

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(3) ラットの脳、肝臓及び血液中における 標識イミシアホスの代謝 (資料 代 3)

試験機関:Ricerca Bioscience (米国)
[GLP 対応]

報告書作成年:2004年

供試標識化合物:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 1.162 GBq/mmol

供試動物: Crl:WI® (Glx/BRL/Han)BR 系ラット、8~9週齢、1群雌雄各3匹、
体重;雄 229~267 g、雌 163~181 g

試験目的: 本剤のラットを用いた体内運命試験(資料 代 2)において、標識体の体内残留量が
標識体残留量より若干多かったため、標識体を投与したラットにおける体内残留
放射能の特性について検討した。

試験方法:

投与; 0.75%メチルセルロース水溶液に懸濁した 標識体をラットに単回強制経口投与した。
投与量はラットを用いた代謝試験(資料 代2)と同じ、1 mg/kg (低用量)及び30 mg/kg
(高用量)とした。

試料採取及び分析; 標識体投与後ラットを個別の代謝ケージに収容して、尿は24時間、糞は
48時間採取した。投与後168時間(7日)に動物を腹大動脈切断により放血致死させ、脳、
肝臓及び血液を採取した。

脳及び肝臓は均質化した後、アセトン、メタノール及びメタノール:0.2%酢酸等量混合
液で抽出し、各抽出液及び抽出残渣中放射能量のLSC法による分析を行った。

血液は血漿と血球に分離し、血球を等張緩衝液で洗浄した後、血球を細胞膜、細胞液及び
ヘモグロビン画分に分け、細胞膜画分については脳及び肝臓と同様の抽出操作を行い、
各抽出液及び抽出残渣中放射能濃度をLSC法で測定した。

各抽出液について適当な精製を行い、HPLC分析に供した。また、抽出残渣は、ヘキサン
/水で分配し、水層濃縮物をプロテアーゼ及びアミラーゼで加水分解した後、LSC法に

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

より、遊離放射能の分析を行った。

採取した糞、尿及びカーカスについては分析を実施しなかった。

試験結果：

脳中放射能の分布；各群雌雄の脳中放射能及び溶媒抽出された放射能を表1に示す。

表1：脳中放射能 ($\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$) と分布 (投与量%)

投与量 (mg/kg) 及び性別	1		30	
	雄	雌	雄	雌
アセトン抽出物 (%)	5.61	6.62	5.16	3.69
メタノール抽出物 (%)	15.74	13.05	12.38	7.67
メタノール：酢酸抽出物 (%)	0.00	0.23	0.00	0.00
抽出残渣 (%)	78.65	80.09	82.46	88.63
総放射能 ($\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$)	0.014	0.010	0.251	0.223

各溶媒で抽出された放射能は総残留放射能TRRの11~21%であった。抽出された放射能が少なかったため、HPLC分析用に、全ての抽出物をプールしたが、濁りがみられ、HPLC分析には適さなかった。この抽出液にトリクロロ酢酸を添加したところ、沈殿が生じ、蛋白の含まれることが示唆された。この反応液を遠心分離して得られた上清には放射能は検出されなかった。この操作で得られた沈殿物のプロテアーゼ処理で沈殿物中放射能の76.6%が遊離した。

肝臓中放射能の分布；各群雌雄の肝臓中放射能及び溶媒抽出された放射能を表2に示す。

表2：肝臓中放射能 ($\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$) と分布 (投与量%)

投与量 (mg/kg) 及び性別	1		30	
	雄	雌	雄	雌
アセトン抽出物 (%)	1.11	1.27	2.36	2.59
メタノール抽出物 (%)	1.08	1.08	2.09	2.45
メタノール：酢酸抽出物 (%)	0.51	0.45	1.16	1.09
抽出残渣	プロテアーゼ処理 (%)			
	アミラーゼ処理 (%)	13.91		
	抽出残渣 (%)	7.88		
	小計 (%)	97.30	97.19	94.39
総放射能 ($\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$)	0.510	0.419	1.741	1.274

総残留放射能は、1 mg/kg 投与群では 0.419~0.510 $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、30 mg/kg 投与群では 1.274~1.741 $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ であった。残留放射能の93%以上が抽出残渣中から検出された。

肝臓の抽出残渣について、プロテアーゼによる加水分解を行ったところ、肝臓中放射能の75.51%が遊離した (表2)。プロテアーゼ処理後に残った残留放射能について、アミラーゼを用いて消化を行ったところ、さらに13.91%の放射能が遊離した (表2)。よって、抽出残渣中放射能は主に蛋白及び少量の炭水化物であることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

各溶媒抽出物を精製し、イオン対試薬に Nonafluoropentanoic acid を用いて HPLC 分析したところ、放射能成分の極性が高いことが示唆された (図 1)。 標識体の主要代謝物はこの分析法では極性領域に溶出するが、イオン対試薬に塩化 Tetrabutylammonium を使用すると C18 カラムに保持されることが知られているので、別の抽出物について、この試薬を用いて HPLC 分析を行ったが、放射能物質は再び極性領域に溶出した (図 2)。よって放射能物質は蛋白及び炭水化物のような中性の水溶性内因性物質であることが示唆された。

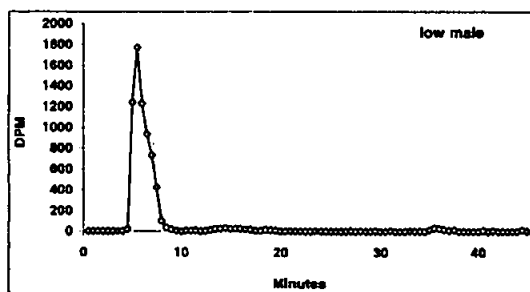


図 1: Nonafluoropentanoic acid を用いた HPLC クロマトグラム

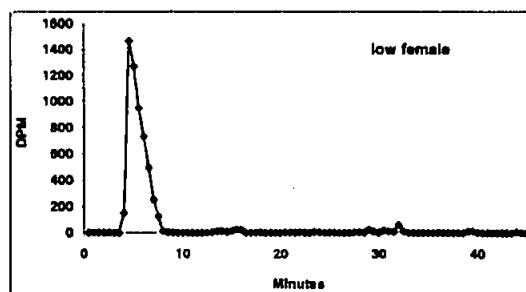


図 2: Tetrabutylammonium chloride を用いた HPLC クロマトグラム

抽出物について、さらに水及びヘキサンで分配し、得られた水溶性画分についてプロテアーゼ処理したところ、同様に多くの放射能が遊離し、蛋白の存在が示唆された。その結果を表 3 に示す。

表 3: プロテアーゼ処理で遊離した肝臓抽出物中放射能量 (投与量%)

投与量 (mg/kg) 及び性別	1	30
	雄	雌
HPLC 分析に適用した抽出物 (総抽出物に対する%)	57.37	22.91
ヘキサンに溶出した放射能 (%)	29.32	32.92
水溶性画分中でプロテアーゼによって遊離した放射能量 (%)	13.31	44.18

血液中放射能の分布; 各群雌雄の血液中放射能量及び溶媒抽出された放射能量を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表4：血液中放射能 (μg·eq/g) と分布 (投与量%)

投与量 (mg/kg) 及び性別		1		30		
		雄	雌	雄	雌	
血漿 (%)		33.04	47.29	30.68	44.15	
赤血球 (%)		66.96	52.71	69.32	55.85	
	細胞液 (%)	0.62	0.33	0.59	0.30	
	ヘモグロビン (%)	23.47	18.41	16.71	14.21	
細胞膜	アセトン抽出物 (%)	0.81	0.66	0.32	1.14	
	メタノール抽出物 (%)	0.49	0.23	0.46	1.27	
	メタノール：酢酸抽出物 (%)	3.26	1.90	2.67	6.49	
	抽出残渣	プロテアーゼ処理 (%)	31.31			
	抽出残渣 (%)	7.00				
	計	38.31	31.19	48.58	32.44	
総放射能 (μg·eq/g)		0.042	0.038	0.475	0.357	

血液中の総残留放射能は、0.038~0.042 ppm (1 mg/kg投与群) 及び0.357~0.475 ppm (30 mg/kg投与群) であった。群及び性別ごとにプールした血液試料を、血漿及び血球 (大部分が赤血球) に分離した。赤血球中の放射能は、TRRの52.71~69.32%であった。赤血球を細胞液、ヘモグロビン及び細胞膜に分画したところ、細胞液中残留量は、TRRの1%以下で、ヘモグロビン画分に最も多く、ついで細胞膜画分に多くの放射能が分布していた。

細胞膜画分から溶媒抽出された放射能は僅かであり、抽出残渣中放射能はTRRの31.19~48.58%を占めた。雄の低用量群の抽出残渣についてプロテアーゼ処理を行ったところ、TRRの31.31% (総抽出残渣の80%以上) が放出された。従って、細胞膜画分中の抽出残渣中放射能は、蛋白質として特徴付けられた。

以上の結果から、被験物質投与後7日に脳、肝臓及び赤血球中に残留する ¹⁴C 標識体由来の放射能は、大部分が蛋白質及び少量の炭水化物のような内因性成分に取込まれた放射能と特徴付けられた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

2. 植物体内運命に関する試験

(1) ^{14}C -イミシアホスを用いたトマトにおける植物代謝試験 (資料 代 4)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：2002 年

供試標識化合物：

^{14}C -イミシアホス

化学名：

ロット番号：

放射化学的純度：

比放射能： 3.22 MBq/mg

^{14}C -イミシアホス

化学名：

ロット番号：

放射化学的純度：

比放射能： 3.81 MBq/mg

供試植物：トマト (品種 Bush Beefstake)

試験方法：

トマトの栽培及び放射能標識体の処理：

同位体希釈した放射能標識体を、粒剤の基材である珪砂に 1% の割合で混合し、ホモジナイザーを用いて均一な水懸濁液を調製した。

11 インチの鉢に土壌を入れ、その上部 20 cm の土壌と被験物質の懸濁液を均一に混合し、直ちにトマトの苗 (播種後 5 週間、4~5 葉期、高さ約 6 インチ) を移植した。

試験区、試験植物数及び試料採取時期を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 1：試験区、処理標識体、処理量及び試験植物体数

