				
[M07]				

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	化学名	構造式
[M08]				
[M09]				
[M10]				
[M11]				
[M12]				

1. 動物における動態と代謝試験

(1) ラットにおける薬物動態 (予備試験)

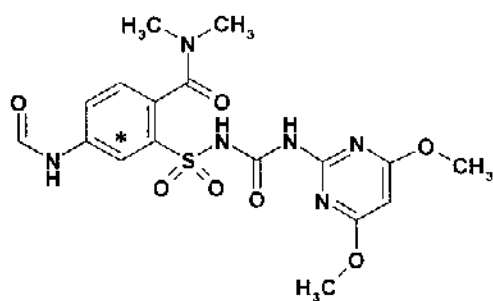
(運命資料 1)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

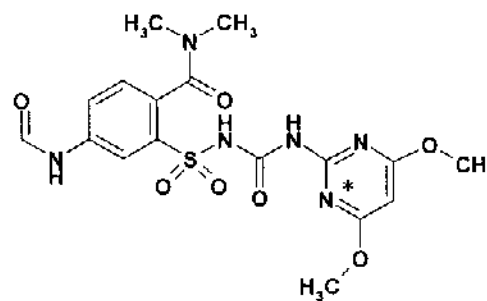
供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



(1)



(2)

*：標識部位

	(1)	(2)
標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]	[ピリミジン(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：		
放射化学的純度：		

標識位置の設定理由：分子中にベンゼン環及びピリミジン環の2種の環構造を有する。各環特有の代謝物の生成が確認できるように、本試験では両環を標識した。

【方法】

1. 動物

約6.5週齢(体重139~178 g)のSDラット(CRL:CD(SD)BR)を用いた。動物を受領後、5~6日間馴化した後に投与懸濁液(1%トラガカントゴム溶液で調製)を投与した。

2. 試験群(表 1)

表1に示すように、それぞれの試験群のラットに所定量(低用量では10 mg/kg bw、高用量では1000 mg/kg bw)のホルムスルフロンを単回経口投与した。

投与後、それぞれの試験群から様々な採取間隔で呼気、尿、糞及び血液を採取した。試験群A~Cでは試験期間終了時に動物を屠殺し、臓器・組織、残体を採取した。

表1 試験群及び各試験群における調査項目

試験群番号	試験群	性/匹数	投与用量 (mg/kg bw)	標識位置	試験期間	採取試料
A	低用量排泄	雌雄 / 各2	10	Phe	7 d	尿、糞、臓器・組織、残体、胃腸管、二酸化炭素 [#]
B	高用量排泄	雌雄 / 各1	1000	Phe	7 d	尿、糞、臓器・組織、残体、胃腸管、二酸化炭素 [#]
C	低用量排泄	雌雄 / 各2	10	Pyr	3 d	尿、糞、臓器・組織、残体、胃腸管、二酸化炭素 [#]
D	低用量血中薬物動態	雌雄 / 各4	10	Phe	3 d	血液
E	高用量血中薬物動態	雌雄 / 各4	1000	Phe	3 d	血液

* いずれの試験群も単回経口投与

投与2日後まで採取

3. 試料採取

放射能標識ホラムスルフロンを投与後、ラットを個別に代謝ケージに收容し、それぞれの試料を各動物から採取した。

呼気

試験群 A～C から呼気を投与後2日まで採取した。

血液

投与0.5、1、2、4、6、8、12、16、20、24、30、48及び72時間後にラット尾静脈から血液を採取した。1回当たりの採取量は100 µL未満とし、1動物からの採取回数が4回未満となるようにそれぞれの採取時間に異なる個体から血液を採取した。採取後、血液を吸収剤に吸収させた後、放射能測定試料とした。

尿及び糞

各個体から個別に尿および糞を採取した。投与後6(尿のみ)、12(尿のみ)、24時間及び2、3、4、5、6ならびに7日後に採取した。

臓器及び組織

動物を屠殺後解剖し、臓器及び組織を採取した。残体も採取し分析した。心血を遠心分離し、血漿を得た。

4. 分析

(1) 放射能の測定

尿及び血漿ならびにケージ洗浄液等の液体試料は液体シンチレーションカウンター(LSC)で直接、放射能を測定した。糞は水に溶解後、LSCで放射能を測定した。骨及び血液はオキシダイザーで燃焼後、LSCで放射能を測定した。副腎、眼、卵巣、甲状腺、筋肉及び脂肪ならびに大部分のその他の臓器・組織は細胞溶解液に溶解後、LSCで放射能を測定した。胃腸管を含む残体は水酸化ナトリウムを用いて溶解後、酢酸で酸性化した後にLSCで放射能を測定した。

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

(2) クロマトグラフィーによる代謝物の予備分析

尿及び糞抽出液中の代謝物を薄層クロマトグラフィー(TLC)及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析したが、定性のみを実施した。

【結果】

1. 排泄(表 2)

放射能の回収は投与量の 96~98%と回収は良好であり、いずれの試験群においても投与量がほぼ定量的に尿及び糞から回収された。呼気への放射能の排泄はほとんど認められなかった(0.02%未満)。尿あるいは糞に排泄された放射エネルギーの大部分は投与後 48 時間以内に排泄された。

雌雄あるいは投与用量によらず主要排泄経路はいずれの場合も糞であり、投与放射能の大部分が糞から回収され(85~94%)、尿中排泄量は少なかった(4~11%)。

いずれの試験群でも、屠殺時の動物体から放射能は検出されなかった。

表 2 排泄物及び動物体における放射能残留 (投与量に対する割合%)

試験群番号	A		B		C	
試験群	低用量排泄		高用量排泄		低用量排泄	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌
投与用量 (mg/kg bw)	10		1000		10	
標識位置	Phe		Phe		Pyr	
屠殺時間	168 h		168 h		72 h	
呼気	0.001	0.001	<LOQ	<LOQ	0.018	0.016
尿	9.575	10.83	3.803	5.081	9.169	9.353
ケージ洗浄液	0.099	0.053	0.036	0.083	0.212	0.146
糞	86.44	84.91	93.96	90.91	87.25	86.78
動物体	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
合計	96.115	95.794	97.799	96.074	96.649	96.295

LOQ 定量限界

2. 血漿中放射能濃度(表 3)

低用量投与(10 mg/kg)では、血中放射能濃度は雌雄いずれでも投与 1 時間後に C_{max} に達した後、投与 16 時間後まで速やかにかつ単調に減少した後、投与 16 時間後以降は低い濃度で一定を保った。高用量投与(1000 mg/kg)でも血中放射能濃度は雌雄いずれでも投与 1 時間後に C_{max} に達したが、その後の減少は低用量投与の場合に比べて顕著ではなく、吸収あるいは排泄の遅延が示唆された。

最終半減期は低用量投与の雄で約 61 時間ならびに雌で約 79 時間、高用量投与の雄で約 56 時間ならびに雌で約 57 時間と算出された。

表3 血中放射能濃度変化(換算濃度、mg/kg)

投与後 時間 (時)	10 mg/kg bw				1000 mg/kg bw			
	雄		雌		雄		雌	
動物 番号	血中 濃度	動物 番号	血中 濃度	動物 番号	血中 濃度	動物 番号	血中 濃度	
0.5	19M 1.0397	20F 1.2471	21M 14.0216	22F 14.3636				
1	19M 1.3667	20F 1.4086	21M 20.1369	22F 14.4038				
2	19M 0.9248	20F 0.6931	21M 7.7635	22F 9.1365				
4	15M 0.2340	16F 0.1487	17M 15.9981	18F 12.9202				
6	15M 0.1868	16F 0.0817	17M 7.3515	18F 3.6635				
8	15M 0.1424	16F 0.0547	17M 6.1245	18F 3.0677				
12	15M 0.1121	16F 0.0588	17M 5.9746	18F 9.7946				
16	23M 0.0239	24F 0.0161	25M 2.7949	26F 1.2149				
20	23M 0.0160	24F 0.0179	25M 1.1504	26F 0.9930				
24	11M 0.0189	12F 0.0164	13M 1.0115	14F 1.0266				
30	19M 0.0153	20F 0.0142	21M 0.8745	22F 0.8151				
48	11M 0.0096	12F 0.0121	13M 0.7875	14F 0.9314				
72	11M 0.0123	12F 0.0107	13M 1.0168	14F 0.5247				

3. 分布

屠殺時の動物体の臓器・組織における残留量は低く、ピリミジン標識投与後の雌雄の肝臓以外では放射能残留量は定量限界未満であった。ピリミジン標識投与後の雌雄の肝臓における残留量は雄で 0.032 ppm 及び雌で 0.044 ppm であった。

4. 代謝の予備分析

尿からは未変化の親化合物ホラムスルフロン及び [M01]並びに [M02] が同定された。また、未同定の高極性物質(ピリミジン環標識のみ)も検出された。糞からは未変化の親化合物ホラムスルフロンと [M02] が同定された。

【結論】

- ホラムスルフロンを投与後の放射能の排泄は、標識位置あるいは投与用量によらず類似し、いずれの場合においても投与量が定量的に排泄物から回収された。主要排泄経路はいずれの場合でも糞であった。
- ホラムスルフロンの排泄及び血中薬物動態に投与量の違いによる差はほとんど認められなかった。
- ホラムスルフロンの代謝は限られており、主要成分は親化合物であった。開裂体が認められ、代謝物には標識位置の違いによる差が認められた。

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

推定代謝経路を以下に示す。

図 ホラムスルフロンのラットにおける推定代謝経路

1. 動物における動態と代謝試験

(2) ラットにおける吸収、分布及び排泄

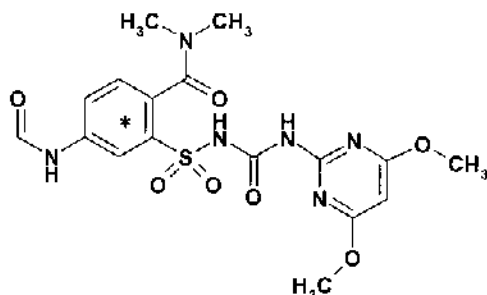
(運命資料 2)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

【方法】

1. 動物

約6.5週齢(体重148～171 g)のSDラット(CRL:CD(SD)BR)を用いた。動物を受領後、6日間馴化した後に投与懸濁液(1%トラガカントゴム溶液で調製)を投与した。

2. 試験群(表 1)

表1に示すように、それぞれの試験群のラットに所定量(低用量では10 mg/kg bw、高用量では1000 mg/kg bw)のホラムスルフロンを単回経口投与した。

表1 試験群及び各試験群における調査項目

試験群	性 / 匹数	投与用量 (mg/kg bw)	標識 位置	試験 期間	採取試料
低用量	雌雄 / 各4	10	Phe	3 d	尿、糞、臓器・組織、残体、皮膚
高用量	雌雄 / 各4	1000	Phe	3 d	尿、糞、臓器・組織、残体、皮膚

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. 試料採取

放射能標識ホラムスルフロンを投与後、ラットを個別に代謝ケージに収容し、それぞれの試料を各動物から採取した。

尿及び糞

各個体から個別に尿及び糞を採取した。投与後 6(尿のみ)、12(尿のみ)、24、48 及び 72 時間後に採取した。

臓器及び組織

動物を屠殺後解剖し、臓器及び組織(副腎、骨、脳、眼、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、脂肪(腎周囲)、脾臓、精巣及び甲状腺)を採取した。皮膚(背中の上部より採取)ならびに胃腸管を含む残体も採取し分析した。心血を遠心分離し、血漿を得た。

4. 分析

尿及び血漿ならびにケージ洗浄液等の液体試料は液体シンチレーションカウンター(LSC)で直接、放射能を測定した。

糞は水に溶解後、細胞溶解液に溶解した後、LSC で放射能を測定した。

骨及び血液はオキシダイザーで燃焼後、LSC で放射能を測定した。

副腎、眼、卵巣、甲状腺、筋肉及び脂肪ならびに大部分のその他の臓器・組織は細胞溶解液に溶解後、LSC で放射能を測定した。胃腸管を含む残体は水酸化ナトリウムを用いて溶解後、酢酸で酸性化した後に LSC で放射能を測定した。

【結果】

1. 排泄(表 2)

放射能の回収は投与量の 95~99%と回収は良好であり、いずれの試験群においても投与量がほぼ定量的に尿及び糞から回収された。尿あるいは糞に排泄された放射能量の大部分は投与後 24 時間以内に排泄された。雌雄あるいは投与用量によらず主要排泄経路はいずれの場合も糞であり、投与放射能の大部分が糞から回収され(90~97%)、尿中排泄量は少なかった(1~6%)。

いずれの試験群でも、屠殺時の動物体における残留量は少なく、いずれの投与量あるいは性でも投与量の 0.01%未満であった。

表 2 排泄物及び動物体における放射能残留 (投与量に対する割合%)

試験群	低用量		高用量	
	雄	雌	雄	雌
投与用量	10 mg/kg bw		1000 mg/kg bw	
屠殺時間	72 h		72 h	
尿	5.066	5.816	1.303	1.456
ケージ洗浄液	0.244	0.310	0.063	0.088
糞	89.97	89.50	94.43	97.13
動物体	0.003	0.010	0.003	0.009
合計	95.28	95.63	95.80	98.68

2. 分布(表 3)

投与 3 日後に動物を屠殺し、臓器・組織における分布を調べたが、屠殺時の動物体の臓器・組織における残留量は低かった。低用量投与ではほとんどの臓器・組織で定量限界未満であり、放射能が検出された臓器は少なく、検出されたとしてもその残留濃度は低く、最大でも 0.002~0.003 ppm(筋肉及び肝臓)であった。高用量投与では大部分の臓器・組織で放射能が検出されたが、その残留濃度は低かった。肝臓、心臓、脾臓及び脂肪で比較的高い濃度(約 0.5 ppm 以上)が検出された。

表 3-1 屠殺時の臓器・組織における放射能残留 (換算濃度、ppm)

臓器・組織	試験群	低用量		高用量	
	性	雄	雌	雄	雌
	用量	10 mg/kg bw		1000 mg/kg bw	
副腎		0.001	0.001	0.309	0.196
血液		0.001	<LOQ	0.101	0.097
骨		0.001	<LOQ	0.130	0.146
脳		0.000	<LOQ	0.152	0.131
残体(胃腸管を含む)		<LOQ	<LOQ	0.032	0.094
眼		0.001	0.001	0.005	<LOQ
心臓		<LOQ	<LOQ	0.813	0.459
腎臓		<LOQ	<LOQ	0.006	0.007
肝臓		0.002	0.002	0.480	0.510
肺		<LOQ	<LOQ	0.004	0.005
筋肉		0.003	0.002	0.182	0.180
卵巣			0.001		0.264
血漿		<LOQ	<LOQ	0.036	0.018
脂肪(腎周囲)		0.001	0.001	0.653	0.485
皮膚		0.001	<LOQ	0.104	0.116
脾臓		<LOQ	<LOQ	1.608	0.551
精巣		<LOQ		0.293	
甲状腺		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

* LOQ 定量限界

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 屠殺時の臓器・組織における放射能残留 (投与量に対する割合(%))

臓器・組織	試験群	低用量		高用量	
	性	雄	雌	雄	雌
	用量	10 mg/kg bw		1000 mg/kg bw	
副腎		0.000	0.000	0.000	0.000
血液		0.000	0.000	0.000	0.000
骨		0.000	0.000	0.000	0.000
脳		0.000	0.000	0.000	0.000
残体(胃腸管を含む)		0.003	0.010	0.003	0.009
眼		0.000	0.000	0.000	0.000
心臓		0.000	0.000	0.000	0.000
腎臓		0.000	0.000	0.000	0.000
肝臓		0.001	0.001	0.003	0.003
肺		0.000	0.000	0.000	0.000
筋肉		0.000	0.000	0.000	0.000
卵巣			0.000		0.000
血漿		0.000	0.000	0.000	0.000
脂肪(腎周囲)		0.000	0.000	0.000	0.000
皮膚		0.000	0.000	0.000	0.000
脾臓		0.000	0.000	0.001	0.000
精巣		0.000		0.000	
甲状腺		0.000	0.000	0.000	0.000

* LOQ 定量限界

【結論】

- ホラムスルフロンを投与後、投与量は定量的に排泄物から回収された。主要排泄経路は糞であった。
- 屠殺時の臓器・組織における残留量は低く、低用量ではほとんどの臓器・組織で定量限界未満か 0.003 ppm 以下であった。高用量でも残留量は低かったが、肝臓、心臓、脾臓及び脂肪で比較的高い濃度の放射能(約 0.5 ppm 以上)が検出された。

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。

1. 動物における動態と代謝試験

(3) ラットにおける吸収及び胆汁排泄

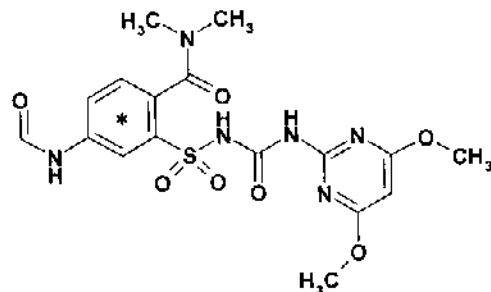
(運命資料3)

報告書作成年：2000年 [GLP対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

【方法】

1. 動物

約6～10週齢(体重203～221g)のSDラット(CRL:CD BR)を用いた。動物を受領後、約1週間馴化した後に投与懸濁液(1%トラガカントゴム溶液で調製)を投与した。