試験区	処理物質	処理量	植物体数
I	無処理	—	3
II	標識体	3 kg/ha	3
III	標識体	3 kg/ha	2

このトマト植物体を温室内で栽培し、必要に応じて施肥、灌水を行った。
試験に使用した土壌の特性を以下に示す。

表 2：トマト栽培に使用した土壌の特性

pH	7.3
有機物質 (%)	2.00
最大保水量(%、1/3Bar)	20.02
砂 (%)	16.0
シルト (%)	76.0
粘土 (%)	8.0
土性	シルト質壤土
比重	1.35

試料採取；被験物質処理及び移植後 31 日に各区から 1 本の植物体全体（茎葉部）を採取した。

また、被験物質処理及び移植後 68 日に約半数の成熟した果実を採取し、その後 7 日に未成熟果実、成熟果実及び茎葉部を採取した。

試料調製及び分析；試料採取後、成熟果実について、ブレンダーで細断し、遠心分離して果汁と固形分（絞りかす）に分けた。果汁については LSC 法により、総放射量を測定、固形分については燃焼して生成した $^{14}\text{CO}_2$ を LSC 法で測定した。成熟期に採取した茎葉部については、ドライアイスとともにホモジナイズし、燃焼して、生成した $^{14}\text{CO}_2$ を LSC 法で測定した。図 1 に試料調製法を示した。

果汁画分については、そのまま HPLC 分析に供し、固形物画分及び茎葉画分については、アセトニトリル：水及び水で抽出し、HPLC 分析を行った。また、必要に応じて、酸及び酵素加水分解処理を行った。代謝物の同定には HPLC による標準品との比較の他、LC/MS 及び TLC 分析を行った。但し、試験では成熟果実及び成熟期茎葉試料について分析を行い、その他は分析せず凍結保存した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

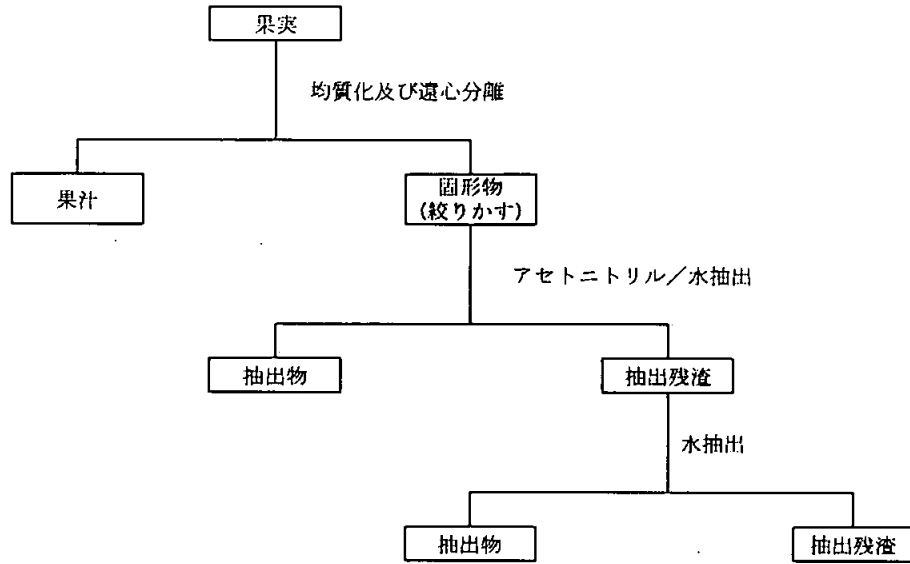


図 1：果実試料の試料調製フローチャート

試験結果：

放射能残留量；燃焼法で求めた果実及び茎葉部試料中放射エネルギー及び土壌に処理した放射エネルギーに対する割合を表 3 に示す。

表 3：果実及び茎葉試料中放射エネルギー

試料採取時期	対 照	標識体	標識体
成熟果実 (第 1 回収穫)	0.002 (-)	0.128 (0.12)	0.056 (0.04)
成熟果実 (第 2 回収穫)	0.001 (-)	0.097 (0.06)	0.051 (0.05)
未成熟 茎 葉	0.004 (-)	3.838 (0.37) ^{a)}	2.925 (0.23) ^{a)}
成熟茎葉	0.008 (-)	0.766 (1.11)	3.773 (9.31)

上段：放射能残留量 (mg·eq/kg)、下段：処理量に対する割合 (%)、
^{a)}：申請者の計算値

果実中に検出された総放射能は土壌処理した放射能のごく一部にすぎず、その割合は 0.04%～0.12%であった。対照区のトマト果実及び茎葉からも微量の放射能が検出された。これは土壌中に処理した被験物質が土壌中で分解されて生じた ¹⁴C¹⁴O₂ を対照区の植物体に取り込んだ為と考えられる。

果実及び茎葉部における放射能の分布；

成熟したトマト果実中放射能の分布を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 4：成熟トマト果実中放射能の分布

		標識体		標識体	
		第 1 回収穫	第 2 回収穫	第 1 回収穫	第 2 回収穫
果汁（水溶性画分）		58.1 (0.074)	67.1 (0.065)	79.1 (0.044)	79.5 (0.040)
固形物 (絞りかす)	アセトニトリル/ 水抽出	13.9 (0.018)	12.4 (0.012)	14.3 (0.008)	13.0 (0.007)
	水抽出	0.5 (0.001)	2.3 (0.002)	0.0 (0.000)	0.0 (0.000)
	小 計	14.5 (0.019)	14.7 (0.014)	14.3 (0.008)	13.0 (0.007)
	抽出残渣	27.4 (0.035)	18.2 (0.018)	6.6 (0.004)	7.5 (0.004)
	固形物中放射能 ^{b)}	41.9 (0.054)	32.9 (0.032)	20.9 (0.012)	20.5 (0.011)
	固形物中放射能 ^{c)}	40.5 (0.051)	32.6 (0.031)	20.5 (0.011)	19.8 (0.010)
果実中放射能		100.0 (0.128)	100.0 (0.097)	100.0 (0.056)	100.0 (0.051)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、^{b)}：抽出物及び抽出残渣の合計値、^{c)}：固形物の燃焼分析による測定値

成熟した果実中放射能の大部分（TRR の 72.6～93.4%）が果汁及び固形物のアセトニトリル：水抽出液中から回収された。果汁を除いた固形物から抽出された放射能量は総残留量の 13.0～14.7%、抽出されなかった放射能は 標識体で総残留量の 18.2～27.4%、 標識体で 6.6～7.5%であった。

成熟期茎葉試料中放射能の分布を表 5 に示す。

表 5：成熟トマト茎葉試料中放射能の分布

	標識体	標識体
アセトニトリル/水抽出	66.9 (0.571)	90.4 (3.421)
水抽出	4.6 (0.039)	1.9 (0.071)
抽出残渣	28.5 (0.243)	7.7 (0.293)
総残留量 ^{d)}	100.0 (0.853)	100.0 (3.785)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、^{d)}：抽出放射能量と抽出残渣中放射能の合計

抽出物中放射能成分の分析：成熟果実中放射能の HPLC による分析結果を表 6、7 に、成熟期茎葉中放射能の HPLC 分析結果を表 8 示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 6： 標識体処理した成熟果実中放射能の HPLC 分析

	標識体第 1 回収穫			標識体第 2 回収穫		
	果 汁	固形物	計	果 汁	固形物	計
	58.1 (0.074)	14.5 (0.019)	72.6 (0.093)	67.1 (0.065)	14.5 (0.019)	81.6 (0.084)
	50.9 (0.065)	12.2 (0.016)	63.1 (0.081)	58.4 (0.057)	11.1 (0.014)	69.4 (0.071)
	ND	ND	ND	ND	0.7 (0.001)	0.7 (0.001)
	2.6 (0.006)	0.7 (0.002)	3.3 (0.008)	2.9 (0.006)	0.9 (0.002)	3.7 (0.008)
イミシアホス	4.6 (0.006)	1.6 (0.002)	6.2 (0.008)	5.9 (0.006)	1.9 (0.003)	7.8 (0.008)
	—	27.4 (0.035)	27.4 (0.035)	—	18.6 (0.018)	18.2 (0.018)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

表 7： 標識体処理した成熟果実中放射能の HPLC 分析

	標識体第 1 回収穫			標識体第 2 回収穫		
	果 汁	固形物	計	果 汁	固形物	計
	79.1 (0.044)	14.3 (0.008)	93.4 (0.052)	79.5 (0.040)	13.0 (0.007)	92.5 (0.047)
	32.8 (0.018)	6.4 (0.004)	39.2 (0.022)	36.4 (0.020)	6.2 (0.003)	42.6 (0.024)
	ND	0.2 (trace)	0.2 (trace)	ND	ND	ND
	ND	0.2 (trace)	0.2 (trace)	ND	ND	ND
	11.6 (0.006)	1.6 (0.001)	13.2 (0.007)	12.3 (0.007)	1.5 (0.001)	13.8 (0.008)
	3.2 (0.002)	0.9 (trace)	4.0 (0.002)	ND	ND	ND
	21.4 (0.012)	3.1 (0.002)	24.5 (0.014)	24.9 (0.014)	4.1 (0.002)	29.1 (0.016)
イミシアホス	10.1 (0.006)	2.0 (0.001)	12.1 (0.007)	5.4 (0.003)	2.5 (0.001)	7.9 (0.004)
	—	6.6 (0.004)	6.6 (0.004)	—	7.5 (0.004)	7.5 (0.004)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

標識体処理果実の果汁画分中放射能は成熟トマト中放射能の約 58~67% (0.065~0.074 mg·eq/kg)、 標識体処理果実の果汁画分では総放射能の約 79% (0.040~0.044 mg·eq/kg) を占めていた。

標識体処理試料の固形物から抽出された画分には、成熟トマト中の総放射能の約 14% (0.014~0.019 mg·eq/kg)、 標識体処理試料から抽出された画分では、約 13~14% (0.007~0.008 mg·eq/kg) が含まれていた。

トマト果汁及び固形物抽出液の HPLC 分析により、イミシアホスが 標識体では 0.008 mg·eq/kg (TRR の 6.2~7.8%)、 標識体では 0.004~0.007 mg·eq/kg (TRR の 8~12%) 含まれていた。 標識体処理果実から が 0.014~0.016 mg·eq/kg (TRR の 24~29%) 検出された。 が 標識体処理果実中に 0.008 mg·eq/kg (TRR の 3~4%)、 標識体処理果実中には 0.007~0.008 mg·eq/kg (TRR の 14%) 存在した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

以上の物質は HPLC における保持時間、LC/MS 分析等で標準品と一致することから同定された。その他に少量の未知ピークが認められたが、残留量が少なかったため、詳細な分析を実施しなかった。

表 8： 及び 標識体処理した成熟期茎葉中放射能の HPLC 分析

	抽出放射能								
標識体	92.3 (3.438)	11.3 (0.387)	5.9 (0.202)	3.7 (0.128)	76.0 (2.614)	3.1 (0.107)	痕跡	7.7 (0.293)	
	抽出放射能								
標識体	71.5 (0.610)	39.2 (0.335)	2.6 (0.023)	2.5 (0.022)	5.4 (0.092)	14.2 (0.121)	4.0 (0.034)	3.6 (0.031)	28.5 (0.243)

上段：%TRR、下段：mg·cq/kg、ND：検出限界以下

標識体処理した植物体茎葉部から、TRR の約 92%が抽出され、主要残留物はであった (76%TRR)。その他に、及び微量の が検出され、極性物質も 11.3% TRR 検出された。

標識体処理した植物体茎葉部からは、TRR の 71.5%が抽出され、抽出残渣が 28.5% TRR あった。主要残留物は で、その他に、その他の未同定物質が検出された。

極性物質の分析；HPLC カラムに保持されない極性物質中に、果汁から抽出された放射能の約 80% (標識体) または 40% (標識体) が検出された。HPLC で単離したこの極性物質画分を用いて、酸及びβ-Glucosidase による加水分解処理を行った。以下に示すように、 標識体試料の酸加水分解では と類似した保持時間にマイナーなピークの成分も認められたが、これらの加水分解処理によって、有意な HPLC クロマトグラムの変化は認められなかった。

図 2： 標識体処理果汁中極性物質の酸加水分解

図 3： 標識体処理果汁中極性物質の酵素加水分解

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

図 4 : 標識体処理果汁中極性物質の酸加水分解

図 5 : 標識体処理果中極性物質の酵素加水分解

図 2~5 に示すように、加水分解処理では有意な変化がみられなかったため、次に極性物質画分のイオン交換クロマトグラフィーによる分析を行った。その結果を表 9 に示す。

表 9 : 果汁中極性物質のイオンクロマトグラム

	標識体	標識体
中性物質	43.6 (0.0425)	28.5 (0.0157)
陰イオン物質	14.0 (0.0137)	5.5 (0.0030)
陽イオン物質	0.8 (0.0008)	2.4 (0.0013)
計	58.4 (0.057)	36.4 (0.020)

上段 : %TRR、下段 : mg·eq/kg

その結果、いずれの標識体処理果実中極性画分の放射能も約 80%が中性物質と特徴付けられた。このことより、試験に使用したイミシアホスに由来する ^{14}C 物質の糖などの植物体成分への取り込みが考えられた。

これを確認するために、試料の極性画分中に存在する糖質を結晶性付加生成物に変換した。その反応系を図 6 に示す。即ち、標識体と標識体の果実試料の極性画分中のグルコース、フラクトース及びサッカロースの混合物を酸により加水分解し、さらにソルビトール及びマンニトールに分解した。これらのアルジトールを酸化してホルムアルデヒドと蟻酸に変換し、これに dimedone を反応させた。この再結晶化した生成物は

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

放射能を有していた。それぞれの標識体処理試料から得られた結晶性付加生成物がホルムアルデヒドの dimedone であることが DEP/EI/MS 分析によって確認された。このことから、イミシアホスが単純な成分に分解され、植物の炭素プールに入り、植物体で生成される天然産生物中に取り込まれることが明らかになった。

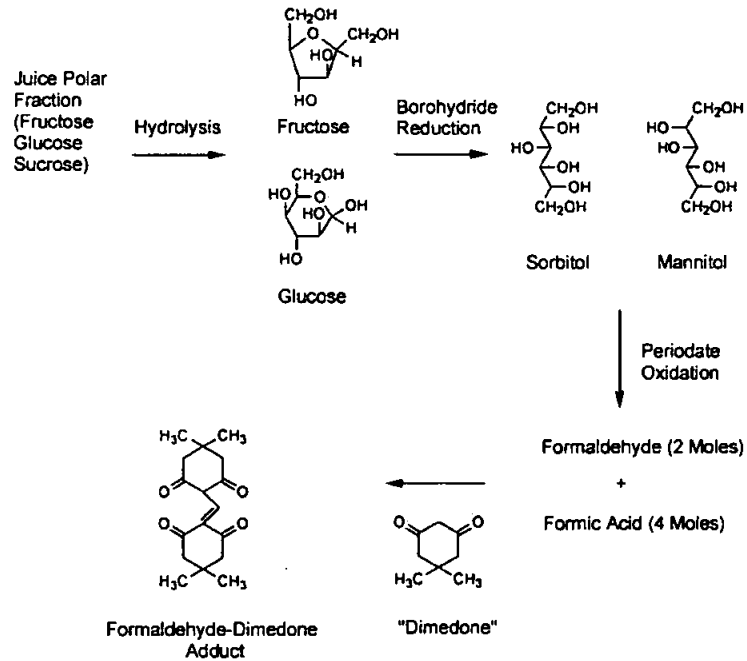


図 6 : トマト果汁中極性物質から Dimedone 付加体を形成する反応図

追加分析；ラットを用いた動物体内運命試験（資料 代 2）において、イミシアホスの基本骨格である CC1=C(C)C(=O)C=C1 の水酸化物が検出されたため、植物でも同一の水酸化が起こることを確認するための追加分析を行った。放射能量の多い未成熟茎葉試料から、放射能を抽出し、HPLC 分析及び質量分析を行った。その結果、茎葉試料中に CC1=C(C)C(=O)C=C1 の存在することが確認された。

図 7 : 茎葉試料抽出物と 標品の HPLC クロマトグラム

以上の結果を以下に要約する：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

[¹⁴C]イミシアホスを土壌に混入して、トマトを移植した場合、少量の ¹⁴C 物質が根から吸収され、果実に移行するが、果実中放射能の多くは極性画分に存在、未変化の親化合物は 0.004～0.008 mg·eq/kg に過ぎなかった。

主要代謝物は (TRR の 24.5～29.1%、0.014～0.016ppm) 及び (TRR の 3.3～13.8%、0.007～0.008 mg·eq/kg) であった。茎葉試料抽出物中に少量の の存在が確認された。

極性物質の酸及び酵素加水分解では、有意な変化がみられず、その後に実施したイオン交換クロマトグラフィー及び糖類の酸加水分解物の結晶性付加物質への変換の結果から、被験物質が広範囲な代謝を経て小さな分子に分解され水溶性の天然産物に取り込まれることが明らかにされた。

トマトにおけるイミシアホスの推定代謝経路を以下に示す。

図 7：トマトにおけるイミシアホスの想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(2) [¹⁴C-]イミシアホスを用いた馬鈴薯における植物代謝試験

(資料 代 5)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

供試標識化合物:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 3.31 MBq/mg

供試植物: 馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)、品種は Charlott、化学物質を処理していない種イモを入手し、試験に使用した。

試験方法:

馬鈴薯の栽培及び放射能標識化合物の処理;

化学物質の処理されていない砂壌土を 4 個の容積 70 L のプラスチック容器に入れ、うち、3 個の容器の表層 15 cm の土壤に放射能標識した被験物質の水溶液を空製剤 (粒状珪砂) に懸濁して 1% 製剤とし、3.04 kg/ha の割合で処理した。残りの 1 個の容器は無処理対照とした。発芽した種イモを被験物質処理後直ちに植え付け、野外で栽培した。栽培期間中は必要に応じて灌水した。試験土壤の土性は以下の通りであった;

表 1: 試験植物栽培に使用した土壤の特性

土壤入手先	J Arthur Bower (Lincoln, Lincolnshire)	
pH	7.2	
粒子径	2000~63 μm	77 %
	63~2 μm	11 %
	<2 μm	12%
土壤分類 (UK)	砂壌土	
有機炭素	4.1 %	
有機物	7.1 %	

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

栽培期間中（2002年6月～9月）の気象条件は以下の通りであった；

月	平均温度（℃）			総降水量 （mm）	平均湿度 （概略%）
	平均	最高	最低		
6月	20	21	7	1	35
7月	20	24	10	137	64
8月	22	26	13	117	70
9月	21	26	10	36	67

馬鈴薯の塊茎及び茎葉部の試料採取は植え付け後57日（未熟期：葉展開期）及び79日（成熟期：収穫適期）に行った。試料採取時には栽培土壌も同時に採取した。未熟期茎葉部の分析は実施しなかった。

試料調製及び分析；

試料調製法概要を図1に示す。植物試料はドライアイス中で均質化し、アセトニトリル：水（80：20）、水及びアセトンで抽出した。抽出物をプールして、溶媒を除き、メタノール／水に再溶解してHPLC法及びTLC法で分析を行った。また、必要に応じて還流抽出法や酸・酵素を用いた加水分解処理等を実施した。放射エネルギーは必要に応じて燃焼処理した後、LSC法で分析した。

土壌試料については、メタノール：水：10M NaOH、20：1：1で抽出した。抽出液中放射エネルギーはLSC法で、抽出残渣中放射エネルギーは燃焼処理後、LSC法で分析した。各段階における液体抽出物を遠心分離により、残渣と分け、LSC法で分析した。土壌の抽出残渣中放射エネルギーについては燃焼処理後LSC法による分析を行った。土壌抽出物についてはHPLC法及びTLC法による分析に供した。