2. 試験群

胆管カニューレを挿入した雄ラットにホラムスルフロンを10 mg/kg bwの用量で単回経口投与した(投与液量5 mL/kg)。

3. 試料採取

放射能標識ホラムスルフロンを投与後、ラットを個別に代謝ケージに収容した後、尿、胆汁及び糞を各動物から採取した。尿及び糞は投与後24及び48時間後に採取した。胆汁は投与2、4、6、12、24、48時間後に採取した。投与48時間後にラットを屠殺し、動物体試料とした。

4. 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。

尿及び糞抽出液、胆汁ならびにケージ洗浄液等の液体試料は液体シンチレーションカウンター(LSC)で直接、放射能を測定した。

抽出後の糞及びケージ屑はオキシダイザーで燃焼後、LSCで放射能を測定した。

動物体は 還流溶解後、 中和した後に LSC で放射能を測定した。

【結果】

1. 排泄及び動物体中残留量

投与量の 96.2%が胆汁、尿及び糞、屠殺時の動物体、ケージ洗浄液ならびにケージ屑から回収された。胆汁に排泄された放射エネルギーは 4.2%と少なく、一方、糞からは約 76%が回収された。尿および胆汁からの回収率の合計として示される吸収率は約 17%と計算された。(申請者注：尿+胆汁+ケージ洗浄液+ケージ屑+動物体で算出される吸収率は 20.6%であった。)

表 1 排泄物及び動物体における放射能残留 (投与量に対する割合%)

投与用量	10 mg/kg bw						合計	
	採取時期	2h	4h	6h	12h	24h		48h
胆汁		0.152	0.472	0.494	1.244	1.227	0.609	4.198
尿						10.50	2.166	12.67
糞						62.89	12.74	75.63
ケージ洗浄液合計							1.771	1.771
ケージ屑							0.446	0.446
動物体							1.511	1.511
合計								96.22

【結論】

- ホラムスルフロンを投与後、投与量はほぼ定量的に排泄物から回収された。主要排泄経路は糞であり、胆汁中排泄量は約 4%と少量であった。
- ホラムスルフロンの吸収率は約 20%と推定され、大部分が未吸収として糞中に排泄されることが分かった。

1. 動物における動態と代謝試験

(4) ラットにおける臓器・組織への分布及び消長

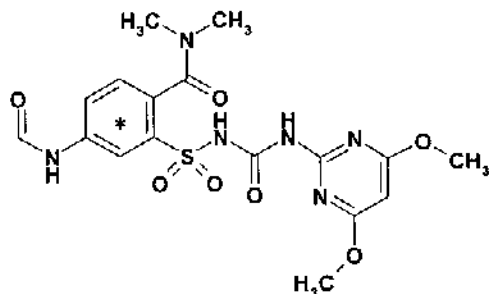
(運命資料 4)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 動物

約6～12週齢(体重158～202g)のSDラット(CRL:CD(SD)BR)を用いた。動物を受領後、少なくとも4日間馴化した後に投与懸濁液(1%トラガカントゴム溶液で調製)を投与した。

2. 試験群

それぞれの試験群のラットに所定量(低用量では10 mg/kg bw、高用量では1000 mg/kg bw)のホラムスルフロンを4 mL/kg bwの割合で単回経口投与した。いずれの投与用量でも雌雄15匹のラットを用いた。

3. 試料採取

放射能標識ホラムスルフロンを投与後、ラットをケージに収容した。投与0.5、1、4、12及び30時間後に各試験群から3匹を屠殺し、血液及び以下の臓器・組織を採取した。血液は採取後、遠心分離し、血漿を得た。

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

採取した臓器及び組織：肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、精巣または卵巣、眼、副腎、骨、脂肪、甲状腺、残体、胃腸管と内容物

4. 分析

臓器・組織中の放射エネルギーを燃焼分析、あるいは可溶化後液体シンチレーションカウンター(LSC)により測定した。以下にそれぞれの臓器・組織で用いた分析法を示す。

- ✓ 全血及び骨はオキシダイザーで燃焼後、LSCで放射エネルギーを測定した。
- ✓ 副腎、甲状腺、眼及び卵巣は細胞溶解液で可溶化後、LSCで放射エネルギーを測定した。
- ✓ 上記以外の臓器・組織及び残体は水酸化カリウムのメタノール溶液を用いて溶解した後、LSCで放射エネルギーを測定した。残体は加熱還流により溶解し、残体を除く臓器・組織は室温または55°Cで溶解した。

【結果】

1. 血液及び血漿中放射能濃度の経時変化(表 1)

10 mg/kg の用量で単回経口投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雄ラットで30分後、雌ラットで1時間後に最高濃度に達した。その後の血液中及び血漿中からの放射能の消失も比較的速やかであり、雌雄とも消失半減期は20時間未満であった。1000 mg/kg の用量で単回経口投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雌雄いずれでも投与4時間後に最高濃度に達し、低用量投与に比べて明らかに遅延した。しかし、その後の消失は速やかであった。

表 1 雄及び雌ラットの血液中薬物動態パラメーター

	10 mg/kg 投与群				1000 mg/kg 投与群			
	雄		雌		雄		雌	
	血液	血漿	血液	血漿	血液	血漿	血液	血漿
最高濃度 (µg/g)	0.554	0.903	0.429	0.691	9.201	11.57	6.726	14.81
最高濃度到達時間 (h)	0.5	0.5	1.0	1.0	4.0	4.0	4.0	4.0
消失半減期 (h)	11.36	18.46	4.059	5.437	NA	2.407	2.194	2.865
AUC _{0-t} (µg·h/g)	2.934	5.028	2.221	4.305	NA	84.66	47.91	101.6

NA 計算されず

2. 臓器・組織における放射能濃度の経時変化

いずれの投与量においても雌雄ラットにホラムスルフロンを単回経口投与30分後には放射能はほぼ全ての臓器・組織に分布した。10 mg/kg の用量で単回経口投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雄で0.5~1時間後、雌で1時間後に最高濃度に達した。雌雄いずれでも肝臓で最高濃度が検出され、腎臓における濃度も比較的高かった。雌雄いずれでも投与30時間後には、臓器・組織中残留濃度が減少し、大部分の臓器・組織で最高濃度の1/10未満となった。

1000 mg/kg の用量で単回経口投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雌雄いずれでも4時間後に最高濃度に達した。比較的高濃度が肝臓及び腎臓から検出された。雌雄いずれでも投与30時間後には、臓器・組織中残留濃度が減少し、大部分の臓器・組織で定量限界未満となった。眼、副腎、甲状腺及び雌の生殖器における放射能濃

度は投与 30 時間後の測定時において最大値を示した。（申請者による考察：この所見は当該臓器における蓄積の可能性を示唆するものであるが、調査時点間の変動が大きいこと、低用量においては検出されていないこと及び反復投与試験を含む他の代謝運命試験で同様の傾向が認められていないことから蓄積性はないものと考えられる。）

表 2 10 mg/kg で投与後のラットにおける臓器・組織中分布（換算濃度、ppm）

投与後時間	雄					雌				
	0.5	1	4	12	30	0.5	1	4	12	30
残体	0.135	0.209	0.202	0.191	0.075	0.132	0.198	0.117	0.355	0.106
血漿	0.903	0.735	0.416	0.057	0.029	0.604	0.691	0.286	0.087	0.01
血液	0.554	0.478	0.235	0.033	0.011	0.385	0.429	0.196	0.05	ND
眼	0.147	0.083	0.091	0.014	0.007	0.087	0.106	0.051	0.016	0.002
骨	0.082	0.086	0.045	0.002	0.004	0.051	0.075	0.039	0.011	ND
脳	0.032	0.031	0.032	ND	ND	0.034	0.04	0.04	ND	ND
脂肪	0.076	0.071	0.065	ND	ND	0.056	0.091	0.018	ND	ND
筋肉	0.096	0.129	0.112	0.01	0.01	0.084	0.136	0.082	0.022	0.005
心臓	0.246	0.26	0.188	0.02	0.043	0.192	0.317	0.14	0.044	0.016
肺	0.279	0.280	0.294	0.027	0.061	0.319	0.384	0.152	0.064	0.016
脾臓	0.130	0.151	0.121	ND	0.015	0.149	0.189	0.105	0.013	0.008
肝臓	1.059	2.532	3.328	0.722	0.288	1.417	3.807	4.875	1.591	0.078
腎臓	0.668	0.813	0.571	0.066	0.113	0.976	1.066	0.458	0.18	0.038
生殖腺	0.072	0.133	0.102	0.023	0.009	0.221	0.242	0.099	0.037	0.017
甲状腺	0.558	0.532	0.304	ND	ND	0.549	0.538	0.254	ND	ND
副腎	0.237	0.242	0.129	ND	ND	0.25	0.28	0.112	0.099	0.018

表 2-2 10 mg/kg で投与後のラットにおける臓器・組織中分布（投与量に対する割合；%）

投与後時間	雄					雌				
	0.5	1	4	12	30	0.5	1	4	12	30
残体	1.032	1.581	1.550	1.521	0.613	1.058	1.581	0.959	2.864	0.835
血漿	0.567	0.569	0.346	0.071	0.023	0.481	0.564	0.220	0.058	ND
血液	0.768	0.665	0.307	ND	ND	0.563	0.554	0.298	0.054	ND
眼	0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
骨	0.042	0.048	0.027	<0.001	0.004	0.028	0.042	0.020	0.007	ND
脳	0.002	0.002	0.002	ND	ND	0.003	0.003	0.003	ND	ND
脂肪	0.055	0.044	0.049	ND	ND	0.041	0.060	0.011	ND	ND
筋肉	0.456	0.583	0.511	0.053	0.041	0.372	0.612	0.372	0.103	0.024
心臓	0.010	0.011	0.008	<0.001	0.002	0.007	0.012	0.006	0.002	<0.001
肺	0.015	0.014	0.014	0.001	0.003	0.017	0.018	0.007	0.004	<0.001
脾臓	0.003	0.004	0.003	ND	<0.001	0.003	0.004	0.002	<0.001	<0.001
肝臓	0.468	1.108	1.378	0.347	0.126	0.548	1.434	1.857	0.710	0.039
腎臓	0.052	0.064	0.043	0.005	0.008	0.072	0.080	0.037	0.014	0.003
生殖腺	0.007	0.008	0.010	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	<0.001	<0.001
甲状腺	<0.001	<0.001	<0.001	ND	ND	<0.001	<0.001	<0.001	ND	ND
副腎	<0.001	<0.001	<0.001	ND	ND	0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

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

表 3-1 1000 mg/kg で投与後のラットにおける臓器・組織中分布 (換算濃度、ppm)

投与後 時間	雄					雌				
	0.5	1	4	12	30	0.5	1	4	12	30
残体	4.010	4.867	6.213	6.967	2.532	3.905	3.964	6.191	26.25	7.891
血漿	6.286	7.576	11.57	1.156	ND	3.417	5.636	14.81	2.138	ND
血液	2.553	6.048	9.201	ND	ND	3.43	4.033	6.726	0.537	ND
眼	5.623	3.381	5.477	4.297	7.691	3.143	2.056	4.257	1.492	7.188
骨	0.530	0.385	3.377	ND	ND	ND	0.663	0.685	ND	ND
脳	0.658	ND	ND	ND	ND	3.052	0.566	ND	ND	ND
脂肪	ND	ND	4.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
筋肉	2.439	1.889	4.228	ND	ND	0.686	1.538	3.198	ND	ND
心臓	5.036	3.908	7.886	ND	ND	ND	4.861	5.019	2.155	ND
肺	5.417	4.923	9.575	ND	ND	35.5	3.209	4.097	1.137	ND
脾臓	1.504	ND	5.88	ND	ND	ND	2.149	1.807	ND	ND
肝臓	12.34	30.31	63.31	10.37	6.79	16.91	23.23	65.65	20.41	3.842
腎臓	5.726	10.2	20.29	ND	ND	6.507	13.36	11.36	3.616	ND
生殖腺	ND	1.965	2.697	ND	ND	5.063	7.628	7.881	4.168	12.78
甲状腺	12.93	4.999	62.86	ND	78.66	5.394	ND	ND	19.98	68.8
副腎	33.52	12.4	24.69	28.2	61.19	12.11	13.32	10.42	11.88	35.64

表 3-2 1000 mg/kg で投与後のラットにおける臓器・組織中分布 (投与量に対する割合；%)

投与後 時間	雄					雌				
	0.5	1	4	12	30	0.5	1	4	12	30
残体	0.377	0.436	0.536	0.604	0.241	0.350	0.349	0.570	2.397	0.733
血漿	0.056	0.073	0.131	<0.001	ND	0.024	0.050	0.156	<0.001	ND
血液	0.048	0.090	0.134	ND	ND	<0.001	<0.001	0.084	<0.001	ND
眼	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.001
骨	0.003	0.003	0.017	ND	ND	ND	0.003	0.003	ND	ND
脳	<0.001	ND	ND	ND	ND	0.003	ND	ND	ND	ND
脂肪	ND	ND	0.032	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
筋肉	0.132	0.088	0.224	ND	ND	0.031	0.066	0.150	ND	ND
心臓	0.003	<0.002	0.004	ND	ND	ND	0.002	0.002	<0.001	ND
肺	0.004	0.003	0.007	ND	ND	<0.029	0.002	0.002	<0.001	ND
脾臓	<0.001	ND	0.002	ND	ND	ND	<0.001	<0.001	ND	ND
肝臓	0.047	0.140	0.245	0.058	0.038	0.054	0.098	0.233	0.079	0.017
腎臓	0.006	0.009	0.018	ND	ND	0.005	0.011	0.010	0.004	ND
生殖腺	ND	0.003	0.003	ND	ND	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
甲状腺	<0.001	<0.001	<0.001	ND	<0.001	<0.001	ND	ND	<0.001	<0.001
副腎	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	ND	ND	0.001

【結論】

- ホラムスルフロンを投与後、血中濃度は速やかに上昇し、10 mg/kg 投与では 0.5～1 時間後に、1000 mg/kg 投与では 4 時間後に最高濃度に達した。
- 血中からの放射能の消失は比較的速やかであった。
- 臓器・組織への分布も速やかであり、いずれの投与量でも投与 30 分後にはほとんど全ての臓器・組織から放射能が検出された。
- 10 mg/kg 投与では大部分の臓器・組織における濃度は雄で 0.5～1 時間後、雌で 1 時間後に最高濃度に達した。雌雄いずれでも肝臓で最高濃度が検出され、腎臓における濃度も比較的高かった。雌雄いずれでも投与 30 時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で最高濃度の 1/10 未満となった。
- 1000 mg/kg 投与では大部分の臓器・組織における濃度は雌雄いずれでも 4 時間後に最高濃度に達した。投与 30 時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で定量限界未満となった。

1. 動物における動態と代謝試験

(5) ラットにおける代謝

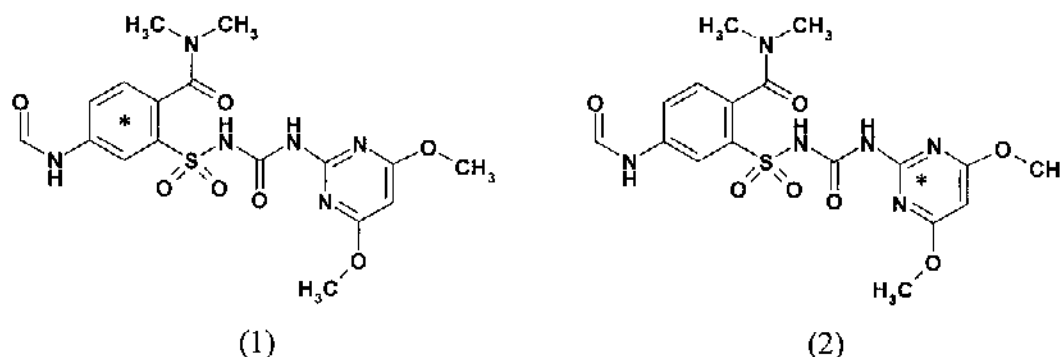
(運命資料 5)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

	(1)	(2)
標識：	[フェニル(Phc)-UL- ¹⁴ C]	[ピリミジン(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：		
放射化学的純度：		

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 動物

約6.5週齢(体重139~178 g)のSDラット(CRL:CD(SD)BR)を用いた。動物を受領後、5~6日間馴化した後に投与懸濁液(1%トラガカントゴム溶液で調製)を投与した。

2. 試験群

それぞれの試験群のラットに所定量(低用量では 10 mg/kg bw、高用量では 1000 mg/kg bw)のホラムスルフロンを単回経口投与した。

フェニル標識の試験ではいずれの投与用量でも雌雄各4匹のラットを用い、ピリミジン標識の試験では雌雄各2匹のラットを用いた。フェニル標識体は動物代謝2、ピリミジン標識体は動物代謝1の動物と同一であり、それぞれの試験で採取した尿及び糞を用いた。

3. 試料採取

放射能標識ホラムスルフロンを投与後、ラットを個別に代謝ケージに收容し、尿及

び糞を各動物から採取した。尿は投与後 6、12、24、48 及び 72 時間後に採取し、糞は投与後 24、48 及び 72 時間後に採取した。

4. 分析

(1) 放射エネルギーの測定

尿及びケージ洗浄液等の液体試料は液体シンチレーションカウンター(LSC)で直接、放射能を測定した。糞は水及びアセトニトリル(2 回)で抽出した後、抽出液に含まれる放射エネルギーを LSC で放射能を測定した。

(2) 代謝物の分析

尿

フェニル標識体投与では、それぞれのラットから採取した尿を採取時間あるいは性別に混合した後、直接あるいは抽出後に薄層クロマトグラフィー(TLC)及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。

ピリミジン標識体投与では、それぞれのラットから採取した尿を混合せずに個体ごとに直接 HPLC で分析した。

糞

フェニル標識体投与では、それぞれのラットから採取した糞を採取時間あるいは性別に混合・均質化後、遠心分離により水性上澄み液と繊維質を得た。上澄み液は C18 固相抽出カラムで精製し、アセトニトリル及びメタノールで溶出した。繊維質はアセトニトリル(2 回)で抽出した。両抽出液を混合し、濃縮後、TLC 及び HPLC で分析した。

ピリミジン標識体投与ではそれぞれのラットから採取した試料をそのまま用いた。

【結果】

1. 排泄(表 1)

放射能の回収は投与量の 96~98%と回収は良好であり、いずれの試験群においても投与量がほぼ定量的に尿及び糞から回収された。雌雄あるいは投与用量によらず主要排泄経路はいずれの場合も糞であり、投与放射能の大部分が糞から回収され(85~94%)、尿中排泄量は少なかった(4~11%)。

表 1 排泄物及び動物体における放射能残留 (投与量に対する割合%)

試験群	低用量		高用量		低用量	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
投与用量 (mg/kg bw)	10		1000		10	
標識位置	Phe		Phe		Pyr	
屠殺時間	72 h		72 h		72 h	
尿	5.066	5.816	1.303	1.456	9.169	9.353
ケージ洗浄液	0.244	0.310	0.063	0.088	0.212	0.146
糞	89.97	89.50	94.43	97.13	87.250	86.78
呼吸	NA	NA	NA	NA	0.018	0.016
動物体	0.003	0.010	0.003	0.009	<LOQ	<LOQ
合計	95.28	95.63	95.80	98.68	96.65	96.30

LOQ 定量限界、NA 採取・分析せず

2. 排泄物中代謝物(表 2)

雌雄あるいは投与用量の違いによらず、未変化の親化合物ホラムスルフロンの主要成分であった(投与量の約 75~80%)。先の試験で示されたように、ホラムスルフロンの吸収率が低いことから、大部分が未吸収のまま排泄されたと推定された。フェニル標識投与試験ではいずれの投与量でも [M01]及び [M02]の 2 成分が同定され、ピリミジン標識投与では [M01]のみが同定された。いずれの標識位置の投与でも未同定の高極性成分が検出されたが、その量は比較的少なかった。

尿中代謝物及び糞中代謝物を比較すると、尿中では未変化の親化合物ホラムスルフロンの割合は(尿中成分の 50%未満)、糞中での割合に比べて明らかに低く、吸収されたホラムスルフロンは代謝を速やかに受けることが示唆された。

代謝物の定性的あるいは定量的分布に雌雄による違いは認められず、投与用量による違いもほとんど認められなかった。

表 2 排泄物中における代謝物の分布(投与量に対する割合%)

投与用量	標識位置	採取時間	投与量に対する割合 (%)					
			10 mg/kg		1000 mg/kg		10 mg/kg	
性			Phe		Phe		Pyr	
			0~72 時間		0~72 時間		0~24 時間	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌
ホラムスルフィン	合計		75.722	74.465	80.789	78.161	75.272	76.370
	尿		1.723	2.128	0.429	0.429	2.068	2.989
	糞		73.999	72.337	80.360	77.732	73.204	73.381
	合計							
	尿							
	糞							
	合計							
	尿							
	糞							
合計			87.419	85.631	91.094	88.457	81.776	82.452

ND 検出されず

NA ベンゼン環を含まない

【結論】

- 尿あるいは糞からホラムスルフィン及び [M01]及び [M02]の 3 成分が同定された。雌雄あるいは投与用量の違いによらず、排泄物中の主要成分は未変化の親化合物ホラムスルフィンであり、未吸収のまま糞中に排泄されたと推定された。
- 代謝物の定性的あるいは定量的分布に雌雄による違いは認められず、投与用量による違いもほとんど認められなかった。

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

推定代謝経路を以下に示す。

図 ホラムスルフロンのラットにおける推定代謝経路

1. 動物における動態と代謝試験

(6) ラットにおける臓器・組織への分布及び消長

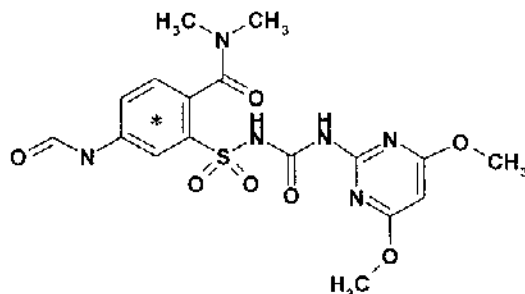
(運命資料 6)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 動物

体重112～142 gのSDラット(CRL(IGS) CD BR)を用いた。動物を受領後、6日間馴化した後投与を開始した。

2. 試験群(表 1)

1群雌雄3匹ずつのラットを4群用いた。それぞれの試験群のラットに1%トラガカントゴム溶液に懸濁したホラムスルフロンを10 mg/kg bwの用量で1日1回経口投与した。各試験群の構成、投与回数、調査項目、採取時間を以下に示す。放射能標識ホラムスルフロンを投与開始後、ラットを個別にケージに収容した。

表 1 試験群及び各試験群における調査項目

試験群	投与経路	投与用量	投与期間	性及び匹数	屠殺時間	採取試料
1	経口	10 mg/kg bw	1日	雌雄各3	最終投与 24時間後	臓器/組織
2			9日			
3			14日			
4			14日		最終投与	排泄物及び

					48 時間後	臓器/組織
--	--	--	--	--	--------	-------

3. 試料採取

臓器・組織

表 1 に示す通り、試験群 1~3 では最終投与 24 時間後、試験群 4 では最終投与 48 時間後にラットを屠殺し、血液及び以下の臓器・組織を採取した。血液は採取後、遠心分離し、血漿を得た。

採取した臓器及び組織：肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、精巣または卵巣、眼、副腎、骨、脂肪(腎周囲)、皮膚、甲状腺、残体、胃腸管と内容物

排泄物

14 日間の反復投与後、直ちにラット(雌雄各 3 匹)を代謝ケージに移し、尿及び糞を別々に採取した。尿は最終投与 6、12、24(雌のみ)及び 48 時間後に採取し、糞は 24(雌のみ)及び 48 時間後に採取した。

4. 分析

(1) 放射エネルギーの測定

尿及び血漿は液体シンチレーションカウンター(LSC)で直接または必要に応じて希釈後に放射エネルギーを測定した。

糞は 10 倍量の水に希釈後、均質化した後、その一部 500 µL に細胞溶解液(1 mL)を加えて溶解した。この溶液を酸性化した後に LSC で放射エネルギーを測定した。

骨及び血液はオキシダイザーで燃焼後、LSC で放射エネルギーを測定した。

副腎、眼、卵巣、甲状腺、筋肉及び脂肪は細胞溶解液に溶解後、LSC で放射エネルギーを測定した。

胃腸管及び残体は水酸化ナトリウムを用いて溶解後、酢酸で酸性化した後に LSC で放射エネルギーを測定した。

ケージ洗浄液及びその他の臓器・組織は水中で均質化した後、溶解し、LSC で放射エネルギーを測定した。

(2) 代謝物の分析

尿

直接高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。

糞

雌では個体毎、雄では各採取時間ごとに混合した後、均質化した。その後、均質化した糞を水及びアセトニトリル(2 回)で抽出した。

水抽出液を C18 固相抽出カラムで精製し、固相抽出カラムからのアセトニトリルあるいはメタノール溶出液を混合した後、アセトニトリル抽出液と混合し、濃縮後、HPLC で分析した。

【結果】

1. 排泄(表 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。

14 日間の反復投与後、最終投与から 48 時間後までに尿及び糞に雌雄それぞれ総投与量(14 回の合計)の 9.2%(雌)及び 6.5%(雄)が排泄された。

最終投与から 48 時間後までの放射能回収量(排泄物中の放射エネルギー及びケージ洗浄液中の放射エネルギーならびに屠殺時の動物体中の放射エネルギーの含量)に対して算出すると、尿中排泄割合は雄で約 12%、雌で約 7%であり、糞中排泄割合は雄で約 61%、雌で約 89%であった。雄では消化管を含む残体中から約 25%が回収され、この大部分は未排泄の糞と推定され、14 回反復投与後においても糞が主要排泄経路であった。先の試験(動物代謝 2)で認められた単回投与後の尿及び糞への排泄割合と 14 回反復投与後の尿及び糞への排泄割合は同等であった。

表 1 14 日間反復投与後の排泄物及び動物体における放射能残留
(回収量に対する割合%)

投与期間	14 日		1 日*	
	48 時間		72 時間	
屠殺時間(最終投与後)				
性	雄	雌	雄	雌
尿	11.530	7.415	5.32	6.08
ケージ洗浄液	2.262	0.484	0.26	0.32
糞	60.986	88.841	94.42	93.58
残体及び胃腸管	24.517	3.123	0.00	0.01
臓器・組織	0.704	0.139		

* 試料番号：動物代謝 2 のデータ。

2. 臓器・組織中放射能濃度の経時変化(表 2)

単回投与 24 時間後に採取した臓器・組織中の放射能濃度は雌雄いずれでも低かった。雌雄いずれでも肝臓で最高濃度が検出され、次いで腎臓あるいは皮膚における濃度が高かった。

9 回あるいは 14 回の反復投与後にも、大部分の臓器・組織でその放射能濃度は単回投与の場合に比べてほとんど増加しなかったが、肝臓では投与回数増加に伴い、僅かに増加した。しかし、肝臓における増加も投与回数に比例せず、14 回投与後においても単回投与に比べ雄で約 3 倍、雌で約 2 倍程度の増加となった。従って、ホラムスルフロンあるいはその代謝物が臓器・組織に蓄積する可能性はほとんど考えられなかった。

表2 ホラムスルフロンを複数回投与後の臓器・組織中濃度 (mg/kg)

臓器・組織*	雄			雌		
	投与期間			投与期間		
	1日	9日	14日	1日	9日	14日
皮膚#	0.022	0.014	0.042	0.026	0.043	0.166
血漿	0.017	0.014	0.019	0.015	0.016	0.021
血液	0.012	0.009	0.012	0.012	0.011	0.014
眼	0.002	0.002	0.003	0.002	0.003	0.005
脳	0.001	0.000	0.020	0.003	0.001	0.008
脂肪(腎)	0.004	0.003	0.012	0.019	0.008	0.013
心臓	0.002	0.000	0.013	0.004	0.002	0.019
肺	0.008	0.004	0.019	0.006	0.006	0.022
脾臓	0.004	0.008	0.009	0.005	0.006	0.016
肝臓	0.079	0.182	0.222	0.114	0.184	0.280
腎臓	0.021	0.017	0.027	0.048	0.022	0.026
甲状腺	0.002	0.004	0.020	0.001	0.005	0.002
卵巣	-		-	0.003	0.005	0.003
精巣	0.005	0.005	0.073	-		-
副腎	0.001	0.001	0.003	0.002	0.004	0.003
筋肉	0.018	0.006	0.008	0.011	0.015	0.014
骨	0.009	0.013	0.012	0.009	0.033	0.019

* 最終投与 24 時間後に屠殺し、採取した。

尿による汚染の可能性有り。

3. 反復投与後の排泄物中代謝物分布(表 3)

14 日間の反復投与後においても、未変化の親化合物ホラムスルフロンが主要成分であった。先の試験の単回投与の場合と同様に、ホラムスルフロンの吸収率が低いことから、大部分が未吸収のまま排泄されたと推定された。単回投与の場合と同様に、ホラムスルフロン以外に [M01]及び [M02]の 2 成分が同定された。排泄物中の代謝物の定性的及び定量的分布に投与回数による違いは認められなかった。

表3 14日間反復投与後の排泄物中における代謝物の分布
(最終投与量に対する割合%)

投与期間		14日		1日*	
屠殺時間(最終投与後)		48時間		72時間	
性		雄	雌	雄	雌
ホラムスルフロン	合計	68.30	103.33	75.722	74.465
	尿	4.00	5.27	1.723	2.128
	糞	64.30	98.06	73.999	72.337

* 試料番号：動物代謝2のデータ。

【結論】

- ホラムスルフロンを9回あるいは14回の反復投与後にも、大部分の臓器・組織でその放射能濃度は単回投与の際に比べてほとんど増加しなかったが、肝臓では投与回数増加に伴い、僅かに増加した。肝臓における増加も投与回数に比例せず、14回投与後においても単回投与に比べ雄で約3倍、雌で約2倍程度の増加となった。従って、ホラムスルフロンあるいはその代謝物が臓器・組織に蓄積する可能性はほとんど考えられなかった。
- 14回反復投与後の尿及び糞への排泄割合は、単回投与後の尿及び糞への排泄割合と同様であり、糞が主要排泄経路であった。
- 14日間の反復投与後においても、未変化の親化合物ホラムスルフロンが主要成分であった。単回投与の場合と同様に、ホラムスルフロン以外に [M01]及び [M02]の2成分が同定された。排泄物中の代謝物の定性的及び定量的分布に投与回数による違いは認められなかった。

2. 土壌における運命

(1) 好気土壌中における分解(25°C)

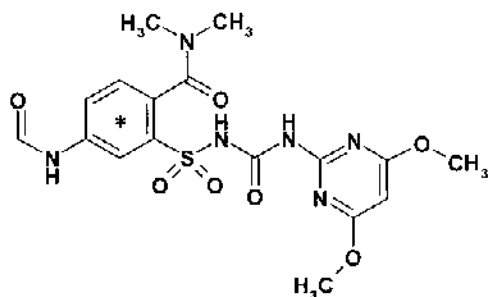
(運命資料7)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

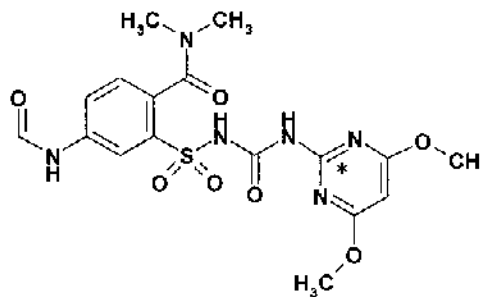
供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



(1)



(2)

*：標識部位

	(1)	(2)
標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]	[ピリミジン(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：		
放射化学的純度(HPLC 及び TLC)：		

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 土壌(表 1)

米国ノースカロライナ州 Pikeville のアベンティス社圃場の表層(0~20 cm)から採取した土壌を用いた。供試土壌の性質を下表に示す。被験物質を添加する前に 2 mm の篩を通した。

表 1 供試土壌

名称	採取地	土性 (USDA)	pH		OC%
			H ₂ O	CaCl ₂	
Maquoeta	米国アイオワ州	シルト質埴壤土	7.5	7.2	1.73
Pikeville	米国ノースカロライナ州	壤質砂土	7.3	6.2	0.46

2. 処理量及び処理

想定最大施用量(60 g a.i./ha)に基づき、処理濃度を 0.069 ppm に設定した (土壌深 7.5 cm、土壌の仮比重 1.16 g/cm³ で算出)。

土壌 50 g(乾土)を三角フラスコに秤量後、蒸留水を添加して水分含量を 1/3 バールでの含水量の約 75%に調製した。

恒温条件(25℃)の暗所で少なくとも 2 日間前培養した後、[Phe-UL-¹⁴C]あるいは[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンのアセトニトリル溶液を 1 容器(土壌 50 g)につきそれぞれ 250 μL 添加した。

3. 培養条件及び試料採取

処理後、三角フラスコに揮発性有機物吸収用のエチレングリコールと CO₂ 吸収用のエタノールアミン(または水酸化ナトリウム水溶液)を入れた捕集容器を連結した後、暗黒下、25℃で培養した。

培養 3、8、14、21、30、63、90、126、188、279、290 及び 366 日後に[Phe-UL-¹⁴C]及び[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加した容器をそれぞれ 1 反復採取した。処理直後の試料については各標識位置・土壌について 2 反復で採取した。

エチレングリコール及びエタノールアミン(または水酸化ナトリウム水溶液)を入れた捕集容器は土壌を分析する際に容器から取り外して放射エネルギー測定試料とした。

4. 抽出、放射エネルギー測定、分析

1) 揮発性有機化合物及び ¹⁴CO₂

捕集容器中のエチレングリコールを液体シチシレーションカウンター(LSC)で直接測定し、揮発性有機化合物の量を調べた。

捕集容器中のエタノールアミン(または水酸化ナトリウム水溶液)を LSC で測定し、¹⁴CO₂の量を調べた。

2) 土壌

抽出(図 1)

容器内の土壌全量を遠沈管に移した後、ミキサーを用いてアセトニトリル/水/0.1M 酢酸アンモニウムの混液(7/3/0.01、v/v/v)で 2~4 回抽出した(室温)。各回の抽出後、遠心分離により抽出液と土壌残留物を分離した。抽出液を混合後、体積を測定した後、その一部を LSC で放射エネルギー測定した。

処理 279、290 及び 366 日後の試料については、抽出後の土壌残留物を更に水及びアセトンでそれぞれ 1 回抽出した(室温)。それぞれの抽出後、遠心分離により上清を得、それぞれの体積を測定した後、その一部を LSC で放射エネルギー測定した。また、処理 279 日後の試料については、更にアセトニトリル/水/0.1M 酢酸アンモニウムの混液(7/3/0.01、v/v/v)で加熱還流抽出し、ソックスレー抽出液を得た。