代謝物の同定は合成標品とのHPLCにおける保持時間の比較及びTLC並びにLC/MS及びLS/MS/MSにより行った。

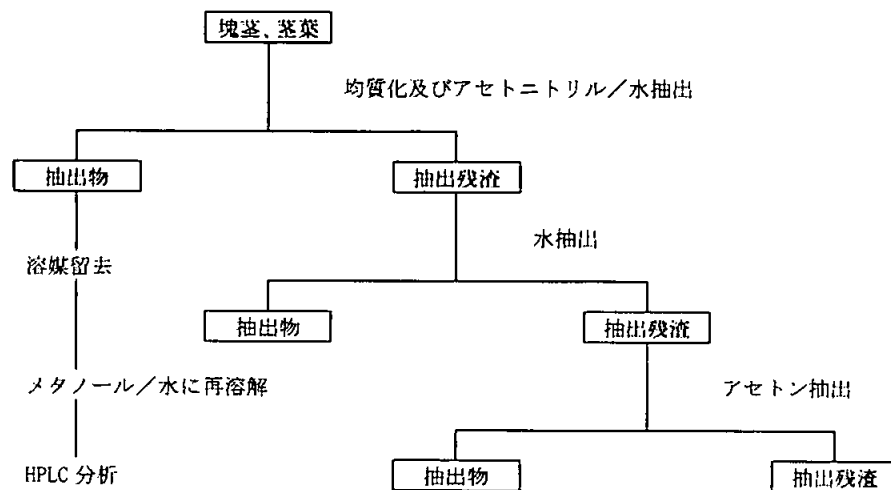


図1：塊茎及び茎葉試料の分析フローチャート

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

試験結果：

放射能残留量；

未熟期塊茎、成熟期塊茎、成熟期茎葉部試料中放射能の分布を以下に示す。

表 2：塊茎及び茎葉部試料中放射能分布

試料	アセトニトリル/水抽出	水抽出	アセトン抽出	抽出残渣	総残留放射能
未熟期塊茎	97.1 (0.027)	ND	ND	2.9 (0.001)	100.0 (0.028)
成熟期塊茎	96.8 (0.027)	ND	ND	3.2 (0.001)	100.0 (0.028)
成熟期茎葉部	89.3 (0.346)	1.7 (0.007)	ND	9.0 (0.035)	100.0 (0.388)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、

被験物質処理した馬鈴薯の未熟期及び成熟期塊茎には両者とも 0.028 mg·eq/kg の放射性残留物が認められた。アセトニトリル：水抽出により、両試料から約 97%の放射能が抽出された。水及びアセトン抽出ではそれ以上抽出されず、2.9～3.2%の放射能が抽出残渣中に留まった。

被験物質処理した馬鈴薯の成熟期茎葉部には 0.388 mg·eq/kg の放射能残留物が検出された。アセトニトリル：水抽出により 89.3%が抽出され、水抽出ではさらに 1.7%が抽出された。アセトン抽出ではそれ以上抽出されず、9.0%の放射能が抽出残渣中に残った。対照の馬鈴薯の塊茎及び茎葉部には検出可能な放射能は含まれていなかった。

抽出物中放射能成分の分析；

塊茎及び茎葉部のアセトニトリル/水抽出物について HPLC 分析を行った。その概要を以下に示す。

表 3：塊茎及び茎葉部試料からアセトニトリル/水抽出物で抽出された放射能の HPLC 分析

試料	抽出放射能	イミシアホス							
未熟期塊茎	97.1 (0.011)	38.5 (0.011)	6.3 (0.002)	4.7 (0.001)	10.8 (0.003)	5.4 (0.002)	15.3 (0.004)	ND	14.5 (0.004)
成熟期塊茎	96.8 (0.007)	25.3 (0.007)	4.2 (0.001)	1.2 (<0.001)	4.2 (0.001)	4.8 (0.001)	49.8 (0.014)	ND	5.4 (0.001)
成熟期茎葉部	89.3 (0.346)	7.9 (0.031)	1.4 (0.006)	ND	7.6 (0.029)	1.6 (0.006)	36.5 (0.142)	25.9 (0.100)	6.0 (0.023)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、

イミシアホスの濃度は未熟期塊茎では TRR の 38.5%、成熟期塊茎では 25.3%であった。HPLC カラムに保持されない非保持成分は未熟期塊茎中で 15.3%、成熟期塊茎中で 49.8%で検出された最も多い分解生成物であった。また、
がマイナーな代謝物として検出された。これらの代謝物の濃度は未熟期塊茎中でそれぞれ 6.3、4.7、10.8 及び 5.4%、成熟期塊茎中では 4.2、1.2、4.2 及び 4.8%であった。その他に未知の分解生成物が未熟期及び成熟期塊茎からそれぞれ 14.5%及び 5.4%検出され

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

たが、個々はいずれも TRR の 10%以下または 0.010 mg·eq/kg 以下であった。
 成熟期茎葉部中のイミシアホスは TRR の 7.9%であった。塊茎と同様に、非保持成分が 36.5%を占め、検出可能な最も多い分解生成物であった。さらに、TRR の 25.9%を占める保持時間 29 分の未知物質ピークも認められた。も検出された。それらの濃度はそれぞれ TRR の 1.4、7.6 及び 1.6%であった。その他に未知の分解生成物が 6.0%検出されたが、個々はいずれも TRR の 10%以下または 0.010 mg·eq/kg 以下であった。

以上の代謝物については、TLC でも標準物質と一致することが確認された。
 非保持成分の酸加水分解及び酵素処理；成熟期塊茎の非保持成分の領域について HPLC 及びフラクションコレクターを用いて単離し、以下のように酸及び酵素処理を行った後、さらに HPLC 分析を行った：

- ・ 2M 塩酸、60°Cで約 16 時間
- ・ β-グルコシダーゼ 0.1M 酢酸ナトリウム溶液、pH 5、37°Cで約 16 時間
- ・ 対照は 0.1M 酢酸ナトリウム処理 (pH 5、37°Cで約 16 時間)

その結果は以下の通りであった：

表 4：酸及び酵素加水分解処理した極性物質の HPLC 分析

	放射能	イミシアホス					
2M 塩酸	49.8 (0.014)	1.7 (<0.001)	3.0 (0.001)	28.9 (0.008)	ND	12.5 (0.004)	3.4 (0.001)
β-glucosidase		ND	3.2 (0.001)	26.4 (0.007)	1.1 (<0.001)	10.5 (0.003)	7.2 (0.001)
対 照 (0.1M 酢酸ナトリウム)		ND	3.1 (0.001)	25.4 (0.007)	1.2 (<0.001)	9.6 (0.003)	9.9 (0.003)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

酸及び酵素処理の結果、成熟期塊茎中の非保持放射能成分は主に を遊離する であることが示唆された。 は対照処理区でもみられたことから、 の は弱い結合であることが示唆された。

非保持成分について、さらに検討を行った。即ち、非保持成分の多かった成熟期茎葉部試料を用い、非保持成分領域は HPLC 及びフラクションコレクターを用い採取した。この画分について、グラファイトカーボンカラム及び HPLC を用いて分析したところ、TRR の 10%以下または 0.050 mg·eq/kg 以下の濃度の、少なくとも 11 種の異なる成分で構成されていることが示唆された。これらの成分について、さらに LC-MS 分析により検討したが、各成分の個別ピークを捕捉する事はできなかった。

成熟期茎葉部試料中にみられた保持時間 29 分の未同定物質は、単離して、β-グルコシダーゼ処理することにより、保持時間が明らかに移動することが判明し、グルコース抱合体であることが示された。遊離した成分の HPLC 保持時間は 標品の保持時間と一致したほか、LC/MS/MS でも一致し、 と同定された。このことから未知物質が

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

であることが確認された。

処理土壌の分析；

未熟期及び成熟期植物体試料採取時に同時に採取した土壌について、アセトニトリル/水、水による抽出後、メタノール：水：10 M 水酸化ナトリウムで振とう抽出した。各抽出段階における放射能成分の抽出割合及び HPLC 分析による抽出物中親化合物の割合を下表に示す。

表 5：試験植物栽培に使用した土壌中放射能の分布及び HPLC 分析

試料	抽出溶媒	抽出放射能	イミシアホス			
未熟期 土壌	アセトニトリル/ 水抽出	69.0 (0.478)	73.0 (0.506)	ND	2.7 (0.019)	1.2 (0.008)
	水	8.2 (0.057)	NA	NA	NA	NA
	メタノール/水/ NaOH抽出	19.1 (0.132)	ND	4.4 (0.030)	14.7 (0.101)	ND
	抽出残渣	3.7 (0.026)	NA	NA	NA	NA
	合計	100.0 (0.693)	73.0 (0.506)	4.4 (0.030)	17.4 (0.120)	1.2 (0.008)
成熟期 土壌 1	アセトニトリル/ 水抽出	63.7 (0.520)	61.8 (0.504)	ND	10.4 (0.085)	ND
	水	9.0 (0.073)	NA	NA	NA	NA
	メタノール/水/ NaOH抽出	22.7 (0.185)	ND	5.7 (0.046)	16.8 (0.137)	ND
	抽出残渣	4.7 (0.038)	NA	NA	NA	NA
	合計	100.0 (0.817)	61.8 (0.504)	5.7 (0.046)	27.2 (0.222)	ND
成熟期 土壌 2	アセトニトリル/ 水抽出	64.7 (0.388)	69.2 (0.415)	ND	3.6 (0.022)	1.1 (0.007)
	水	9.2 (0.055)	NA	NA	NA	NA
	メタノール/水/ NaOH抽出	20.9 (0.125)	ND	5.1 (0.030)	15.7 (0.094)	ND
	抽出残渣	5.2 (0.031)	NA	NA	NA	NA
	合計	100.0 (0.600)	69.2 (0.415)	5.1 (0.030)	19.3 (0.116)	1.1 (0.007)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、NA：未分析

未熟期植物体栽培土壌中総放射能残留量 TRR は 0.693 mg·eq/kg であった。アセトニトリル：水抽出により残留放射能の 69.0%が抽出された。水抽出では 8.2%、メタノール：水：10M 水酸化ナトリウム抽出で 19.1%が更に抽出され、抽出残渣中放射能量は 3.7%であった。

成熟期植物体 1 の栽培土壌中総放射能残留量は 0.817 mg/kg であった。アセトニトリ

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

ル：水抽出で 63.7%、水抽出で 9.0%、メタノール：水：10M 水酸化ナトリウム抽出で 22.7%が抽出され、4.7%の放射能が抽出残渣中に残存した。

成熟期植物体 2 の栽培土壌中総放射能残留量は 0.600 mg·eq/kg であった。アセトニトリル：水抽出で 64.7%、水抽出で 9.2%、メタノール：水：10M 水酸化ナトリウム抽出で 20.9%が遊離され、5.2%の放射能が抽出残渣中に残存した。対照容器の土壌からは検出可能な放射能は認められなかった。

未熟期植物体栽培土壌では TRR の 73.0%がイミシアホスであった。また、
が検出されが、その濃度はそれぞれ 4.4 及び 17.4%であった。

成熟期植物体 2 の栽培土壌中放射能の 69%がイミシアホスであった。また、
が検出された。それらの濃度はそれぞれ 5.1 及び 19.3%であった。その他の未知分解生成物が検出されたが、その濃度は TRR の 10%以下または 0.010 mg·eq/kg 以下であった。

以上の結果から、 標識体を土壌処理後、親化合物が土壌中または馬鈴薯塊茎中で 及び
に変換されることが示唆された。また、親化合物の 0 へ
の変換はマイナーな代謝経路として認められた。茎葉では主に と少
なくとも に代謝された。 への変換は茎葉でもマイ
ナーな経路として認められた。

代謝の推定経路を以下に示す：

図 1： 標識体の馬鈴薯植物体中における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(3) [¹⁴C-]イミシアホスを用いた馬鈴薯における植物代謝試験

(資料 代 6)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

供試標識化合物:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 3.61 MBq/mg

供試植物: 馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)、品種は Dunluce、化学物質を処理していない種イモを入手し、試験に使用した。

試験方法:

馬鈴薯の栽培及び放射能標識化合物の処理;

化学物質を処理されていない砂壤土を4個の容積70Lのプラスチック容器に入れ、うち、3個の容器の表層15cmの土壤に放射能標識した被験物質を3.04 kg/haの割合で処理した。残りの1個の容器は無処理対照とした。発芽した種イモを被験物質処理後直ちに植え付け、野外で栽培した。栽培期間中は必要に応じて灌水した。試験土壤の土性は以下の通りであった;

表1: 試験植物栽培に使用した土壤の特性

土壤入手先		J Arthur Bower (Lincoln, Lincolnshire)
pH		7.2
粒子径	2000~63 μm	77 %
	63~2 μm	11 %
	<2 μm	12 %
土壤分類 (UK)		砂壤土
有機炭素		4.1%
有機物		7.1%

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

栽培期間中（2003年4月～7月）の気象条件は以下の通りであった；

月	平均温度（℃）			総降水量 （mm）	平均湿度 （概略％）
	平均	最高	最低		
4月	13	18	6	37	77
5月	14	17	8	106	79
6月	17	23	11	52	76
7月	20	23	13	59	78

馬鈴薯の塊茎及び茎葉部の試料採取は植え付け後68日（未熟期）及び96日（成熟期）に行った。試料採取時には栽培土壌も同時に採取した。未熟期茎葉部の分析は実施しなかった。

試料調製及び分析；

試料調製フローチャートを図1に示す。植物試料はドライアイス中で粉体に成るまで均質化し、アセトニトリル：水（80：20）、水及びアセトンで抽出した。

抽出物をプールして、溶媒を除き、メタノール／水に再溶解してHPLC法及びTLC法で分析を行った。また、必要に応じて還流抽出法や酸・酵素を用いた加水分解処理等を実施した。放射エネルギーは必要に応じて燃焼処理した後、LSC法で分析した。

土壌試料については、アセトニトリル：水、80：20及び水で抽出した。抽出液中放射エネルギーはLSC法で、抽出残渣中放射エネルギーは燃焼処理後、LSC法で分析した。各段階における液体抽出物を遠心分離により、残渣と分け、LSC法で分析した。土壌の抽出残渣中放射エネルギーについては燃焼処理後LSC法による分析を行った。土壌抽出物についてはHPLC法及びTLC法による分析に供した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

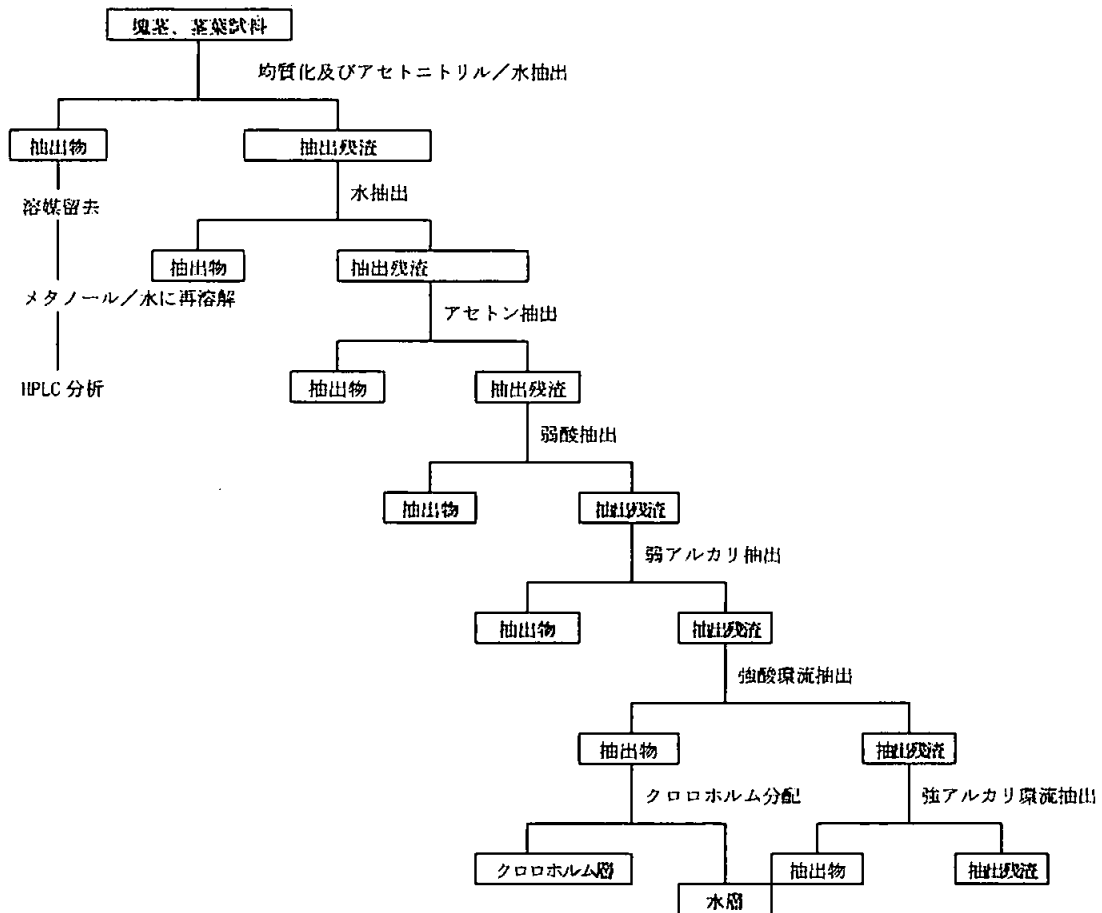


図1：塊茎、茎葉試料の分析フローチャート

試験結果：

放射能残留量；

未熟期塊茎、成熟期塊茎、成熟期茎葉部試料中放射能の分布を以下に示す。

表2：塊茎及び茎葉試料中放射能分布

試料	アセトニトリル/水抽出	水抽出	アセトン抽出	0.1M HCl抽出	0.1M NaOH抽出	2M HCl還流抽出	2M NaOH還流抽出	抽出残渣	総残留放射能
未熟期塊茎	63.4 (0.053)	2.9 (0.002)	ND	1.1 (0.001)	5.0 (0.004)	21.4 (0.018)	4.7 (0.004)	1.6 (0.001)	100.0 (0.084)
成熟期塊茎	55.1 (0.042)	3.7 (0.003)	ND	1.8 (0.001)	8.0 (0.006)	26.7 (0.020)	4.9 (0.004)	0.0 (<0.001)	100.0 (0.076)
成熟期茎葉部	83.2 (0.403)	2.3 (0.011)	1.1 (0.005)	1.1 (0.005)	3.1 (0.015)	NA	NA	9.1 (0.044)	100.0 (0.484)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、NA：未実施

被験物質処理した馬鈴薯の未熟期塊茎には 0.084 mg·eq/kg 量の放射能が含まれ、成熟期塊茎には 0.076 mg·eq/kg の放射能が含まれていた。アセトニトリル：水抽出により、

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

未熟期塊茎から残留放射能の 63.4%、成熟期塊茎から残留放射能の 55.1%が抽出された。水抽出では、未熟期及び成熟期塊茎からそれぞれ 2.9%及び 3.7%が抽出された。アセトン抽出では、残留放射能は抽出されなかった。その後の 0.1M 塩酸を用いた弱酸抽出では、未熟期及び成熟期塊茎からそれぞれ 1.1%及び 1.8%が抽出され、0.1M NaOH を用いた弱塩基抽出では未熟期及び成熟期塊茎からそれぞれ 5.0%及び 8.0%が抽出された。2M 塩酸及び 2M NaOH を用いた強酸及び強塩基による抽出では、未熟期塊茎で 21.4%及び 4.7%が遊離され、成熟期塊茎で 26.7%及び 4.9%が抽出された。未熟期塊茎における抽出残渣中残留放射能は 1.6%であり、成熟期塊茎に対する抽出残渣中残留放射能は、0.001 mg·eq/kg 以下であった。

被験物質処理した馬鈴薯の成熟期茎葉部には、0.484 mg·eq/kg の放射能が含まれていた。アセトニトリル：水抽出により 83.2%が抽出され、水抽出により 2.3%、アセトン抽出により 1.1%が抽出された。その後の弱酸及び弱塩基抽出により、それぞれ 1.1%及び 3.1%が抽出され、9.1%の放射能が抽出残渣中に残った。

無処理対照の茎葉部試料中からは微量 (<0.001mg·eq/kg) の放射能が検出されたが、塊茎試料からは放射能は検出されなかった。

抽出物中放射能成分の分析；

塊茎のアセトニトリル／水抽出物、茎葉部のアセトニトリル／水抽出物及び水抽出物について HPLC 分析を行った。その概要を以下に示す。

表 3：塊茎及び茎葉試料抽出物の HPLC 分析

試料	抽出放射能	イミシアホス					
未熟期塊茎	63.4 (0.053)	19.0 (0.016)	35.4 (0.030)	1.3 (0.001)	1.6 (0.001)	ND	3.0 (0.002)
成熟期塊茎	55.1 (0.042)	12.4 (0.009)	35.9 (0.027)	1.1 (0.001)	1.6 (0.001)	ND	1.7 (0.001)
成熟期茎葉部	85.5 (0.414)	13.1 (0.061)	3.7 (0.018)	ND	0.8 (0.004)	62.6 (0.303)	3.0 (0.015)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、