抽出後の土壌残留物は、風乾後、磨砕均質化した後、燃焼分析した。

また、放射エネルギーの腐植画分への分布を調べることを目的として、処理 188 日後の抽出後の土壌残留物を用いて腐植画分中における分布を調べた。

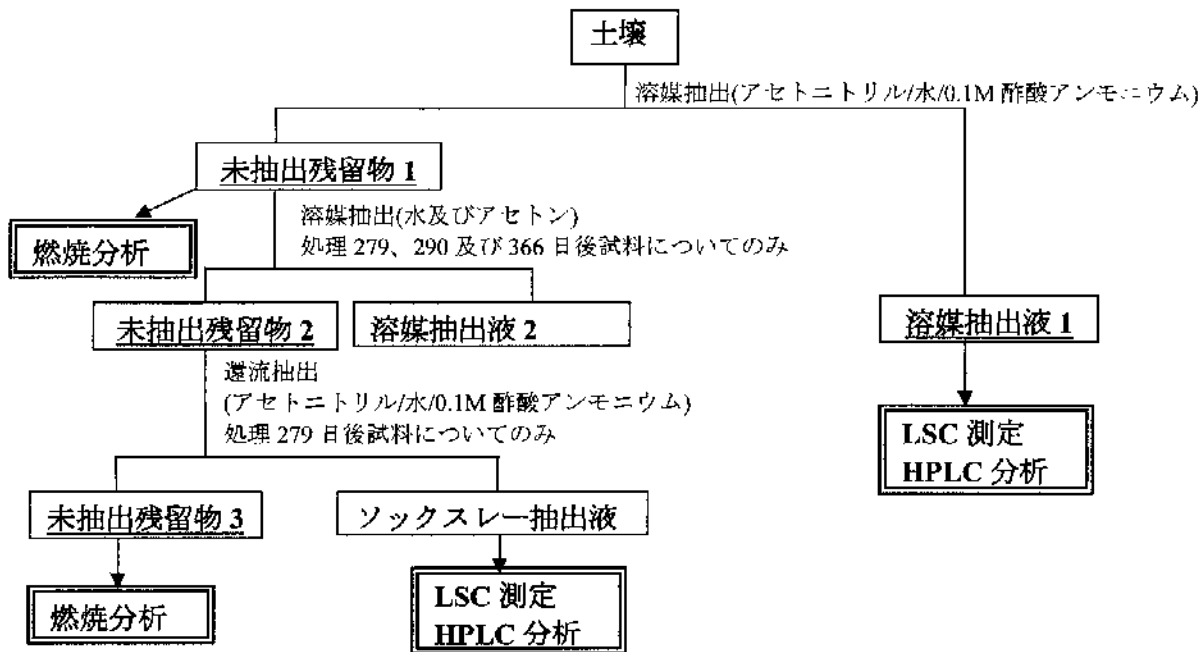


図 1 土壌の抽出及び分画法

【結果】

1. 物質収支、放射能の分布、被験物質の消長及び分解物の生成/消長(表 2～5)

ベンゼン環標識(表 2～3)

[Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壌からの放射能の回収は Maquoeta 土壌で平均 98%(79～104%)、Pikeville 土壌で平均 96%(76～104%)であった。いずれにおいても、抽出可能な放射エネルギーは速やかに減少し、それに伴い未抽出残留物の量が増加した。未抽出残留物の量はいずれの土壌でも処理 188 日後に最大に達した(処理量の約 88%)。処理 279 日後以降の試料については、通常溶媒抽出後に更に水及びアセトンで抽出しても、それらにより抽出された放射能は通常溶媒抽出された放射能と同程度であった。ソックスレー抽出により抽出された放射エネルギーも少なかった。二酸化炭素の生成量はいずれの土壌でも約 1%と少なく、揮発性有機化合物の生成は認められなかった。処理 279 日後以降の試料で回収率が 90%を下回ったが、これは抽出後の土壌を風乾後燃焼分析まで最大 3 ヶ月間室温に保管したことにより未抽出残留物の一部が揮発性物質へと無機化されたことによると推定された。回収率の低下は 279 日目以降の未抽出性残留物に限定され、試験結果全体には大きな影響を及ぼさなかったと考えられる。

表 2 [Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンの処理後の放射能抽出及び分布

(Maquoeta 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
抽出液	合計	99.7	71.6	59.3	41.3	35.4	31.2	22.1	18.6	13.6	10.3	16.2	13.4
未抽出残留物		2.2	29.8	43.3	60.0	67.4	71.0	78.6	84.6	85.2	87.4	68.0	79.8
二酸化炭素		NA	0	0	0	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.6	0.8
合計		101.9	101.4	102.6	101.3	102.8	102.3	100.9	103.5	99.2	98.3	84.8	94.0

NA 測定せず

表3 [Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の放射能抽出及び分布

(Pikeville 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]		0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
抽出液	合計	101.5	76.9	59.7	49.6	39.5	30.9	19.9	17.1	10.8	7.9	23.2	11.2	7.6
	溶媒													
	水+アセトン													
	ソックスレー													
未抽出残留物	0.2	23.1	41.4	50.1	64.2	71.1	82.4	83.3	82.8	88.3	66.6	76.2	82.4	
二酸化炭素	NA	0	0	0	0	0.1	0.3	0.4	0.7	0.9	1.2	1.0	1.1	
合計	101.7	100.0	101.1	99.7	103.7	102.1	102.6	100.8	94.3	97.1	91.0	88.4	91.2	

NA 測定せず

ピリミジン環標識(表4~5)

[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壌からの放射能の回収は Maquoeta 土壌で平均 97%(79~104%)、Pikeville 土壌で平均 93%(73~103%)であった。いずれの土壌においても、抽出可能な放射エネルギーは速やかに減少し、それに伴い未抽出残留物の量が増加した。未抽出残留物の量は処理 60~120 日後に最大に達した(Maquoeta 土壌で処理量の約 75%、Pikeville 土壌で処理量の約 56%)。処理 279 日後以降の試料については、通常の溶媒抽出後に更に水及びアセトンで抽出したが、水あるいはアセトンで抽出された放射エネルギーは通常溶媒により抽出された放射エネルギーより少ない程度であった。一方、ソックスレー抽出により抽出された放射エネルギーは比較的多く、処理量の 16%及び 20%程度が抽出された。二酸化炭素の生成量はベンゼン環標識より明らかに多く、最大で 12%(Maquoeta 土壌)及び 22%(Pikeville 土壌)検出された。揮発性有機化合物の生成量は少なく、処理量の 1%未満であった。

処理 279 日後以降の試料で回収量が 90%を下回ったが、これは抽出後の土壌を風乾後燃焼分析まで最大 3 ヶ月間室温に保管したことにより未抽出残留物の一部が揮発性物質へと無機化されたことによると推定された。回収率の低下は 279 日目以降の未抽出性残留物に限定され、試験結果全体には大きな影響を及ぼさなかったと考えられる。

表4 [Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の放射能抽出及び分布

(Maquoeta 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]		0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
抽出液	合計	99.0	80.8	65.2	51.7	40.5	38.9	25.7	21.0	15.3	11.8	29.6	12.6	12.5
	溶媒													
	水+アセトン													
	ソックスレー													
未抽出残留物	2.2	22.2	38.7	51.3	56.2	61.4	68.8	75.0	74.5	75.8	46.1	57.8	63.2	
二酸化炭素	NA	0	0	0	0	1.3	3.6	6.2	8.7	11.7	7.1	8.0	11.5	
揮発性有機化合物	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0	
合計	101.2	103.0	103.9	103.0	96.7	101.6	98.1	102.2	98.5	99.3	82.9	78.5	87.2	

NA 測定せず

表5 [Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の放射能抽出及び分布
(Pikeville 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]		0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
抽出液	合計	102.6	79.5	59.2	50.3	45.8	42.2	31.6	30.1	21.2	17.3	33.7	9.6	10.1
	溶媒													
	水+アセトン													
	ソックスレー													
未抽出残留物	0.1	22.6	41.8	50.7	54.4	55.1	55.5	55.7	54.4	54.5	25.7	42.9	47.2	
二酸化炭素	NA	0	0	0	0	4	8.3	11.4	18.8	16.8	16.4	20.4	21.5	
揮発性有機化合物	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	
合計	102.7	102.1	101.0	101.0	100.2	101.3	95.4	97.2	94.4	88.6	75.8	73.0	78.9	

NA 測定せず

2. 被験物質の消長及び分解物の生成/消長(表6~9)

ベンゼン環標識(表6~7)

[Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後、親化合物ホラムスルフロンは速やかに分解し、いずれの土壌でもホラムスルフロンは処理14日後には約50%以下にまで減少した。

[M01]は処理3日後に約10%検出されたが、比較的速やかに減少し、処理14日以降5%未満で推移した。 [M02]及び

[M03]も同定されたが、いずれも少なく処理量の5%を超えることはなかった。その他、高極性の未同定代謝物が複数検出されたが、単一で処理量の3.2%を上回る成分は認められなかった。

表6 [Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の被験物質及び分解物の消長
(Maquoeta 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
溶媒抽出液1	99.7	81.0*	59.3	41.3	35.4	31.2	22.1	18.6	13.6	10.3	6.9	8.7	6.9
ホラムスルフロン	96.9	68.0*	44.2	36.0	35.2	25.5	16.2	14.2	8.6	5.0	NA	2.8	1.9

ND 検出せず、NA 分析せず

*2反復分析の一方の容器の結果

表7 [Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の被験物質及び分解物の消長
(Pikeville 土壌、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
溶媒抽出液1	101.5	79.2*	59.7	49.6	39.5	30.9	19.9	17.1	10.8	7.9	8.6	7.0	4.8
ホラムスルフロン	96.6	62.7*	47.5	40.6	30.3	23.7	12.3	8.2	5.2	2.8	NA	1.9	0.8

ND 検出せず、NA 分析せず

*2反復分析の一方の容器の結果

ピリミジン環標識(表 6~7)

[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後、親化合物ホラムスルフロンは速やかに分解し、いずれの土壤でもホラムスルフロンは処理 14 日後には約 50%以下にまで減少した。

[M01]は処理 3 日後に最大量(10%未満)検出されたが、比較的速やかに減少し、処理 14 日以降 5%未満で推移した。 [M01]以外には

[M04]も同定された。 [M04]は Maquoeta 土壤では少なく、最大で 5%程度であったが、Pikeville 土壤では処理 30 日以降 10%を超える量で検出された。

[M04]も増加後、試験終了時までには減少した。

表 8 [Pyr-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の被験物質及び分解物の消長
(Maquoeta 土壤、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
溶媒抽出液 1	99	80.8	65.2	51.7	40.5	38.9	25.7	21	15.3	11.8	7.8	7.9	6.8
ホラムスルフロン	96.9	74.4	62.7	49.7	34	33.3	17.7	15.6	9.4	4.1	NA	2.1	1.4

ND 検出せず、NA 分析せず
* 2 反復分析の一方の容器の結果

表 9 [Pyr-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の被験物質及び分解物の消長
(Pikeville 土壤、処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	3	8	14	21	30	63	90	126	188	279	290	366
溶媒抽出液 1	102.6	79.5	59.2	50.3	45.8	42.2	31.6	30.1	21.2	17.3	12.0	6.5	8.1
ホラムスルフロン	99.6	71.5	46.2	37.3	31.7	24.0	11.3	11.1	4.7	3.2	NA	2.0	ND

ND 検出せず、NA 分析せず
* 2 反復分析の一方の容器の結果

3. ソックスレー抽出液中成分の同定(表 10)

処理 279 日後の土壤について、通常の溶媒抽出及び水ならびにアセトン抽出後の土壤をソックスレーで加熱還流抽出すると、ベンゼン環標識処理後の Maquoeta 土壤及び Pikeville 土壤からそれぞれ処理量に対して 3.2%及び 12.2%が回収され、ピリミジン環標識処理後の Maquoeta 土壤及び Pikeville 土壤からそれぞれ処理量に対して 16.2%及び 20.1%が回収された。このソックスレー抽出画分を HPLC で分析した所、未変化のホラムスルフロンは検出されず、

[M02]及び [M03]あるいは [M04]のみが検出された。
一方、未変化のホラムスルフロンをソックスレーで加熱還流すると、ホラムスルフロンは完全に加水分解し、 [M02]及び [M04]が検出されることが知られている。従って、ソックスレー抽出後に検出された AE F153745[M02]及び [M03]あるいは AE F092944[M04]は、親化合物ホラムスルフロンあるいは

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。

[M01]の分解により検出された可能性が推定された。

表 10 ソックスレー抽出液中の分解物の分布 (処理 279 日後土壌、処理量に対する割合%)

標識位置	土壌	ソックスレー抽出液			
Phe	Maquoeta 土壌	3.2			
	Pikeville 土壌	12.2			
Pyr	Maquoeta 土壌	16.2			
	Pikeville 土壌	20.1			

4. 未抽出残留物の特徴付け(表 11)

処理 188 日後の抽出後の土壌の未抽出残留物を特徴付けるため、0.25M 塩酸で抽出後に腐植の画分化法に従い分画した結果を下表に示す。

0.25M 塩酸で抽出可能な放射エネルギーは少なかったが、その後の腐植酸への画分化における 0.5M 水酸化ナトリウム処理により、未抽出放射能の約 40~70%が可溶化した(フルボ酸画分と腐植酸画分の合計)。いずれの標識位置でも Maquoeta 土壌ではヒューミン画分中の放射エネルギーが比較的多かった。

表 11 未抽出(結合性)残留物の特徴付け (処理 188 日後土壌、処理量に対する割合%)

標識位置	土壌	未抽出残留物	0.25M 塩酸	フルボ酸画分	腐植酸画分	ヒューミン画分
Phe	Maquoeta 土壌	87.4	1.5	16.7	18.5	41.4
	Pikeville 土壌	88.3	6.7	25.0	35.3	18.6
Pyr	Maquoeta 土壌	75.8	1.1	17.2	14.8	39.9
	Pikeville 土壌	54.5	4.7	13.9	17.0	17.7

3. 被験物質の分解速度(表 12)

両標識位置の分析値から求めたホラムスルフロンの半減期は Maquoeta 土壌で 12.7 日、Pikeville 土壌で 10.3 日であった。

表 12 ホラムスルフロンの半減期及び 90%減期(日)

土壌	半減期(DT ₅₀)	90%減期(DT ₉₀)
Maquoeta 土壌	12.7	42.1
Pikeville 土壌	10.3	34.1

4. ホラムスルフロンの推定分解経路

ホラムスルフロンの推定分解経路を図 2 に示す。

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。

図2 ホラムスルフロンの好気条件土壌における推定分解経路

2. 土壌における運命

(2) 嫌気土壌中における分解(25°C)

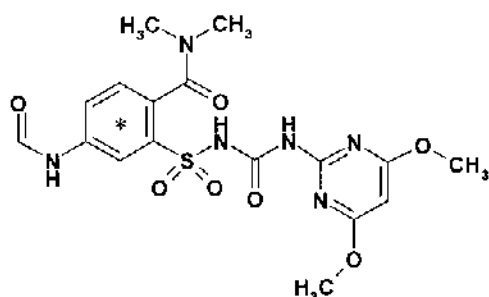
(運命資料 8)

報告書作成年：1999年 [GLP対応]

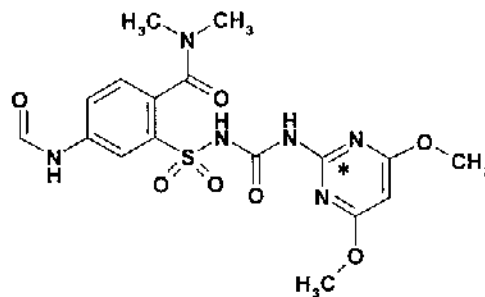
供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



(1)



(2)

*：標識部位

	(1)	(2)
標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]	[ピリミジル(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：		
放射化学的純度(HPLC 及び TLC)：		

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 土壌(表 1)

英国 Bedfordshire Shuttleworth のライシメーターから採取した土壌を用いた。供試土壌の性質を下表に示す。被験物質を添加する前に 2 mm の篩に通した。

表 1 供試土壌

名称	採取地	土性 (USDA)	pH		OC%
			H ₂ O	CaCl ₂	
Shuttleworth	英国 Bedfordshire	砂壤土	5.7	5.2	2.28

2. 処理量及び処理

想定最大施用量(90 g a.i./ha)に基づき、処理濃度を 0.092 ppm に設定した (土壌深 7.5 cm、土壌の仮比重 1.3 g/cm³ で算出)。土壌 50 g(乾土)を三角フラスコに秤量後、湛水深 1 cm となるように脱イオン水を添加した。

還元条件の達成を容易にするためにアルファアルファの粉を加えた後、窒素気流を通し

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

ながら恒温条件(20°C)の暗所で 12 日間前培養した。[Phe-UL-¹⁴C]あるいは[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンのアセトニトリル溶液を 1 容器(土壌 50 g)につきそれぞれ 364 μL あるいは 388 μL 添加した。

3. 培養条件及び試料採取

三角フラスコには揮発性有機物吸収用のエチレングリコールと CO₂ 吸収用のエタノールアミンを入れた捕集容器を連結した後、窒素気流を通しながら、暗黒下、20°C で培養した。培養 2、8、14、28、56、92 及び 128 日後に[Phe-UL-¹⁴C]及び[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加した容器をそれぞれ 1 反復採取した。処理直後の試料については各標識位置について 2 反復で採取した。前培養終了時から培養 128 日後の土壌の Eh は-3~79 の範囲で推移した。

エチレングリコール及びエタノールアミン(または水酸化ナトリウム水溶液)を入れた捕集容器は土壌を分析する際に容器から取り外して放射エネルギー測定試料とした。

4. 抽出、放射エネルギー測定、分析

1) 揮発性有機化合物及び ¹⁴CO₂

捕集容器中のエチレングリコールを液体シチシレーションカウンター(LSC)で直接測定し、揮発性有機化合物の量を調べた。

捕集容器中のエタノールアミン(または水酸化ナトリウム水溶液)を LSC で測定し、¹⁴CO₂ の量を調べた。

2) 水及び土壌

水

傾斜法により水を上層水を遠沈管に移し、遠心分離後(1762 G で 10 分)、上清を採取した。体積を測定後、放射エネルギーを LSC で測定した。

土壌

容器内の土壌全量を遠沈管に移した後、125 mL のアセトニトリル/水/0.1M 酢酸アンモニウムの混液(7/3/0.01、v/v/v)で 2~4 回抽出した(室温)。各回の抽出後、遠心分離により抽出液と土壌残留物を分離した。抽出液を混合後、体積を測定し、その一部を LSC で放射エネルギー測定した。処理 28 日後の試料については、抽出後の土壌残留物を更に水で 1 回抽出した(室温)。

抽出後の土壌残留物は、風乾後、磨砕均質化した後、燃焼分析した。

上記のようにして得られた表層水及び抽出液を濃縮後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及び薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

【結果】

1. 物質収支及び放射エネルギーの分布 (表 2~3)

ベンゼン環標識(表 2)

[Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壌からの放射エネルギーの回収率は 2 日後を除き良好であり、101~106%が試験系から回収された。2 日後の試料の回収率は低かったが、これは分析操作中に土壌試料を移す際に消失したためと考えられた。

表層水中の放射エネルギーは最初の 14 日間に徐々に減少し(0 日の 79%から 14 日後の 14%)、それに伴い土壌抽出液中及び未抽出残留物中の放射エネルギーは増加した(0 日の 25%から

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。

14日後の78%及び10%)。14日後以降、未抽出残留物中の放射エネルギーが増加し、128日後には約19%となった。

揮発性有機物の生成は認められず、二酸化炭素もほとんど生成しなかった。

表2 [Phe-UL-¹⁴C]ホラムスルフロン処理後の放射能の分布 (処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	2	8	14	28	56	92	128
表層水	79.2	29.4	16.2	14.1	15.0	18.2	20.2	19.6
抽出液	24.9	51.2	76.1	77.5	75.8*	70.9	69.7	65.3
未抽出残留物	NA	4.4	9.1	9.6	10.2	12.3	16.4	19.3
二酸化炭素	NA	<0.05	<0.05	0.1	<0.05	0.1	0.1	<0.05
合計	104.1	85.1	101.4	101.4	101.1	101.5	106.4	104.3

* 水抽出放射エネルギーを含む

NA 測定せず

ピリミジル環標識(表3)

[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壌からの放射エネルギーの回収率は2日後を除き良好であり、103~108%が試験系から回収された。2日後の試料の回収率は低かったが、これは分析操作中に土壌試料を移す際に消失したためと考えられた。

表層水中の放射エネルギーは最初の14日間に徐々に減少し(0日の87%から14日後の15%)、それに伴い土壌抽出液中及び未抽出残留物中の放射エネルギーは増加した(0日の20%から14日後の81%及び9%)。14日後以降、未抽出残留物中の放射エネルギーが増加し、128日後には約23%となった。

揮発性有機物の生成は認められず、二酸化炭素もほとんど生成しなかった。

表3 [Pyr-2-¹⁴C] ホラムスルフロン処理後の放射能の分布 (処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	2	8	14	28	56	92	128
表層水	87.1	29.7	17.3	15.2	17.8	17.8	21.1	17.9
抽出液	20.1	52.9	79.6	80.9	75.3*	71.5	68.7	65.8
未抽出残留物	NA	4.4	9.7	8.7	10.2	13.8	17.8	23.1
二酸化炭素	NA	<0.05	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
合計	107.1	86.9	106.7	104.9	103.5	103.2	107.7	106.9

* 水抽出放射エネルギーを含む

NA 測定せず

2. 被験物質の消長及び分解物の生成/消長(表4~5)

ベンゼン環標識(表4)

ホラムスルフロンの分解は好気条件に比べ緩やかであり、128日後にも約62%が未変化の親化合物として残存していた。処理量の10%を超える成分は認められなかった。同定された代謝物は好気条件で検出された代謝物と共通していた。

表4 [Phe-UL-¹⁴C]: 被験物質及び分解物の消長 (処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	2	8	14	28	56	92	128
表層水+抽出液	104.2	80.6	92.2	91.7	89.7	89.1	89.9	84.9
ホラムスルフロン	92.7	69.6	82.7	81.0	78.5	78.1	70.9	61.7

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。

--	--	--	--	--	--	--	--	--

ND 検出せず

* 複数の成分から構成、単一ピークとしては最大で2.7%

ピリミジル環標識(表 5)

ホラムスルフロンの分解は好気条件に比べ緩やかであり、128 日後にも約 60%が未変化の親化合物として残存していた。処理量の 10%を超える成分は認められなかった。同定された代謝物は好気条件で検出された代謝物と共通していたが、好気条件で認められなかった [M08]が検出された。

表 5 [Pyr-UL-¹⁴C] : 被験物質及び分解物の消長 (処理量に対する割合%)

経過日数 [日]	0	2	8	14	28	56	92	128
表層水+抽出液	107.1	82.5	96.9	96.2	92.3	89.4	89.8	83.7
ホラムスルフロン	95.8	75.1	86.1	85.5	82.6	79.5	74.6	60.1

ND 検出せず

* 複数の成分から構成、単一ピークとしては最大で5.8%

3. 未抽出残留物の特徴付け分析

本試験では、未抽出残留物の特徴付けは実施しなかったが、いずれの標識位置においても分解経路が好気条件と類似していたことから、未抽出残留物についても好気条件と同様の分布をしていたと推察される。

4. 被験物質の分解速度

ホラムスルフロンの分解が一次速度式に従うと仮定し、両標識位置の分析値から求めたホラムスルフロンの半減期は 165 日であった。

5. ホラムスルフロンの推定分解経路

ホラムスルフロンの推定分解経路を図 1 に示す。ホラムスルフロンの分解は好気条件と同様に [M02]及び [M04]の生成あるいは [M01]の生成の 2 経路が主要分解経路であった。いずれの代謝物もアミンを有し、土壌構成成分との複合体を構成することが予想された。

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。

図1 ホラムスルフロンの嫌気条件土壌における推定分解経路

3. 水中運命試験

(1) 滅菌緩衝液中における加水分解

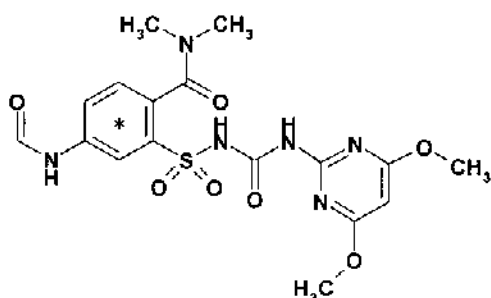
(運命資料 9)

報告書作成年：2000年 [GLP 対応]

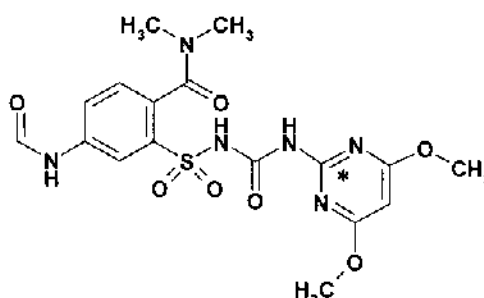
供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



(1)



(2)

*：標識部位

	(1)	(2)
標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]	[ピリミジル(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：		
放射化学的純度：		

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 試験系

試験溶液：pH 4 酢酸緩衝液(0.02M)

pH 5 酢酸緩衝液(0.02M)

pH 7 リン酸緩衝液(0.02M)

pH 9 ホウ酸緩衝液(0.02M)

試験濃度：5.0 ppm (Phe)及び 5.5 ppm (Pyr)

溶解助剤の種類及び濃度：アセトニトリル、1%

試験温度：25℃及び 40℃

2. 試験容器及び[1]の処理

クリンプキャップ付きの 25 mL 容の血清採取容器を試験容器に用いた。それぞれの pH の滅菌緩衝液 20 mL を試験容器に入れた。その後、シリンジを用いて各容器に処理溶液を 200 μL 加えた後、暗黒条件下、25℃あるいは 40℃に設定した恒温槽中

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。

でインキュベートした。

3. 試料採取及び分析

経時的に緩衝液を採取し、放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定した。薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いたコクロマトグラフィーで代謝物を同定した。また、代表試料については、質量分析(LC-MS あるいは LC-MS/MS)で分析し、コクロマトグラフィーによる同定を確認した。

【結果】

1. 被験物質及び分解物の消長

pH 4 の緩衝液における加水分解(表 2)

ホラムスルフロンは pH 4 の緩衝液中で加水分解を受けた。主要分解物はベンゼン環標識では [M02]、ピリミジル環標識では [M04]であった。
[M01]も検出されたが、少量であった。ベンゼン環標識では [M02] 以外に [M03]及び [M05]ならびに [M06] が検出された。

表 2 ホラムスルフロンの pH 4 における加水分解 (処理放射能に対する%)

条件	標識位置	成分	経過日数 (日)									
			0	1	2	3	4.1	5.1	7	8	9	10
pH 4、 25°C	Phc	ホラムスルフロン	97.1	81.8	67.1	57.1	46.1	39.7	27.1	22.1	19.3	15.8
pH 4、 25°C	Pyr	成分	経過日数 (日)									
			0	1	2	3	4.1	7.9	8.8	10.2		
		ホラムスルフロン	95.8	78.6	68.3	55.7	46.6	23.8	20.8	17.4		
pH 4、 40°C	Phc	成分	経過時間 (時)									
			0	6.6	8.5	10.3	12	16.9	21.6	27.3		
		ホラムスルフロン	95	60.5	55.1	48.2	42.2	29.7	22.4	15.5		
pH 4、 40°C	Pyr	成分	経過時間 (時)									
			0	2.2	4.2	6.3	8.1	10.3	12.1	20.4	22.6	25.6
		ホラムスルフロン	97.5	82.4	72.8	63.6	56.4	48.8	43.5	24.6	22	17.9

ND 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。

pH 5 の緩衝液における加水分解(表 3)

ホラムスルフロンは pH 5 の緩衝液でも pH 4 の緩衝液中と同様に加水分解を受けた。主要分解物はベンゼン環標識では AE F153745[M02]、ピリミジル環標識では [M04]であった。ベンゼン環標識では [M02]以外に [M03]及び閉環した [M05]ならびに [M02]以外に [M06]が検出された。

表 3 ホラムスルフロンの pH 5 における加水分解 (処理放射能に対する%)

条件	標識位置	成分	経過日数 (日)												
			0	1	2	3	4	7	9	12	14	19.2	21	28.2	30.3
pH 5、 25°C	Phe	ホラムスルフロン	97.6	89.9	85.0	79.1	76.0	61.1	52.3	43.0	37.5	26.8	24.6	15.1	13.0
	Pyr	成分	経過日数 (日)												
		0	1	2	3	4.1	7.9	12.9	14.8	16.9	19.8	24.1	30.1		
ホラムスルフロン		95.4	89.6	85.1	77.9	74.8	57.1	40.6	36.9	31.5	26.5	19.9	13.7		
pH 5、 40°C	Phe	成分	経過時間 (時)												
			0	8.5	12	16.9	21.6	27.3	34	40.6	50.3	57.8			
		ホラムスルフロン	95.3	79.3	72.0	64.4	56.5	48.3	42.8	35.5	29.0	24.2			
	Pyr	成分	経過時間 (時)												
			0	6.3	8.6	12.1	17.3	22.6	27.2	43.3	50.8	68.8			

ND 検出されず

pH7 の緩衝液における加水分解(表 4)

pH 7 では、pH 4 あるいは 5 に比べると、ホラムスルフロンの分解は明らかに抑制され、25℃においては処理 30 日後に約 85%が未変化のホラムスルフロンとして残存していた。pH 7 における主要分解物は、両標識に共通な成分として [M01]、ベンゼン環標識では [M02]、ピリミジル環標識では [M04]であった。また、ベンゼン環標識では 40℃で実施した際に [M02]以外に [M03]が閉環した [M06]が 10%を超えて検出された。

表 4 ホラムスルフロンの pH 7 における加水分解 (処理放射能に対する%)

条件	標識位置	成分	経過日数 (日)									
			0	1	7	13.9	20.9	30.1				
pH 7、 25℃	Phe	ホラムスルフロン	97.2	96	93.2	90.7	88.6	84.9				
	Pyr	成分	経過日数 (日)									
			0	8.1	14.8	19.8	30.1					
		ホラムスルフロン	96.4	94.7	91	88.4	84.5					
pH 7、 40℃	Phe	成分	経過日数 (日)									
			0	1	4.9	6.9	8.9	13	19.1	23	26.8	29.9
		ホラムスルフロン	95.7	93.7	82.4	75.1	69.5	61.8	49.9	43.4	37.7	34.8
	Pyr	成分	経過日数 (日)									
			0	8.1	13.9	19.8	23.1	26.8	29.8			
		ホラムスルフロン	96.8	73.3	60	49.7	44.1	38.9	36			

ND 検出されず

pH9 の緩衝液における加水分解(表 5)

pH 9 では、pH 7 と同様に pH 4 あるいは 5 に比べてホラムスルフロンの分解は明らかに抑制され、25℃においては処理 30 日後に約 80~90%が未変化のホラムスルフロンとして残存していた。pH 9 における主要分解物は、両標識に共通な成分として [M01]、ピリミジル環標識では [M04]であった。ベンゼン環標識に固有の分解物で 10%を超える成分は検出されなかった。

表 5 ホラムスルフロンの pH 9 における加水分解 (処理放射能に対する%)

	成分	経過日数 (日)										
		0	1	7	13.6	20.8	30.1					
pH 9、 25℃	Phe	ホラムスルフロン	97.8	96.3	94.9	91.8	89.4	80.4				
	Pyr	成分	経過日数 (日)									
			0	8.1	14.8	19.8	30.1					
		ホラムスルフロン	96.2	94.5	93.2	91.6	88.1					
pH 9、 40℃	Phe	成分	経過日数 (日)									
			0	1	4.9	6.9	8.9	13	19.1	23	26.8	29.9
	Phe	ホラムスルフロン	94.8	94.7	88.8	85	81.7	76.0	67.3	62.9	59.2	56.8
Pyr	成分	経過日数 (日)										
		0	8.1	13.9	19.8	23.1	26.8	29.8				
	ホラムスルフロン	97.4	82.7	74.4	67.1	63.3	58.7	55.4				

ND 検出されず

2. ホラムスルフロンの加水分解半減期

各 pH におけるホラムスルフロンの加水分解半減期及び 90%減期を以下に示す。ホラムスルフロンは中性あるいは弱アルカリ性条件におけるよりも酸性条件でより速やかに加水分解した。

表 6 ホラムスルフロンの加水分解半減期

pH	半減期(日)		90%減期(日)*	
	25℃	40℃	25℃	40℃
4	3.7	0.41	12.3	1.4
5	10.1	1.1	33.6	3.7
7	128	19.4	425	64.5
9	132	36.3	439	121

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。

* 一次式に従うと仮定し、半減期から得られた速度定数を用いて申請者算出

3. ホラムスルフロンの加水分解経路

ホラムスルフロンは、以下の主要 2 経路で加水分解分解した。

- ✓ [M02]及び [M04]の生成(酸性領域でより顕著)
 - ✓ [M01]の生成(中性からアルカリ性で顕著)
- ホラムスルフロン加水分解で生成した最初の分解物である [M01]及び [M02]も親化合物と同様、以下の経路で分解した。
- ✓ [M01]: [M02]及び [M04]の生成(酸性領域でより顕著)
 - ✓ [M02]: [M03]の生成

推定分解経路を以下に示す。

図 1 ホラムスルフロン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。

3. 水中運命試験

(2) 滅菌緩衝液中における水中光分解

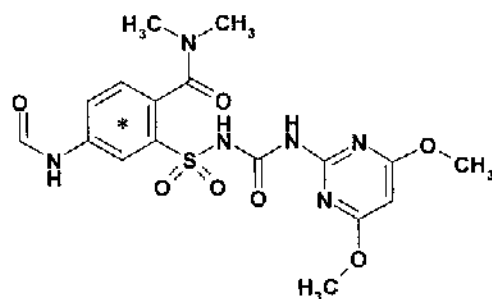
(運命資料10)

報告書作成年：1999年 [GLP 対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 試験系

試験溶液の調製：被験物質のストック溶液（アセトニトリル溶液）5ml を滅菌 pH 7 酢酸アンモニウム緩衝液(0.01M)で 1000ml に定容し調整した。

試験温度：25℃

試験濃度：100.4 ppm (実測濃度)