イミシアホスの濃度は未熟期塊茎では TRR の 19.0%、成熟期塊茎では TRR の 12.4%であった。HPLC における非保持成分は、未熟期塊茎中で 35.4%、成熟期塊茎中では TRR の 35.9%で、検出可能な最も多い放射性成分であった。また、
が微量検出された。これらの代謝物の濃度は、未熟期塊茎中でそれぞれ TRR の 1.3%及び 1.6%、成熟期塊茎中では 1.1%及び 1.6%であった。その他に未知の分解生成物が両試料中に TRR の 3.0%及び 1.7%検出された。

成熟期茎葉部中ではイミシアホスは、TRR の 13.1%で、塊茎と同様に、非保持放射能成分が認められたが、TRR の 3.7%であった。更に、塊茎では認められていない TRR の 62.6%を占める保持時間 29 分の未知物質が認められた。その他に
が TRR の 0.8%の濃度で検出されたが、
は検出されなかった。その他に微量の未知分解生

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

成物 1 個が検出された。これは TRR の 3 % 以下であったが、0.015 mg·eq/kg を含んでいた。

以上の代謝物については、TLC でも標準物質と一致することが確認された。

抽出液の酸加水分解及び酵素処理；

成熟期塊茎及び茎葉部試料中の非保持成分の内容及び RT29 分の未同定物質を検討するために、抽出物に対して以下のように酸加水分解及び酵素処理を行った；

- ・ 2M 塩酸、60°C で約 16 時間
- ・ β-グルコシダーゼ、0.1M 酢酸ナトリウム溶液、pH 5、37°C で約 16 時間
- ・ 対照は 0.1M 酢酸ナトリウム (pH 5)、37°C で約 16 時間

上記の処理後の抽出物の HPLC 分析結果を以下に示す。

表 4：酸及び酵素加水分解処理した塊茎及び茎葉試料中非保持成分の HPLC 分析

試料	処理	抽出物	イミシアホス				
成熟期茎葉部	β-glucosidase	85.5 (0.414)	15.1 (0.073)	59.1 (0.286)	3.8 (0.018)	5.4 (0.026)	1.3 (0.006)
成熟期塊茎	2M HCl	55.1 (0.042)	ND	NA	45.6 (0.035)	7.4 (0.006)	2.0 (0.002)
	β-glucosidase	55.1 (0.042)	12.5 (0.010)	NA	31.6 (0.024)	3.0 (0.002)	7.0 (0.006)
	対照 (0.1M 酢酸ナトリウム)	55.1 (0.042)	11.9 (0.009)	NA	33.3 (0.025)	2.4 (0.002)	6.5 (0.005)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、NA：未実施

各処理後の放射能残留物の分析結果は、成熟期茎葉部試料で ^{14}C が多く検出された点を除いて、対照と同等であり、各処理方法の非保持成分に対する影響はほとんどみられなかった。よって、塊茎試料抽出物中非保持成分は親化合物あるいは分解物の抱合体ではなく、親化合物が小分子に分解された成分であり、植物体成分に取り込まれた極性物質であることが示唆された。

このことを確認するために、デンプンの加水分解によって生成される ^{14}C グルコース及び ^{14}C マルトースの保持時間をアミノカラム及び炭水化物の分析条件を用いて検討した。その後、イミシアホスを処理した未熟及び成熟塊茎のアセトニトリル：水抽出物について同じ条件で分析を行った。その結果、非保持成分中には同様なクロマトグラフィー特性を示す未知の植物体成分と共にグルコース及びマルトースの存在することが判明した。この結果から、小分子への代謝分解並びに極性の植物体成分への取り込みの生じていることが推定された。

成熟期茎葉試料にみられた保持時間 29 分の未同定物質は β-グルコシダーゼ処理で生成した。このものは LC-MS 分析により、 ^{14}C が含まれていることが確認されている (資料 代 5)。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

処理土壌の分析；

未熟期及び成熟期植物体試料採取時に同時に採取した土壌について、アセトニトリル/水、水による抽出後、メタノール：水：1M 酢酸による還流抽出を行った。各抽出段階における放射能成分の抽出割合及び HPLC 分析による抽出物中親化合物の割合を下表に示す。

表 5：試験植物栽培に使用した土壌中放射能の分布及び HPLC 分析

	アセトニトリル/ 水抽出	水抽出	還流抽出	抽出残渣	総放射能量
未熟期土壌	70.1	6.5	8.2	15.2	100.0
	(0.426)	(0.040)	(0.050)	(0.092)	(0.608)
	75.5		3.9	—	79.4
成熟期土壌 1	64.7	5.3	7.6	22.4	100.0
	(0.471)	(0.038)	(0.056)	(0.163)	(0.729)
	68.9		6.3	—	75.2
成熟期土壌 2	63.2	5.9	7.9	22.9	100.0
	(0.431)	(0.040)	(0.054)	(0.156)	(0.682)
	68.9		6.3	—	75.4

上段：%TRR、中段：mg·eq/kg、下段：イミシアホス濃度 (%TRR)

未熟期植物体栽培土壌中総放射能残留量は 0.608 mg·eq/kg であった。アセトニトリル：水抽出により 70.1%が抽出され、その後、水で更に 6.5%が抽出された。還流抽出では、残留放射能の 8.2%が抽出され、15.2%の放射能が抽出残渣中に残存した。

成熟期植物体 1 栽培土壌中総放射能残留量は 0.729 mg·eq/kg であった。アセトニトリル：水抽出により 64.7%、水抽出では 5.3%が抽出された。その後の還流抽出では、7.6%が抽出され、22.4%の放射能が抽出残渣中に残存した。

成熟期植物体 2 栽培土壌中総放射能残留量は 0.682 mg/kg であった。アセトニトリル：水抽出により 63.2%、水抽出では残留放射能の 5.9%が抽出された。還流抽出では、さらに 7.9%が抽出され、22.9%が抽出残渣中に残存した。

対照植物体を栽培した土壌試料には、検出可能な放射能は含まれていなかった。

未熟植物体栽培土壌中 TRR の 79.4%はイミシアホスであった。成熟植物体 1 及び 2 栽培土壌では TRR の約 75%がイミシアホスであった。幾つかの分解物が検出されたが、TRR の 10%及び 0.010 mg·eq/kg を超えるものはなかった。

この試験結果から、土壌処理された 標識体は馬鈴薯塊茎中で代謝され、親化合物は小分子代謝物に分解され、グルコースやマルトースといった極性の植物体成分に取り込まれることが示唆された。馬鈴薯植物体茎葉部における主要代謝経路は親化合物の への変換であった。親化合物の への変換もマイナーな代謝経路として認められた。

想定代謝経路図を以下に示す：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

図 2 : 標識体の馬鈴薯植物体における想定代謝経路図

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(4) [¹⁴C]イミシアホスを用いたダイコンにおける植物代謝試験

(資料 代 7)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

供試標識化合物:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 3.31 MBq/mg

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

比放射能:

放射化学的純度: 98.3% (HPLC)

供試植物: ダイコン (*Raphanus sativus*)、日本より化学物質を処理していない種子を入手し、試験に使用した。

試験方法:

ダイコンの栽培及び放射能標識化合物の処理;

化学物質を処理されていない砂壌土 (UK 分類法) を 5 個の容積 70 L のプラスチック容器 (土壌面の面積 0.15 m²) に入れ、うち、標識体ごとに各 2 個の容器の表層 15 cm の土壌に空製剤 (粒状硅砂) に懸濁して 1% 製剤とした 標識体及び 標識体を混合して処理した。処理量は 3.04kg/ha 相当量とした。残りの 1 個の容器は無処理対照とした。処理後、種子を各容器に播種し、発芽後、各容器中植物体数を 9~10 個体に調整した。ダイコンの栽培容器は温室内で維持し、栽培期間中は必要に応じて灌水した。

試験土壌の土性は以下の通りであった;

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 1：試験植物の栽培に使用した土壌の特性

土壌入手先	J Arthur Bower (Lincoln, Lincolnshire)	
pH	7.2	
粒子径	2000~63 μm	77 %
	63~2 μm	11 %
	<2 μm	12 %
土壌分類 (UK)	砂壤土	
有機炭素	4.1%	
有機物	7.1%	

各容器に対する被験物質処理量は以下の通りであった；

表 2：試験区の構成及び被験物質処理量

試験区	栽培容器数	処理量 (mg/容器)	処理量 (g/ha)
標識体	2	44.85	2.99
標識体	2	45.35	3.02
無処理対照	1	—	—

栽培期間中 (2002 年 10 月~12 月) の気象条件は以下の通りであった；

表 3：試験に使用した植物の栽培期間中の温度

月	平均温度 (°C)		
	平均	最高	最低
10 月	21	27	12
11 月	15	21	10
12 月	17	21	11

ダイコンは各容器から播種後 47 日の葉展開期 (未熟期) に、各容器に 4 本の植物体を残すように、未熟期植物体を採取し、期待した大きさに達した成熟期 (播種後 90 日) に全ての植物体を採取した。また、成熟期植物体採取時に、栽培に使用した土壌も容器から採取した。

試料調製及び分析；

試料調製法フローチャートを図 1・2 に示す。植物試料は葉部と根部に分けて、それぞれをドライアイス中で均質化し、ドライアイス揮発させた後、アセトニトリル：水 (80：20)、水及びアセトンで抽出した。抽出物をプールして、溶媒を除き、メタノール／水に再溶解して HPLC 法及び TLC 法で分析を行った。また、必要に応じて還流抽出法や酸・酵素を用いた加水分解処理等を実施した。放射エネルギーは必要に応じて燃焼処理した後、LSC 法で分析した。

土壌試料については、メタノール：水：10M NaOH (20：1：1) で抽出した。抽出液

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

中放射能量は LSC 法で、抽出残渣中放射能量は燃焼処理後、LSC 法で分析した。各段階における液体抽出物を遠心分離により、残渣と分け、LSC 法で分析した。土壌の抽出残渣中放射能については燃焼処理後 LSC 法による分析を行った。土壌抽出物については HPLC 法及び TLC 法による分析に供した。

代謝物等の同定は主に標品との HPLC における保持時間の比較と TLC コクロマトグラフィーで行った。一部の代謝物は LC/MS でも同定した。

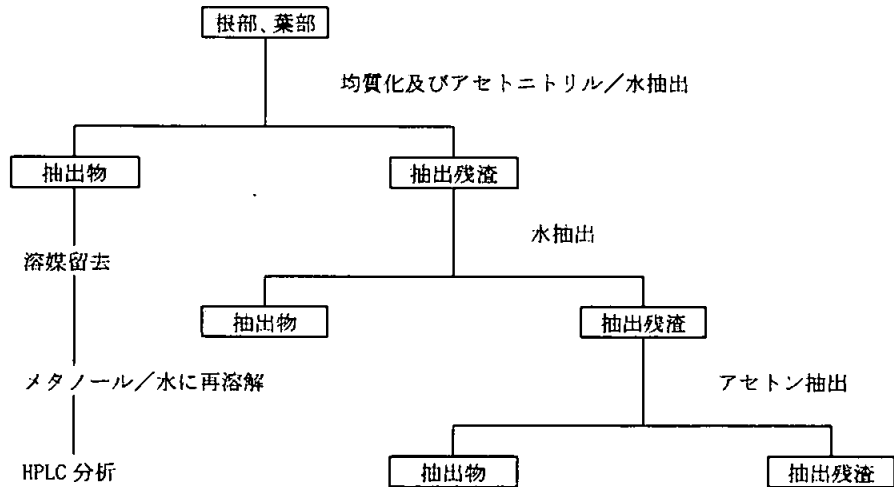


図 1： 標識体処理試料の分析フローチャート

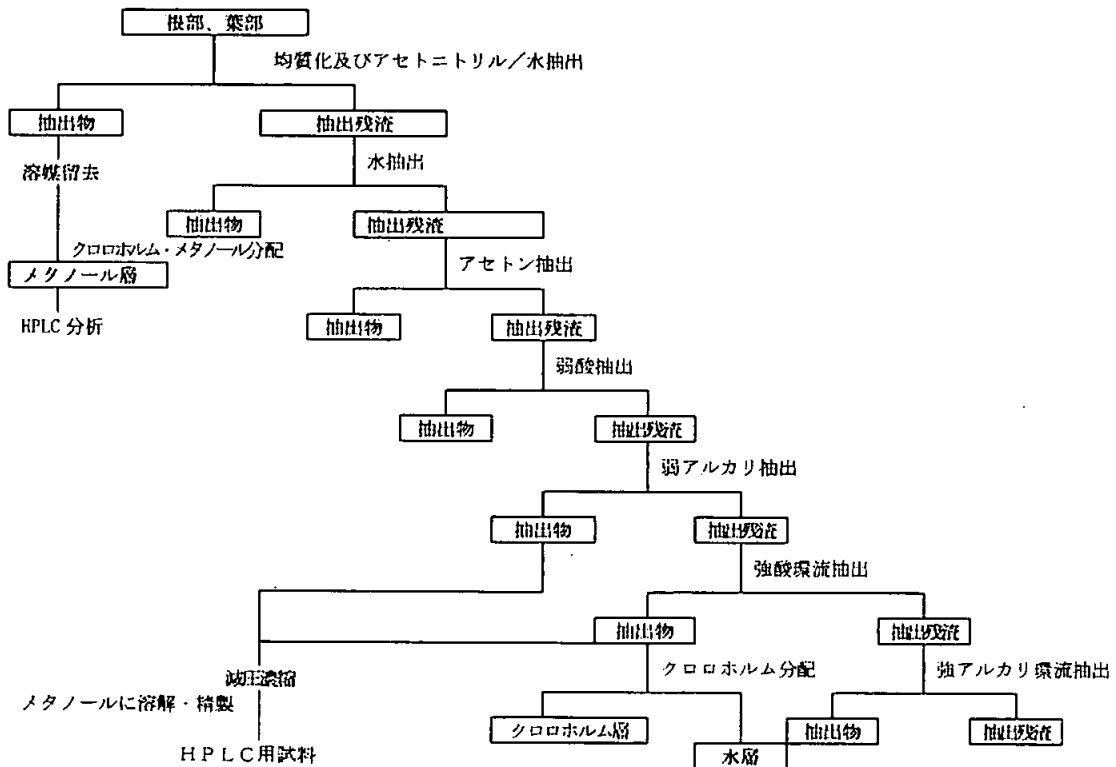


図 2： 標識体処理試料の分析フローチャート

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

試験結果：

放射能残留量；

未熟期及び成熟期の根部及び葉部中放射能量の分布を以下に示す。

表 4： 標識体処理区のダイコンにおける放射能残留量及び分布

処理化合物	試料の種類	アセトニル：水抽出物	水抽出物	アセトン抽出物	抽出残渣	総放射能量 (TRR)
標識体	未熟期根部	92.1 (0.042)	ND	ND	7.9 (0.004)	100.0 (0.045)
	成熟期根部	93.6 (0.037)	0.9 (<0.001)	ND	5.5 (0.002)	100.0 (0.039)
	未熟期葉部	93.3 (0.145)	1.6 (0.003)	ND	5.1 (0.008)	100.0 (0.155)
	成熟期葉部	91.5 (0.208)	1.4 (0.003)	0.6 (0.001)	6.5 (0.015)	100.0 (0.227)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

表 5： 標識体処理区のダイコンにおける放射能残留量及び分布

処理化合物	試料の種類	アセトニル/水抽出物	水抽出物	アセトン抽出物	酸・塩基抽出物		還流抽出物		抽出残渣	総放射能量 (TRR)
					0.1M HCl	0.1M NaOH	2M HCl	2M NaOH		
標識体	未熟期根部	64.7 (0.052)	2.6 (0.002)	2.2 (0.002)	NA	NA	NA	NA	30.5 (0.024)	100.0 (0.080)
	成熟期根部	72.4 (0.024)	2.3 (0.001)	ND	2.5 (0.001)	10.1 (0.003)	4.1 (0.001)	4.3 (0.001)	4.3 (0.001)	100.0 (0.033)
	未熟期葉部	62.3 (0.082)	4.5 (0.006)	1.3 (0.002)	3.6 (0.005)	16.2 (0.021)	6.9 (0.009)	5.2 (0.007)	1.3 (0.002)	100.0 (0.132)
	成熟期葉部	58.9 (0.089)	3.5 (0.005)	1.9 (0.003)	6.8 (0.010)	11.4 (0.017)	8.2 (0.012)	6.2 (0.009)	3.0 (0.005)	100.0 (0.151)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、NA：分析未実施

標識体を処理した未熟期ダイコンの根部から 0.045 mg·eq/kg の総残留放射能 TRR が検出された。残留放射能の 92.1% がアセトニル：水で抽出されたが、水及びアセトンでは放射能は抽出されず、7.9% の放射能が抽出残渣から検出された。成熟期ダイコン根部中総放射能残留量は 0.039 mg·eq/kg であった。TRR の 93.6% がアセトニル：水で、0.9% が水で抽出されたが、アセトンでは放射能は抽出されず、5.5% が抽出残渣から検出された。

標識体を処理した未熟期ダイコンの葉部から 0.155 mg·eq/kg の放射能が検出された。TRR の 93.3% がアセトニル：水で、1.6% が水で抽出されたが、アセトンでは抽出されず、5.1% が抽出残渣中に残留した。成熟期ダイコンの葉部には 0.227 mg·eq/kg の放射能が含まれていた。残留放射能の 91.5% がアセトニル：水で、1.4% が水で、0.6% がアセトンで抽出され、6.5% が抽出残渣中に残留した。

標識体を処理した未熟期ダイコンの根部から 0.080 mg·eq/kg の総残留放射能が検出された。残留放射能の 64.7% がアセトニル：水で、2.6% が水で、2.2% がアセトンで抽出され、30.5% が抽出残渣から検出された。成熟期ダイコンの根部から 0.033 mg·eq/kg の相当の放射能が検出された。TRR の 72.4% がアセトニル：水で、2.3% が水

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

で抽出されたが、アセトンでは抽出されなかった。さらに、残留放射能の 2.5%が弱酸 (0.1M HCl) で、10.1%が弱塩基 (0.1M NaOH) で抽出され、強酸 (2M HCl) 還流で 4.1%、強塩基 (2M NaOH) 還流で 4.3%が抽出され、最終的に抽出残渣中放射能量は 4.3%であった。

標識体を処理した未熟期ダイコンの葉部から 0.132 mg·eq/kg の放射能検出された。TRR の 62.3%がアセトニトリル:水で、4.5%が水で、1.3%がアセトンで抽出された。さらに、3.6%が弱酸で、16.2%が弱塩基で抽出され、強酸還流では 6.9%が、強塩基還流で 5.2%が抽出され、1.3%が抽出残渣中に残留した。成熟期ダイコンの葉部から 0.151 mg·eq/kg の放射能が検出された。TRR の 58.9%がアセトニトリル:水で、3.5%が水で、1.9%がアセトンで抽出され、6.8%が弱酸で、11.4%が弱塩基で抽出された。さらに 8.2%が強酸還流で、6.2%が強塩基還流で抽出され、3.0%が抽出残渣中に残留した。対照の成熟期ダイコンの根部から 0.003 mg·eq/kg の放射能が、葉部からは 0.006 mg·eq/kg の放射能が検出された。これは、試験用ダイコンをすべて同じ温室で栽培したため、標識体処理した土壌あるいは植物体中で生成された $^{14}\text{CO}_2$ が対照の植物体に取り込まれたためと考えられる。

抽出物中放射能成分の分析；

標識体処理区: 未熟期及び成熟期の根部及び葉部試料から抽出された放射能成分の HPLC 分析結果を下表に示す。

表 6: 標識体処理区のダイコンから抽出された放射能成分の HPLC 分析

試験化合物	分析部位	抽出溶媒	分析対象放射能量	イミシアホス					
標識体	成熟期根部	アセトニトリル/水抽出物	93.6 (0.037)	44.0 (0.017)	ND	ND	47.1 (0.019)	ND	1.6 (0.001)
	未熟期葉部	アセトニトリル/水抽出物+水抽出物	94.9 (0.148)	ND	ND	28.4 (0.044)	61.0 (0.095)	3.9 (0.006)	ND
	成熟期葉部	アセトニトリル/水抽出物+水抽出物	92.9 (0.211)	ND	13.3 (0.030)	35.2 (0.080)	34.7 (0.079)	3.2 (0.007)	6.5 (0.014)