光照射装置：サンテスト

光源：キセノンランプ(フィルターにより<290 nm の波長の光を除去)

試験容器：入射光面が石英製の容器

光強度(SUNTEST II)：2.35 日相当 (北緯 52 度の 6 月の全天日射量換算)
= 2.35 × 22 = 51.7 MJ/m²/日(申請者計算) (300~3000 nm)

光強度(SUNTEST III)：3.51 日相当 (北緯 52 度の 6 月の全天日射量換算)
= 3.51 × 22 = 77.2 MJ/m²/日(申請者計算) (300~3000 nm)

2. 試料採取及び分析

照射 0、24、48、72、96、168 及び 194 時間後に試験装置に入れた試験容器を採取し

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

た。採取時点ごとに試験装置に取り付けた捕集溶液(揮発性有機物にはエチレングリコール、二酸化炭素にはアルキルアミン、冷却トラップ(メタノールと水酸化ナトリウム水溶液の混液))も採取した。

試験溶液あるいは捕集溶液中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定し、試験溶液中の成分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離・定量した。

【結果】

光照射後の溶液及び捕集液からの回収率は良好であり、処理量の99.6～100%であった(2反復の平均)。

照射194時間後における未変化のホラムスルフロンの残留量は処理量の約90%であり、暗所対照区と同等であった。ホラムスルフロンの実験条件における半減期はSUNTEST IIで106日、SUNTEST IIIで77日と算出された。

東京の春季の半減期は下式より約375～407日と算出された(申請者計算)。

$$\text{半減期(SUNTEST II)} = \text{実験半減期} \times \frac{\text{SUNTEST IIの全天日射量}}{\text{東京の春季の全天日射量}} = 106 \times \frac{51.7}{14.6} = 375 \text{ 日}$$

$$\text{半減期(SUNTEST III)} = \text{実験半減期} \times \frac{\text{SUNTEST IIIの全天日射量}}{\text{東京の春季の全天日射量}} = 77 \times \frac{77.2}{14.6} = 407 \text{ 日}$$

分解物の生成はいずれの条件においても微量であった。

溶液からは3成分が同定されたが、いずれも暗所対照区でも同様に認められた。

本試験の結果、ホラムスルフロンは水溶液中において直接光分解によってほとんど分解されないと考えられた。

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。

表1 ホラムスルフロンの水中光分解(照射試料)

(SUNTEST II の結果、処理放射能に対する%*)

平均	0	24	48	72	96	168	194
溶液	100	100.1	99.8	99.4	99.5	99.3	99.4
ホラムスルフロン	96.14	95.37	93.59	92.72	92.72	90.67	91.45
CO ₂		0.011	0.023	0.039	0.058	0.108	0.134
揮発性有機物等		0.010	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
回収率	100	100.2	99.8	99.5	99.6	99.4	99.5

* 回収率あるいはその他の成分の量を算出するには定量限界値を計算に含めなかった。

HPLC で検出された5成分の放射能の含量。単一ピークの最大値は5%未満であった。

表2 ホラムスルフロンの水中光分解(照射試料)

(SUNTEST III の結果、処理放射能に対する%*)

平均	0	24	48	72	96	168	194
溶液	100	99.5	99.6	99.5	99.5	99.9	99.7
ホラムスルフロン	96.14	95.47	93.52	92.93	92.53	91.13	88.43
CO ₂		0.011	0.017	0.041	0.066	0.151	0.214
揮発性有機物等		<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	0.003	0.020
回収率	100	99.5	99.6	99.6	99.5	100.1	100

* 回収率あるいはその他の成分の量を算出するには定量限界値を計算に含めなかった。

HPLC で検出された5成分の放射能の含量。単一ピークの最大値は5%未満であった。

表3 ホラムスルフロンの水中光分解(暗所対照試料)

(処理放射能に対する%*)

平均	0	24	48	72	96	168	194
溶液	100	100	99.8	99.7	99.4	99.9	99.7
ホラムスルフロン	96.14	95.20	94.85	94.09	93.89	93.58	93.62
CO ₂		<0.002	0.003	0.005	0.006	0.009	0.010
揮発性有機物等		<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
回収率	100	100	99.8	99.7	99.4	99.9	99.7

* 回収率あるいはその他の成分の量を算出するには定量限界値を計算に含めなかった。

HPLC で検出された5成分の放射能の含量。単一ピークの最大値は5%未満であった。

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。

3. 水中運命試験

(3) 滅菌自然水中における水中光分解

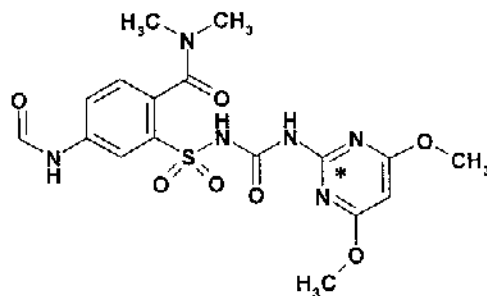
(運命資料 11)

報告書作成年：2008年 [GLP 対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[ピリミジル(Pyrim)-2- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 試験系

供試水：2008年8月19日に米国カンサス州 Heritage Park, Olathe (Johnson County)の池から採取した水を用いた。採取時の水のpHは7.9であった。
810 μLの処理溶液(アセトニトリル溶液)を660 mLの水に加えた後、ろ過滅菌して試験溶液とし、試験容器に分注した(それぞれ20 g)。

試験温度：25°C

試験濃度：1.2 ppm (測定濃度)

溶解助剤の種類及び濃度：アセトニトリル、0.1%

光照射装置：サンテスト

光源：キセノンランプ(フィルターにより<290 nmの波長の光を除去)

試験容器：石英製容器 (20 mL 容)

光強度：680 W/m² (290~800 nm)

2. 試料採取及び分析

照射0、8時間後及び1、2、3、4及び5日後に試験容器(2反復)を採取した。暗対照試料は0、1、2、3及び5日後に採取した。

照射試料あるいは暗対照のいずれについても揮発性物質の捕集を試みなかった。

試験溶液あるいは捕集溶液中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定し、試験溶液中の成分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離・定量した。

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。

対照化合物標準品の HPLC での保持時間の比較及びクロマトグラフィーにより親化合物ホラムスルフロン及び分解物を特定し、更に質量分析で同定した。

採取試料全てについて pH を測定すると共に、一部の試料について無菌性が保たれていることを確認した。

【結果】

1. 有効成分及び分解物の HPLC による定量(表 1)

光照射後の溶液からの回収率は良好であり、処理量の 100～101.9%が回収された(2反復の平均)。

ホラムスルフロンは自然水中で光分解を受け、照射 5 日後には処理量の 13.5%まで減少した。暗対照試料では処理 5 日後に 92.8%残存していた。

ホラムスルフロンの分解に伴い、複数の分解物が生成した。3 種の分解物が処理量の 10%を超える量で生成し、これらを [M04](最大で 26.5%、照射 5 日後)、 [M08] (最大で 19.7%、照射 5 日後)及び [M09] (最大で 18.6%、照射 5 日後)及び [M01]も同定されたが、処理量の 10%を超えることもなく、照射 5 日後には減少した。

表 1 ホラムスルフロンの水中光分解(照射試料) (2反復の平均、処理放射能に対する%)

成分	照射後日数 [日]						
	0	0.33	1	2	3	4	5
ホラムスルフロン	97.5	84.3	64.2	51.5	36.8	17.9	13.5

* TLC で 11 種の成分が検出され、単一成分では最大 7.2%に相当した。

2. ホラムスルフロンの光分解半減期(表 2)

ホラムスルフロンの実験条件における半減期は 1.9 日と計算された。この値から 4～6 月の東京の自然太陽光下における半減期は 13.2 日と算出された。

表 2 ホラムスルフロンの水中光分解半減期(DT₅₀)及び 90%減期(DT₉₀)

試験系	実験条件		自然条件(東京)	
	DT ₅₀	DT ₉₀	DT ₅₀	DT ₉₀
照射	1.9 日	6.4 日	13.2 日	44.4 日

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。

推定分解経路を次ページに示す。

図1 ホラムスルフロンの推定水中光分解経路(自然水)

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. 水中運命試験

(3) 滅菌自然水中における水中光分解

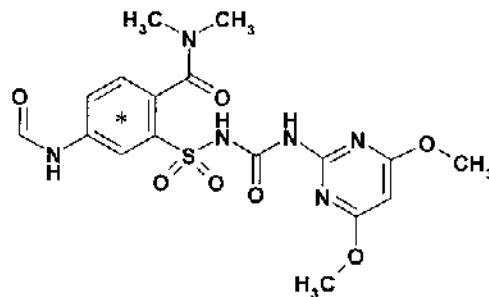
(運命資料 12)

報告書作成年：2009年 [GLP 対応]

供試標識化合物

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルムアミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Ph)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

標識位置の設定理由：

【方法】

1. 試験系

供試水：2008年12月8日に米国カンサス州 Heritage Park, Olathe (Johnson County)の池の表層(0~6インチ)から採取した水を用いた。採取時の水のpHは8.3であった。

900 μLの処理溶液(アセトニトリル溶液)を660 mLの水に加えた後、ろ過滅菌して試験溶液とし、試験容器に分注した(それぞれ20 g)。

試験温度：25°C

試験濃度：1.0 ppm (測定濃度)

溶解助剤の種類及び濃度：アセトニトリル、0.1%

光照射装置：サンテスト

光源：キセノンランプ(フィルターにより<290 nmの波長の光を除去)

試験容器：石英製容器 (20 mL 容)

光強度：680 W/m² (290~800 nm)

2. 試料採取及び分析

照射0、8時間後及び1、2、3、4及び5日後に試験容器(2反復)を採取した。暗対照試料は0、1、2、3及び5日後に採取した。

照射試料あるいは暗対照のいずれについても揮発性物質の捕集を試みなかった。

試験溶液あるいは捕集溶液中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)

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。

で測定し、試験溶液中の成分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離・定量した。対照化合物標準品の HPLC での保持時間の比較及びコクロマトグラフィーにより親化合物ホラムスルフロン及び分解物を特定し、更に質量分析で同定した。

採取試料全てについて pH を測定すると共に、0、3 及び 5 日後の試料について無菌性が保たれていることを確認した。

【結果】

1. 有効成分及び分解物の HPLC による定量(表 1)

光照射後の溶液からの回収率は良好であり、処理量の 97.6~102.1%が回収された。ホラムスルフロンは自然水中で光分解を受け、照射 5 日後には処理量の 11.0%まで減少した。暗対照試料では処理 5 日後に 90.7%残存していた。

ホラムスルフロンの分解に伴い、複数の分解物が生成した。3 種の分解物が処理量の 10%を超え、これらを [M11](最大で 19.7%、照射 3 日後)、 [M10] (最大で 12.8%、照射 4 日後)及び [M1] (最大で 10.7%、照射 1 日後)と同定した。いずれの分解物も照射 5 日後には減少した。また、 [M09]は暗対照試料からも検出された(5.4%~6.0%)。これら 3 種の主要分解物以外に [M12]を仮同定した(最大で 6.7%、照射 4 日後)。

表 1 ホラムスルフロンの水中光分解(照射試料) (2 反復の平均、処理放射能に対する%)

成分	照射後日数 [日]						
	0	0.33	1	2	3	4	5
ホラムスルフロン	94.4	88.0	72.6	53.0	46.9	20.8	11.0

* AMB 含有量を含む。単一成分では最大 7.3%に相当した。

2. ホラムスルフロンの光分解半減期(表 2)

ホラムスルフロンの実験条件における半減期は 2.1 日と計算された。この値から 4~6 月の東京の自然太陽光下における半減期は 14.6 日と算出された。

表 2 ホラムスルフロンの水中光分解半減期(DT₅₀)及び 90%減期(DT₉₀)

試験系	実験条件		自然条件(東京)	
	DT ₅₀	DT ₉₀	DT ₅₀	DT ₉₀
照射	2.1 日	7.1 日	14.6 日	49.3 日

推定分解経路を次ページに示す。

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。

図1 ホラムスルフロンの推定水中光分解経路(自然水)

4. 土壌吸着試験

(1) ホラムスルフロンの土壌吸着試験

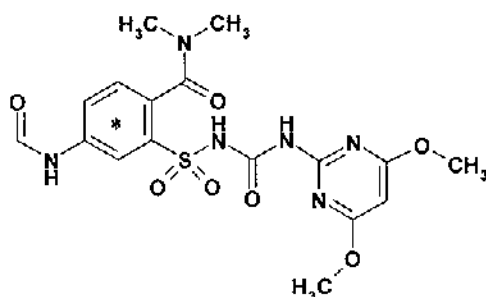
(運命資料 13)

報告書作成年：2000年 [GLP 対応]

供試化合物：

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルム
アミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[フェニル(Phe)-UL- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

【方法】

1. 供試土壌

下表に示す5種の土壌を用いてホラムスルフロンの土壌吸着係数を測定した。それぞれの OECD 分類における土壌型を示す。

表 1. 供試土壌

土壌	粘土含量(%)	土性	OC%	pH (CaCl ₂)	CEC	OECD 分類
EFS-16 Maquoketa、米国	29.2	シルト質埴壤土	1.73	7.2	16.2	3に類似
EFS-21 Pikeville、米国	4.8	壤質砂土	0.47	6.2	2.2	5に類似
EFS-22 Muenster、独国	6.0	壤質砂土	1.80	5.5	5.6	5に類似
EFS-24 Shuttleworth、英国	6.0	砂土	0.81	6.4	3.7	5に類似
EFS-25 Chantepic、仏国	40.0	埴土	1.84	5.4	10.0	3に類似

2. 試験法の一般的記述

暗所、25℃の条件下、ガラス製試験管中で土壌を 0.01M 塩化カルシウム水溶液と予備平衡化させた(最低 2 時間)。予備平衡化後、処理溶液量が総溶液量の 1%を超えないように処理溶液(アセトニトリル溶液)を加え、所定の時間振とうして平衡化させた(吸着操作)。平衡化後、遠心分離により上清と土壌を分けた後、土壌層に 0.01M 塩化カルシウム水溶液を加えて 24 時間振とうした後、再び遠心分離により上清と

土壌を分けた(脱着操作)。脱着操作を2回繰り返した。

上記により得られた上清について、その体積を記録後、液体シンチレーションカウンター(LSC)により放射エネルギーを測定した。一部の試料について、液体クロマトグラフィー(HPLC)あるいは薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

脱着後の土壌試料について、燃焼分析により放射エネルギーを測定すると共に、一部の試料についてはアセトニトリル/水(7/3、v/v)で抽出後、液体クロマトグラフィー(HPLC)あるいは薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

3. 試験容器への吸着—予備試験 1

ホラムスルホン濃度約 5 ppm の 0.01M 塩化カルシウム水溶液(25 mL、3 反復)を試験管に加えて 24 時間振とうした後、溶液中のホラムスルホン濃度を測定し、容器への吸着性を調べた。

4. 土壌：溶液比の決定—予備試験 2

適切な土壌：溶液比を決めるため、Maquoketa 土壌及び Chantepie 土壌を用いて予備試験を実施した。土壌：水比が 1：5、1：10 及び 1：25 となるように、所定量の土壌(それぞれ 10 g、5 g 及び 2 g)を試験容器に入れた。その容器に 0.01M 塩化カルシウム水溶液を 50 mL 加えて予備平衡化させた後、水溶液中濃度として 0.05 ppm となるように処理溶液を加えた後、25°C、暗所で 24 時間攪拌した。その後、上清中の放射エネルギーを測定した。

5. 平衡化時間の決定及び安定性—予備試験 3

土壌：溶液比を 1：5 とし、予備試験 2 と同様に実施した。試験濃度が 4.9 ppm(但し、2 試料については 2.4 ppm)となるように処理溶液を添加後、25°C、暗所で振とうした。処理 2、4、7、24、48 及び 72 時間後に、上清中の放射エネルギーを測定した。処理 24、48 及び 72 時間後に試料を遠心分離し、上清中の放射エネルギーを測定し、分離後の土壌をアセトニトリル/水(7/3、v/v)で抽出し、抽出液中の放射エネルギーを調べた。上清及び抽出液を TLC で分析し、被験物質の分解を調べた。

6. 本試験

全土壌について、溶液中濃度を 0.05、0.5、1.0 及び 5.0 µg/mL に、土壌：溶液比を 1：5(土壌 10 g に対し溶液を 50 mL)に設定した条件で被験物質添加後 24 時間攪拌した。更に、Muenster 土壌及び Shuttleworth 土壌については土壌：溶液比を 1：1.5 に設定した条件でも実施した。

土壌を平衡化後(吸着操作)、遠心分離により上清を取り除いた後、0.01M 塩化カルシウム水溶液を 15 あるいは 50 mL 加え、24 時間攪拌した後遠心分離し、上清を得た(脱着操作)。脱着操作をもう一度繰り返した。

【結果】

1. 試験容器への吸着—予備試験 1

濃度約 5 ppm の試験溶液を 24 時間振とう後、溶液中のホラムスルフロン濃度は 4.98 あるいは 4.99 ppm であり、ホラムスルフロンの溶液への吸着はほとんど認められなかった。

2. 土壌：溶液比の決定—予備試験 2

Maquoketa 土壌及び Chantepie 土壌を用いて実施した予備試験結果を下表に示す。いずれの土壌でも土壌への吸着率が 20%以上となる 1：5 を選択した。

表 2. 土壌：溶液比の決定-吸着率及び吸着係数

土壌			土壌：溶液比 (溶液 50 mL)		
			1:25 (土壌 2 g)	1:10 (土壌 5g)	1:5 (土壌 10 g)
EFS-16	Maquoketa、米国	吸着率(%)	15.2	27.8	41.7
		吸着係数	4.5	3.9	3.6
EFS-25	Chantepie、フランス	吸着率(%)	7.0	14.1	26.5
		吸着係数	1.9	1.7	1.8

3. 平衡化時間の決定及び安定性—予備試験 3

溶液中のホラムスルフロンは振とう時間の経過と共に減少した。振とう 24 時間後～72 時間後における上清中濃度の減少率は初期濃度の 2%未満であり、24 時間後には既に平衡に達したと推定された(表 3)。被験物質の安定性はいずれの土壌においても比較的良好であり、処理量の約 90%以上が回収された。

Pikeville 土壌以外では 24 時間後、48 時間後及び 72 時間後の回収率に大きな違いは認められなかった(表 4)。

従って、24 時間で既に平衡に達していると考えられること及び安定性から平衡化時間を 24 時間に決定した。

表 3. 平衡化時間の決定-上清中濃度の経時変化

土壌		溶液中濃度						
		0	2	4	7	24	48	72
EFS-16	Maquoketa、米国	5.16	3.53	3.48	3.46	3.42	3.39	3.68
EFS-21	Pikeville、米国	5.06	4.98	4.88	4.78	4.81	4.83	4.93
EFS-22	Muenster、ドイツ	5.05	4.63	4.50	4.51	4.49	4.58	4.77
EFS-24	Shuttleworth、英国	5.06	4.82	4.73	4.72	4.78	4.75	4.84
EFS-25	Chantepie、フランス	5.00	4.21	4.18	4.20	4.16	4.24	4.37

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. 吸着平衡時間の決定-安定性(処理量に対する割合)

土壌		時間	溶液		土壌		安定性 (収支)
			放射能	AI*	放射能	AI*	
EFS-16	Maquoketa、米国	24	64.8	63.0	24.9	24.2	87.2
		48	67.4	65.7	27.0	26.7	92.4
		72	70.6	68.6	26.3	25.1	93.7
EFS-21	Pikeville、米国	24	93.5	91.7	8.1	7.7	99.4
		48	81.7	80.1	8.5	8.4	88.5
		72	96.5	94.3	8.4	8.1	102.4
EFS-22	Muenster、ドイツ	24	90.4	85.6	13.7	13.2	98.8
		48	89.5	86.2	13.5	13.1	99.4
		72	97.6	93.3	11.5	11.2	104.6
EFS-24	Shuttleworth、英国	24	93.4	90	10.2	9.7	99.7
		48	94.1	92.3	10.3	10.1	102.4
		72	96.4	93.6	10	9.7	103.3
EFS-25	Chantepie、フランス	24	79.8	76.6	21.2	20.5	97
		48	83.4	79.3	19	18.2	97.5
		72	88.2	81.5	16.7	16.1	97.5

* 被験物質回収率

3. 本試験

ホラムスルフロンの吸着係数ならびに脱着係数を下表に示す。ホラムスルフロンの吸着係数 K_F は 0.31~2.61、 K_{OC} は 38~151 であり、脱着係数 1 も同様であった。また、試験を通じた総物質収支は 92~105% の範囲であった(表 7)。

表 5. ホラムスルフロンの吸着係数

土壌		1/n	K_F^{ads}	r^2	oc%	$K_F^{ads}_{oc}$
EFS-16	Maquoketa、米国	0.940	2.61	1.000	1.73	151
EFS-21	Pikeville、米国	0.824	0.42	0.988	0.47	89
EFS-22	Muenster、独国	0.856	0.91	0.998	0.856	51
EFS-24	Shuttleworth、英国	0.864	0.31	0.999	0.864	38
EFS-25	Chantepie、仏国	0.871	1.17	0.998	0.871	63

表 6. ホラムスルフロンの脱着係数

土壌		脱着係数 1		脱着係数 2	
		K_F^{des1}	$K_F^{des1}_{OC}$	K_F^{des2}	$K_F^{des2}_{OC}$
EFS-16	Maquoketa、米国	3.12	181	3.64	210
EFS-21	Pikeville、米国	1.37	291	2.46	523
EFS-22	Muenster、独国	0.99	55	0.68	38
EFS-24	Shuttleworth、英国	0.29	36	0.15	18
EFS-25	Chantepie、仏国	1.06	58	0.33	18

表 7. 物質収支

土壌		濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	吸着段階 溶液	脱着 1	脱着 2	未抽出 残渣	収支
EFS-16	Maquoketa、米国	0.05	54.6	21.7	9.3	13.1	98.5
		0.50	56.9	22.5	8.6	11.3	99.0
		1.00	58.0	22.6	9.2	10.7	100.5
		5.00	60.5	22.8	8.7	9.1	101.1
EFS-21	Pikeville、米国	0.05	82.8	10.7	2.8	3.5	99.8
		0.50	84.3	9.8	2.1	2.7	98.9
		1.00	85.6	9.7	1.6	2.3	99.6
		5.00	88.9	8.7	1.7	1.5	100.8
EFS-22	Mucnster、独国	0.05	38.6	25.1	14.0	18.0	95.5
		0.50	40.9	25.9	11.2	15.5	93.6
		1.00	45.1	25.5	14.3	15.3	100.2
		5.00	51.7	27.0	12.4	10.9	102.0
EFS-24	Shuttleworth、英国	0.05	59.8	22.9	7.6	6.5	96.9
		0.50	60.9	23.5	6.9	6.2	97.4
		1.00	63.7	23.7	8.0	6.2	101.8
		5.00	67.1	24.3	7.8	5.4	104.6
EFS-25	Chantepie、仏国	0.05	64.6	22.3	7.6	7.3	101.7
		0.50	67.6	21.3	6.0	5.5	100.4
		1.00	70.7	21.4	6.3	5.2	103.7
		5.00	73.9	19.6	5.4	4.0	102.9

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

4. 土壌吸着試験

(2) ホラムスルフロンの土壌吸着試験(日本土壌)

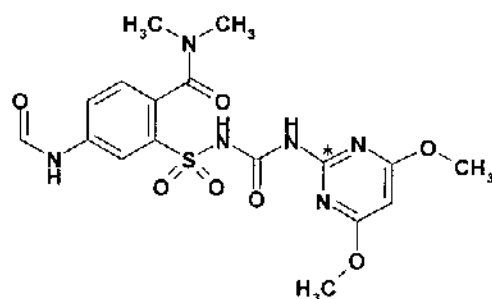
(運命資料 14)

報告書作成年：2008 年 [GLP 対応]

供試化合物：

化学名：1-(4,6-ジメトキシピリミジン-2-イル)-3-[2-(ジメチルカルバモイル)-5-ホルム
アミドフェニルスルホニル]尿素

化学構造：



*：標識部位

標識：	[ピリミジル(Pyr)-2- ¹⁴ C]
比放射能：	
放射化学的純度：	

【方法】

1. 供試土壌

下表に示す 5 種の土壌を用いてホラムスルフロンの土壌吸着係数を測定した。それぞれの OECD 分類における土壌型を示す。

表 1. 供試土壌

土壌	粘土含量 (%)	土性	OC%	pH (CaCl ₂)	CEC	OECD 分類
牛久土壌(火山灰)、茨城県	11	砂壤土	4.3	5.6	15.9	2 に類似
上川土壌、北海道	19	壤土	2.1	4.9	12.2	4 に類似

2. 試験容器への吸着—予備試験 1

0.01M 塩化カルシウム水溶液 18 mL を試験容器(テフロン製遠沈管)に加えた後、処理溶液(ホラムスルフロン濃度 50 ppm の 0.01M 塩化カルシウム水溶液)を 2 mL 加えた(溶液中濃度約 5 ppm)。24 時間あるいは 48 時間振とう後、溶液中のホラムスルフロン濃度を液体シンチレーションカウンターで測定し、容器への吸着性を調べた。48 時間後には溶液を液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定し、溶液の安定性を確認した。

3. 土壌：溶液比の決定—予備試験 2

適切な土壌：溶液比を決めるため予備試験を実施した。土壌：水比が牛久土壌では

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 : 1.14、1 : 4 及び 1 : 20、上川土壌では 1 : 1.1、1 : 4 及び 1 : 20 となるように所定量の土壌(牛久土壌では 17.5 g、5 g 及び 1 g、上川土壌では 20 g、5 g 及び 1 g)を試験容器に入れた。その容器に 0.01M 塩化カルシウム水溶液を 18 mL 加えて予備平衡化させた後、処理溶液(50 ppm)を 2 mL 加えた(溶液中濃度約 5 ppm)。25°C、暗所で 24 時間攪拌した。その後、上清中の放射エネルギーを測定した。

4. 平衡化時間の決定—予備試験 3

牛久土壌 2.5 g(土壌 : 溶液比 1 : 8)あるいは上川土壌 4.0 g(土壌 : 溶液比 1 : 5)を試験容器に秤量後、0.01M 塩化カルシウム水溶液を 18 mL 加えて 24 時間予備平衡化させた。予備平衡化後、処理溶液(50 ppm)を 2 mL 加え(溶液中濃度約 5 ppm)、25°C、暗所で振とうした。処理溶液を添加 0、6、24 及び 48 時間後に、上清中の放射エネルギーを測定した。

5. 被験物質の安定性—予備試験 4

牛久土壌 1.0 g(土壌 : 溶液比 1 : 20)あるいは上川土壌 2.0 g(土壌 : 溶液比 1 : 10)を試験容器に秤量後、0.01M 塩化カルシウム水溶液を 18 mL 加えて 24 時間予備平衡化させた。予備平衡化後、処理溶液(50 ppm)を 2 mL 加え(溶液中濃度約 5 ppm)、25°C、暗所で 24 時間振とうした。平衡化後、土壌と上清を遠心分離により分離し、得られた上清と土壌を分析した。

上清は LSC で放射エネルギーを測定するとともに HPLC で分析した。土壌はアセトニトリル/水(1/1、v/v)で振とう抽出後(3 回)、更に同溶媒でマイクロウェーブ抽出した。得られた抽出液を LSC で放射エネルギーを測定するとともに HPLC で分析した。

6. 本試験

両土壌とも溶液中濃度を 0.05、0.1、0.5、1.0 及び 5.0 ppm に設定し、本試験を実施した。

牛久土壌 1.0 g(土壌 : 溶液比 1 : 20)あるいは上川土壌 2.0 g(土壌 : 溶液比 1 : 10)を試験容器に秤量後、0.01M 塩化カルシウム水溶液を 18 mL 加えて 24 時間予備平衡化させた。予備平衡化後、所定濃度の処理溶液を 2 mL 加え、25°C、暗所で 24 時間振とうした。

平衡化後、土壌と上清を遠心分離により分離し、得られた上清中の放射エネルギーを LSC で測定し、土壌中の放射エネルギーを燃焼分析した。

【結果】

1. 溶液の安定性及び試験容器への吸着—予備試験 1

試験溶液を 48 時間振とう後のホラムスルフロンの回収率は 98.9%であり、ホラムスルフロンの溶液への吸着はほとんど認められず、また安定であった。

2. 土壌 : 溶液比の決定—予備試験 2

牛久及び上川両土壌におけるそれぞれの土壌 : 溶液比におけるホラムスルフロンの吸着率を表 2 に示す。いずれの土壌でも 1 : 4 から 1 : 20 の範囲における吸着率が試験指針に示されている 20~80%の範囲内であった。この結果及び被験物質の安定

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

性を考慮し、牛久土壤では1:20、上川土壤では1:10を本試験の土壤:溶液比に設定した。

表 2. 土壤:溶液比の決定-吸着率及び吸着係数

土壤	牛久			上川		
	土壤:溶液比	1:1.14	1:4	1:20	1:1.1	1:4
吸着率(%)	6.5	24.7	69.8	12.1	36.9	75.0
吸着係数	93.5	75.3	30.2	87.9	63.1	25.0

3. 平衡化時間の決定及び安定性—予備試験3及び4

ホラムスルフロンの吸着率は振とう時間の経過と共に増加した。いずれの土壤でも24時間後には既に平衡に達したと推定された(表3)。また、被験物質の24時間後における安定性はいずれの土壤においても比較的良好であり、処理量の約90%以上が回収された。

以上、平衡化及び安定性の結果から、平衡化時間を24時間に決定した。

表 3. 平衡化時間の決定-上清中濃度の経時変化

土壤	時間(h)			
	0	6	24	48
牛久	21.5	47.2	54.8	59.8
上川	37.4	52.3	56.9	59.7

表 4. 吸着平衡時間の決定-安定性(処理量に対する割合)

土壤	上清		土壤		安定性 (収支)
	放射能	AI*	放射能	AI*	
牛久	63.2	60.9	35.9	30.8	91.8
上川	55.4	54.2	44.7	36.0	90.2

* 被験物質回収率

3. 本試験

ホラムスルフロンの吸着係数を下表に示す。ホラムスルフロンの吸着係数 K_F は 6.8~11.7、 K_{oc} は 273~325 であった。総物質収支は牛久土壤では 96.8%、上川土壤では 96.3% であった。

表 4. ホラムスルフロンの吸着係数

土壤	1/n	K_F^{ads}	r^2	oc%	$K_F^{ads}_{oc}$
牛久	0.7802	11.741	0.9979	4.3	273.0
上川	0.9120	6.827	0.9997	2.1	325.1

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。

ホラムスルフロンの代謝分解の要約

ホラムスルフロンの動物、土壌における代謝分解、加水分解及び光分解に関する研究結果を以下に要約し、結果の概要を表1に、推定代謝経路を図1に示す。

動物体内運命

[フェニル(Phe)-UL-¹⁴C]あるいは[ピリミジル(Pyr)-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを用いて、以下に示すホラムスルフロンの動物体内運命試験が実施された。いずれの試験でも低用量は10 mg/kg bw、高用量は1000 mg/kg bwとし、ホラムスルフロンを単回(運命資料1～5)あるいは反復(運命資料6)経口投与した。運命資料1は予備試験として実施した。運命資料2では主として排泄及び分布を、運命資料3では胆汁排泄試験を調べた。運命資料4では血中薬物動態及び臓器・組織における分布を調べ、運命資料5では排泄物中の代謝物を調べた。運命資料6では反復投与後の排泄、分布及び代謝を調べた。

吸収、排泄及び分布(運命資料1～3)

[フェニル(Phe)-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンをラットに低用量(10 mg/kg bw)あるいは高用量(1000 mg/kg bw)で投与後の放射能の排泄ならびに屠殺時の臓器・組織への分布を調べた。また、吸収量を推定するため、胆汁排泄試験も実施した(運命資料3)。また、予備試験として実施した運命資料1では、[ピリミジル(Pyr)-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを用いて標識位置による違いがあるかを調べた。

投与用量あるいは雌雄によらず、いずれの試験群からも投与放射能が定量的に回収された。胆汁排泄試験群を含むいずれの試験群でも、尿中排泄量は低用量投与で約5～10%、高用量投与で1～5%と少なく、排泄量の大部分が糞に排泄された。胆管カニューレを施したラットに低用量で単回投与後の尿及び胆汁中への排泄量はそれぞれ4.2%及び12.7%であり、尿中排泄量は胆管カニューレを施していないラットの尿中排泄量と同程度であった。胆管カニューレを施したラットの屠殺時における動物体中の残留量は1.5%であった。胆汁排泄量、尿中排泄量、ケージ洗浄液ならびにケージ屑及び動物体中残留量を合計し吸収率を算出したところ、吸収率は約20%であった。

72時間後あるいは168時間後の屠殺時の動物体中残留量は少なく、低用量(10 mg/kg bw)で投与後の大部分の臓器・組織で定量限界未満か定量限界程度であった。高用量投与群においても大部分の臓器・組織における残留量は少なく、肝臓、心臓、脾臓及び脂肪で比較的高い濃度(約0.5 ppm以上)が検出された。吸収、排泄経路に標識位置による大きな差はみられなかった。

薬物動態及び臓器・組織における経時的分布(運命資料4)

[フェニル(Phe)-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンをラットに低用量(10 mg/kg bw)あるいは高用量(1000 mg/kg bw)で投与後の血中薬物動態及び臓器・組織への経時的な分布挙動を調べた。

低用量で投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雄ラットで30分後、雌ラットで1時間後に最高濃度に達した。その後の血液中及び血漿中からの放射能の消失も比較的速やかであり、雌雄とも消失半減期は20時間未満であった。高用量で投与後、血液中及び血漿中放射能濃度は雌雄いずれでも投与4時間後に最高濃度に達し、低用量投与に比べ

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。

て明らかに遅延したが、その後の消失は速やかであった。

10 mg/kgの用量でホラムスルフロン投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雄で0.5～1時間後、雌で1時間後に最高濃度に達した。雌雄いずれでも肝臓で最高濃度が検出され、腎臓における濃度も比較的高かった。雌雄いずれでも投与30時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で最高濃度の1/10未満となった。1000 mg/kgの用量で投与後、大部分の臓器・組織における濃度は雌雄いずれでも4時間後に最高濃度に達した。比較的高濃度が肝臓及び腎臓から検出された。雌雄いずれでも投与30時間後における臓器・組織中残留濃度は減少し、大部分の臓器・組織で定量限界未満となった。

いずれの投与量でも、投与30時間後における臓器・組織中放射能濃度は最高濃度に比べて有意に減少し、ホラムスルフロン関連代謝物等が臓器・組織に蓄積する可能性は示唆されなかった。

代謝(運命資料5)

雌雄あるいは投与用量の違いによらず、未変化の親化合物ホラムスルフロンが主要成分であった(投与量の約75～80%)。先の試験で示されたように、ホラムスルフロンの吸収率が低いことから、大部分が未吸収のまま排泄されたと推定された。フェニル標識投与試験ではいずれの投与量でも [M01]及び [M02]の2成分が同定され、ピリミジン標識投与では [M01]のみが同定された。いずれの標識位置の投与でも未同定の高極性成分が検出されたが、その量は比較的少なかった。尿中代謝物及び糞中代謝物を比較すると、尿中では未変化の親化合物ホラムスルフロンの割合は(尿中成分の50%未満)、糞中での割合に比べて明らかに低く、吸収されたホラムスルフロンは代謝を速やかに受けることが示唆された。

代謝物の定性的あるいは定量的分布に雌雄による違いは認められず、投与用量による違いもほとんど認められなかった。

反復投与後の吸収、分布、動物における代謝(運命資料6)

最終投与から48時間後までの放射能回収量(排泄物中の放射エネルギー及びケージ洗浄液中の放射エネルギーならびに屠殺時の動物体中の放射エネルギーの含量)に対して算出すると、尿中排泄割合は雄で約5%、雌で約7%であり、糞中排泄割合は雄で約61%、雌で約89%であった。雄では消化管を含む残体中から約25%が回収され、この大部分は未排泄の糞と推定され、14回反復投与後においても糞が主要排泄経路であった。先の試験(運命資料2)で認められた単回投与後の尿及び糞への排泄割合と14回反復投与後の尿及び糞への排泄割合は同等であった。

大部分の臓器・組織でその放射能濃度は反復投与後にも単回投与の場合に比べてほとんど増加しなかったが、肝臓では僅かに増加した。しかし、肝臓における増加も投与回数に比例せず、14回投与後においても単回投与に比べ雄で約3倍、雌で約2倍程度の増加となった。従って、ホラムスルフロンあるいはその代謝物が臓器・組織に蓄積する可能性はほとんど考えられなかった。

14日間の反復投与後においても、先の試験の単回投与の場合と同様に、未変化の親化

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

化合物ホラムスルフロンが主要成分であった。ホラムスルフロン以外に [M01]及び [M02]の2成分が同定された。排泄物中の代謝物の定性的及び定量的分布に投与回数による違いは認められなかった。

土壤中運命 (運命資料7, 8)

好氣的土壤中運命 (運命資料7)

2種の土壤に[フェニル(Phc)-UL-¹⁴C]あるいは[ピリミジル(Pyr)-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを0.069 ppmの濃度で添加し、好氣的条件、暗所で培養後、経時的に試料を採取した。[Phc-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壤からの放射能の回収はMaquoeta土壤で平均98%(79~104%)、Pikeville土壤で平均96%(76~104%)であった。[Pyr-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを添加後の土壤からの放射能の回収はMaquoeta土壤で平均97%(79~104%)、Pikeville土壤で平均93%(73~103%)であった。

親化合物ホラムスルフロンは、半減期10~13日で速やかに分解した(両標識位置の平均)。いずれの標識位置あるいは土壤においても、抽出可能な放射エネルギーは速やかに減少し、それに伴い未抽出残留物の量が増加した。未抽出残留物の量は、[Phc-UL-¹⁴C]では処理188日後に最大に達し(処理量の約88%)、[Pyr-2-¹⁴C]では処理60~120日後に最大に達した(処理量の約56~75%)。二酸化炭素の生成量は[Phc-UL-¹⁴C]ではいずれの土壤でも約1%と少なかったが、[Pyr-2-¹⁴C]では明らかに多く、最大で12%(Maquoeta土壤)及び22%(Pikeville土壤)検出された。揮発性有機化合物の生成はいずれの標識位置でも認められなかった。

[M01]は処理3日後に約10%程度検出されたが、比較的速やかに減少し、処理14日以降5%未満で推移した。ピリミジル環を消失したAE F153745[M02]及び

[M03]も同定されたが、いずれも少なく処理量の5%を超えることはなかった。ベンゼン環を消失した [M04]も同定された。 [M04]はMaquoeta土壤では少なく、最大で5%程度であったが、Pikeville土壤では処理30日以降10%を超えた。その他、高極性の未同定代謝物が複数検出された。

処理188日後の土壤の未抽出残留物について特徴付けをした。0.25M塩酸で抽出可能な放射エネルギーは少なかったが、その後の腐植酸への画分化における0.5M水酸化ナトリウム処理により、未抽出放射能の約40~70%が可溶化した(フルボ酸画分と腐植酸画分の合計)。いずれの標識位置でもMaquoeta土壤ではヒューミン画分中の放射エネルギーが比較的多かった。

嫌氣的土壤中運命 (運命資料8)

水深1cmに湛水し嫌氣条件とした土壤に[フェニル(Phc)-UL-¹⁴C]あるいは[ピリミジル(Pyr)-2-¹⁴C]ホラムスルフロンを0.092 ppmの濃度で添加し、窒素気流下で嫌氣的条件を維持しつつ暗所で培養後、経時的に試料を採取した。

両標識化合物の試験期間中の放射能の回収率はそれぞれ85.1~106.4%および86.9~107.1%であった。表層水中の放射エネルギーは最初の14日間に徐々に減少し、それに伴い土

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。

壤抽出液中及び未抽出残留物中の放射エネルギーは増加した。14日後以降、未抽出残留物中の放射エネルギーが増加し、128日後には約19%および23%となった。揮発性有機物の生成は認められず、二酸化炭素もほとんど生成しなかった。

親化合物ホラムスルフロンの分解は比較的緩やかであり、一次速度式による推定半減期は165日であった（両標識位置の平均）。いずれの標識位置からも処理量の10%を超える代謝物は認められなかった。嫌気的条件特有の土壌代謝物として [M08]が検出されたが処理量の最大1.2%と僅かであった。

水中運命

加水分解(運命資料9)

ホラムスルフロンはpH 4、5、7及び9の全ての緩衝液中で加水分解した。各pHにおけるホラムスルフロンの加水分解半減期を以下に示す。ホラムスルフロンは中性あるいは弱アルカリ性条件におけるよりも酸性条件でより速やかに加水分解した。

表 ホラムスルフロンの加水分解半減期

pH	加水分解半減期(日)	
	25°C	40°C
4	3.7	0.41
5	10.1	1.1
7	128	19.4
9	132	36.3

ホラムスルフロンは、以下の主要2経路で加水分解分解した。

- ・ [M02]及び [M04]の生成(酸性領域でより顕著)
- ・ [M01]の生成(中性からアルカリ性で顕著)

ホラムスルフロン加水分解で生成した最初の分解物である [M01]及び [M02]も親化合物と同様、以下の経路で分解した。

- ・ [M02]及び [M04]の生成(酸性領域でより顕著)
- ・ [M02]: [M03]の生成

緩衝液中光分解(運命資料10)

pH 7の緩衝液にホラムスルフロンを100 ppmの濃度で溶解し、その溶液をキセノンランプ付きサンテスト照射装置で連続光照射した。溶液及び捕集液からの回収率は良好であり、回収率は処理量の99.6~100%であった。緩衝液中におけるホラムスルフロンの

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。

直接光分解による分解はほとんど認められなかった。

自然水中光分解(運命資料11、12)

[ピリミジル(Pyr)-2-¹⁴C]あるいは [フェニル(Phe)-UL-¹⁴C]ホラムスルフロンを米国カンサス州の池から採取した水に溶解し(ホラムスルフロン濃度 1.2 及び 1.0 ppm)、その溶液をキセノンランプ付きサンテスト照射装置で光照射した。

いずれの標識位置でも回収率は良好であり、処理量の約 95～100%が溶液から回収された。ホラムスルフロンは自然水中で光分解を受け、実験条件での半減期は約 2 日(東京の 4～6 月では 13～15 日)と算出された。

標識位置に関わらず共通な分解物として [M04] が検出された。また、各標識位置に特有な分解物が 10%を超える量で認められた。これらの内、Pyr 標識特有の分解物を [M04](最大で 26.5%、照射 5 日後)、 [M08] (最大で 19.7%、照射 5 日後)及び [M09]と同定し、Phe 標識特有の分解物を [M11](最大で 19.7%、照射 3 日後)及び [M10] (最大で 12.8%、照射 4 日後)と同定した。

いずれの標識位置の試験でも高極性画分に著量の放射能が検出されたが、これら高極性画分は複数の成分から構成され、この高極性画分に含まれている [M10](Phe 標識特有)以外には単一成分で 10%を超える成分は認められなかった。

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

土壌中運命

試験の概要 標識位置/土壌 (処理量)	日数	親化 合物	代謝・分解物										その他	CO ₂	未抽出	合計		
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10					M11	M12
Phe-UL- ¹⁴ C /Maqueta 土壌 (0.14 ppm)	0	96.9														0	2.2	102
	3	68.0														0	29.8	111
	8	44.2														0	43.3	99.0
	14	36.0														0	60.0	101
	21	35.2														0.1	67.4	103
	30	25.5														0.2	71.0	103
	63	16.2														0.3	78.6	101
	90	14.2														0.4	84.6	104
	126	8.6														0.6	85.2	99.0
	188	5.0														0.6	87.4	98.0
279	NA														0.8	68.0	69.0	
290	2.8														0.8	62.3	72.0	
366	1.9														0	79.8	87.0	
Phe-UL- ¹⁴ C /Pikeville 土壌 (0.14 ppm)	0	96.6														NA	0.2	102
	3	62.7														0	23.1	102
	8	47.5														0	41.4	101
	14	40.6														0	50.1	100
	21	30.3														0	64.2	102
	30	23.7														0.1	71.1	102
	63	12.3														0.3	82.4	103
	90	8.2														0.4	83.3	101
	126	5.2														0.7	82.8	94.0
	188	2.8														0.9	88.3	97.0
279	NA														1.2	66.6	68.0	
290	1.9														1	76.0	84.0	
366	0.8														1.1	82.4	88.0	

好気土壌代謝

NA 分析せず、ND 検出せず

本資料に記載された情報、に関する権利及び内容の責任はバイエルグルコップサイノス株式会社にある。

土壌中運命(続き)

試験の概要 標識位置/土壌 (処理量)	日数	親化 化合物	代謝・分解物										その他	CO ₂	未抽出	合計			
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10					M11	M12	
Pyr-2- ¹⁴ C /Maquoeta 土壌 (0.069 ppm)	0	96.9															NA	2.2	101
	3	74.4															0	22.2	110
	8	62.7															0	38.7	104
	14	49.7															0	51.3	103
	21	34															0	56.2	96.7
	30	33.3															1.3	61.4	100
	63	17.7															3.6	68.8	98.1
	90	15.6															6.2	75.0	102
	126	9.4															8.7	74.5	98.5
	188	4.1															11.7	75.8	99.3
279	NA															7.1	46.1	53.3	
290	2.1															8.0	57.8	73.8	
366	1.4															11.5	63.2	81.5	
Pyr-2- ¹⁴ C/ Pikeville 土壌 (0.069 ppm)	0	99.6															NA	0.1	103
	3	71.5															0	22.6	106
	8	46.2															0	41.8	101
	14	37.3															0	50.7	101
	21	31.7															0	54.4	100
	30	24.0															4.0	55.1	101
	63	11.3															8.3	55.5	95.4
	90	11.1															11.4	55.7	97.2
	126	4.7															18.8	54.4	94.4
	188	3.2															16.8	54.5	88.6
279	NA															16.4	25.7	42.1	
290	2.0															20.4	42.9	69.9	
366	ND															21.5	47.2	77.0	

NA 分析せず、ND 検出せず

好気土壌代謝

土壌中運命(続き)

試験の概要 標識位置/土壌 (処理量)	日数	親化 合物	代謝・分解物										CO ₂	未抽出	合計				
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10				M11	M12	その他	
Phe-UL- ¹⁴ C /Shuttleworth 土壌 (0.092 ppm)	0	92.7															NA	NA	104.1
	2	69.6															<0.05	4.4	85.1
	8	82.7															<0.05	9.1	101.4
	14	81.0															0.1	9.6	101.4
	28	78.5															<0.05	10.2	101.1
	56	78.1															0.1	12.3	101.5
	92	70.9															0.1	16.4	106.4
	128	61.7															<0.05	19.3	104.3
Pyr-2- ¹⁴ C/ Shuttleworth 土壌 (0.092 ppm)	0	95.8															NA	NA	107.1
	2	75.1															<0.05	4.4	86.9
	8	86.1															0.1	9.7	106.7
	14	85.5															0.1	8.7	104.9
	28	82.6															0.1	10.2	103.5
	56	79.5															0.1	13.8	103.2
	92	74.6															0.1	17.8	107.7
	128	60.1															0.2	23.1	106.9

NA 分析せず、ND 検出せず

本資料に記載された情報、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。

水中運命(加水分解)		代謝・分解物										その他	合計						
試験の概要																			
標識位置/ pH、温度、濃度		日数	親化 合物	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12				
加水分解	Phe-UL- ¹⁴ C /pH 4、25°C (5.0 ppm)	0	97.1														97.1		
		1	81.8															97.8	
		2	67.1																94.7
		3	57.1																93.7
		4.1	46.1																93.5
		5.1	39.7																94.6
		7	27.1																96.3
		8	22.1																98.3
		9	19.3																98.5
		10	15.8																98.5
加水分解	Pyr-2- ¹⁴ C /pH 4、25°C (5.5 ppm)	0	95.8																
		1	78.6																
		2	68.3																
		3	55.7																
		4.1	46.6																
		7.9	23.8																
		8.8	20.8																
10.2	17.4																		

NA 分析せず、ND 検出せず

水中運命(加水分解(続き))			代謝・分解物													合計		
試験の概要		親化合物	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	その他			
標識位置/ pH、温度、濃度	日数																	
Phe-UL- ¹⁴ C /pH 5、25°C (5.0 ppm)	0	97.6															97.6	
	1	89.9															97.0	
	2	85.0															97.6	
	3	79.1															97.2	
	4	76.0															98.1	
	7	61.1															97.0	
	9	52.3															96.2	
	12	43.0															97.1	
	14	37.5															97.1	
	19.2	26.8															97.6	
	21	24.6															98.3	
	28.2	15.1															97.6	
	30.3	13.0															97.0	
	Pyr-2- ¹⁴ C /pH 5、25°C (5.5 ppm)	0	95.4															96.9
		1	89.6															97.8
2		85.1															99.1	
3		77.9															97.6	
4.1		74.8															100	
7.9		57.1															98.6	
12.9		40.6															97.2	
14.8		36.9															99.2	
16.9		31.5															99.2	
19.8		26.5															98.8	

加水分解

NA 分析せず、ND 検出せず

水中運命(加水分解(続き))	試験の概要		親化合物	代謝・分解物										合計					
	標識位置/ pH、温度、濃度	H数		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10		M11	M12	その他		
加水分解	Phe-UL- ¹⁴ C /pH 7、25°C (5.0 ppm)	0	97.2														97.2		
		1	96.0															97.2	
		7	93.2																94.9
		13.9	90.7																97.9
		20.9	88.6																98.0
		30.1	84.9																97.3
加水分解	Pyr-2- ¹⁴ C /pH 7、25°C (5.5 ppm)	0	96.4															97.3	
		8.1	94.7															99.0	
		14.8	91.0																97.9
		19.8	88.4																97.7
		30.1	84.5																98.1
		0	97.8																97.8
加水分解	Phe-UL- ¹⁴ C /pH 9、25°C (5.0 ppm)	1	96.3															97.3	
		7	94.9															97.9	
		13.6	91.8															97.0	
		20.8	89.4																96.4
		30.1	80.4																92.1
		0	96.2																97.1
加水分解	Pyr-2- ¹⁴ C /pH 5、25°C (5.5 ppm)	8.1	94.5															98.5	
		14.8	93.2															98.5	
		19.8	91.6															98.5	
		30.1	88.1															97.5	

NA 分析せず、ND 検出せず

水中運命(水中光分解)		試験の概要		代謝・分解物											合計				
		標識位置/ pH、温度、濃度	日数	親化 合物	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10		M11	M12	その他	
Phe-UL- ¹⁴ C /pH 7 緩衝液、25°C (100.4 ppm)*		0	96.1															100	
		1	95.4																99.9
		2	93.6																99.7
		3	92.8																99.6
		4	92.6																99.6
		7	90.9																99.8
		8	89.9																99.8
		0	97.5																100
水中光分解		0.33	84.3															100.4	
		1	64.2															101	
		2	51.5															101.9	
		3	36.8															101.1	
		4	17.9															100.8	
5	13.5																100.6		
Phe-UL- ¹⁴ C /自然水、25°C (1.0 ppm)		0	94.4															100	
		0.33	88.0															101.1	
		1	72.6															99.3	
		2	53.0																100.3
		3	46.9																100
4	20.8																98.4		
5	11.0																101		

NA 分析せず、ND 検出せず
*緩衝液の値は、2 試験の平均

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。

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。

ホラムスルフロンの開発年表

	1995	2000	2005	2010
化合物創製				
委託試験				
毒性				
急性毒性				
亜急性				
慢性/催腫瘍性				
繁殖性				
催奇形性				
変異原性				
薬理				
神経毒性				
代謝				
動物				
土壌				
有用生物に及ぼす影響				
農薬残留量				