上段: %TRR、下段: mg·eq/kg、ND: 検出限界以下、

成熟期根部中 TRR の 44.0%がイミシアホスであり、非保持成分が 47.1%を占め、唯一の主要分解生成物であった。

未熟期葉部試料中に検出可能なイミシアホスは認められなかった。非保持成分が TRR の 61.0%を占めた。TRR の 28.4%に相当する が検出された。TRR の 3.9%を占める保持時間 29 分の未知物質ピークが検出された。

成熟期葉部試料中にはイミシアホスは検出されなかった。非保持成分が TRR の 34.7%を占めた。また がそれぞれ TRR の 35.2%及び 13.3%検出された。さらに TRR の 3.2% (0.007 mg·eq/kg) を占める保持時間 29 分の未知物質ピークが認められた。

成熟期根部試料抽出物中に認められた非保持成分について、無機酸及び β -Glucosidase

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

による以下の加水分解処理を行い、生成物の HPLC 分析を行った。
その結果を下表に示す。

表 7：加水分解処理方法

加水分解法	処理方法
酸加水分解	2M HCl、60°Cで約 16 時間処理
酵素加水分解	pH 5 の 0.1M 酢酸ナトリウム中で β -glucosidase を約 16 時間処理 (37°C)
対 照	pH 5 の 0.1M 酢酸ナトリウム中で約 16 時間処理 (37°C)

表 8： 標識体処理区のダイコン抽出物中非保持成分の加水分解物の HPLC 分析

試 験 化合物	加水分解処理	分析対象 放射能量				
標識体	2M HCl	47.1 (0.019)				
	β -glucosidase					
	対 照					

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg

加水分解対照処理試料を含めて、加水分解処理後の HPLC クロマトグラムに大きな差はみられなかったが、非保持成分は TRR の 47.1%から 15.1~17.8%に減少し、これに伴って TRR の 6.1~9.9%に相当する が生成された。この結果は、非保持成分には を遊離する極性物質が含まれていることを示唆している。 が対照処理試料でも検出されていることから、 の極性物質との抱合は弱い結合であると考えられる。この加水分解処理でも、非保持成分が TRR の 10%以上検出されたことから、非保持成分のグラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析を行った。この分析には、根部試料ではなく、非保持成分が多く認められた葉部抽出物を使用した。葉部抽出物を HPLC に反復注入して、保持時間 4 分までの溶出物を採取し、濃縮及び水に再溶解した後、グラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析に供した。その結果を下表に示す。

表 9： 標識体処理区のダイコン抽出物中非保持成分のグラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析

試 験 化合物	分析対象 放射能量					
標識体	52.0 (0.118)					

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

グラファイトカーボンカラムを用いる HPLC 分析では、 が検出され、その他に、TRR の 10%以下または 0.010 mg·eq/kg 以下の少なくとも 6 種のその他の成分も含まれることが示された。

なお、 標識体を処理した試験区の試料から検出された は LC-MS 分析によりそれぞれの標準品と一致することが確認された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

標識体処理区：未熟期及び成熟期の根部及び葉部試料から抽出された放射能成分の HPLC 分析結果を下表に示す。

表 10： 標識体処理区のダイコンから抽出された放射能成分の HPLC 分析

試験化合物	分析部位	抽出溶媒	分析対象放射能	イミシアホス				
標識体	成熟期根部	7ε-トリウム水	72.4 (0.024)	30.5 (0.010)	ND	41.3 (0.014)	ND	ND
		0.1M HCl+0.1M NaOH	12.6 (0.004)	ND	ND	ND	ND	11.4 (0.003)
		計	85.0 (0.028)	30.5 (0.010)	ND	41.3 (0.014)	ND	11.4 (0.003)
	未熟期葉部	7ε-トリウム水抽出物+水抽出物	66.8 (0.088)	ND	17.9 (0.024)	36.0 (0.047)	7.8 (0.010)	5.1 (0.006)
		0.1M HCl+0.1M NaOH	19.8 (0.026)	ND	ND	17.2 (0.023)	ND	2.5 (0.003)
		計	86.6 (0.114)	ND	17.9 (0.024)	53.2 (0.070)	7.8 (0.010)	7.6 (0.009)
	成熟期葉部	7ε-トリウム水抽出物+水抽出物	62.4 (0.094)	ND	15.0 (0.023)	33.0 (0.050)	8.6 (0.013)	5.3 (0.008)
		0.1M HCl+0.1M NaOH	18.2 (0.027)	ND	ND	15.3 (0.023)	ND	2.4 (0.004)
		計	80.6 (0.121)	ND	15.0 (0.023)	48.2 (0.073)	8.6 (0.013)	7.7 (0.012)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、

標識体処理区の成熟期根部試料中 TRR の 30.5% がイミシアホスであった。非保持成分は TRR の 41.3% を占めた。その他の未知分解物も検出されたが、個々にはいずれも TRR の 10% 以下または 0.010 mg·eq/kg 以下であった。

未熟期葉部試料中に検出可能なイミシアホスは認められなかった。非保持成分は TRR の 53.2% を占めた。また γ -HCH が検出された。その量は TRR の 17.9% であった。さらに、TRR の 7.8% を占める保持時間 29 分の未知物質ピークが検出された。

成熟期葉部試料中に検出可能なイミシアホスは認められなかった。非保持成分は TRR の 48.2% を占めた。また 15.0% に相当する γ -HCH が検出された。さらに、TRR の 8.6% を占める保持時間 29 分の未知物質ピークがあった。

成熟期根部試料中に検出された非保持成分の特性について、無機酸及び酵素処理することによって検討した。処理方法は 標識体試料の加水分解処理方法と同じであった。その結果を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 11: 標識体処理区のダイコンから抽出された非保持成分の加水分解物の HPLC 分析

試験化合物	加水分解処理	分析対象放射能			
標識体	2M HCl	41.2 (0.014)	38.4 (0.013)	ND	ND
	β -glucosidase		22.3 (0.008)	5.3 (0.002)	9.7 (0.003)
	対照		23.7 (0.008)	4.4 (0.001)	9.1 (0.002)

上段: %TRR, 下段: mg·eq/kg, ND: 検出限界以下

各処理後の HPLC クロマトグラムが類似しており、酵素加水分解処理及び対照処理試料において幾つかの未知物質ピークが検出されたが、加水分解処理による大きな効果は得られなかった。

標識体試料と同様に、薬部抽出試料を HPLC に反復注入して非保持成分を分取し、グラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析を行った。その結果を下表に示す。

表 12: 標識体処理区のダイコンから抽出された非保持成分のグラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析

試験化合物	分析対象放射能			
標識体	32.9 (0.050)	17.4 (0.026)	3.5 (0.005)	11.8 (0.019)

上段: %TRR, 下段: mg·eq/kg

グラファイトカーボンカラムを用いた HPLC 分析の結果は、標識体を処理した成熟期薬部試料中非保持成分が、多数の極性物質で構成されていることが示された。

以上の結果から、非保持成分は標識体は植物体中で小さな分子に分解され、生体成分に取り込まれている可能性が示唆された。そこで、本剤のトマトを用いた試験(資料 M4)で実証された糖類への取り込みと検証するために、 ^{14}C -グルコースと ^{14}C -マルトースについて、アミノカラムを用い、炭水化物分析用条件で検討した。標識体処理した成熟期根部試料のアセトニトリル:水抽出物についても同様にこの条件で分析した。そのクロマトグラムを以下に示す。

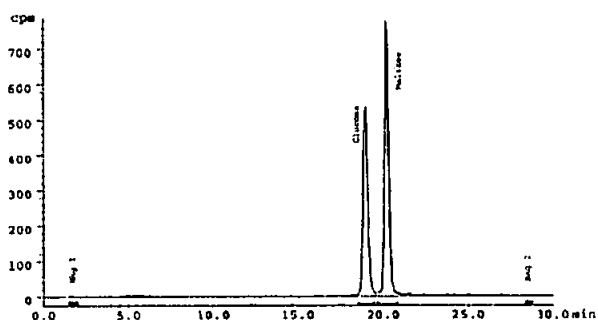


図 3: ^{14}C -glucose 及び ^{14}C -maltose の HPLC クロマトグラム (アミノカラム、炭水化物分析条件)

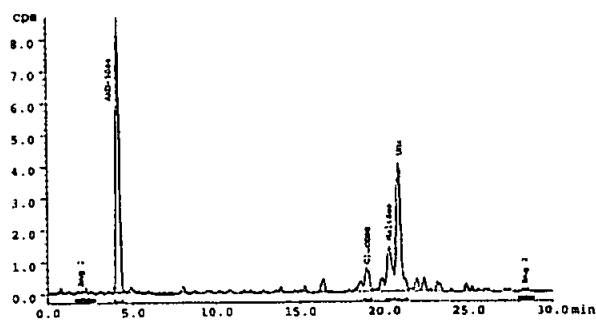


図 4: 根部抽出物の HPLC クロマトグラム (アミノカラム、炭水化物分析条件)

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

その結果、 標識体処理した成熟期根部試料中の非保持成分中には、グルコースやマルトースと保持時間の一致する成分の含まれていることが示された。

なお、 及び 標識体処理区の植物体に検出されている保持時間 29 分の未知物質ピークについては、別途 LC/MS 分析により であることが確認されている（資料 代 5）。

被験物質処理土壌の分析；未熟期及び成熟期植物体試料採取時に、同時に採取した土壌について、アセトニトリル/水及び水で振とう抽出し、さらにメタノール/水/10M NaOH あるいはメタノール/水/1M 酢酸を用いた還流抽出をおこなった。放射能の分布及び抽出物の HPLC 分析の結果を以下に示す。

表 13：IM 及び EP 標識体処理土壌中放射能の分布

試験化合物	採取時期	アセトニトリル:水抽出物	水抽出物	メタノール:水:10M NaOH 還流抽出物	メタノール:水:1M 酢酸還流抽出物	抽出残渣	総放射能量
標識体	未熟期	79.0 (0.829)	6.5 (0.068)	10.7 (0.113)	NA	3.7 (0.039)	100.0 (1.049)
	成熟期	68.0 (0.802)	8.4 (0.099)	18.0 (0.212)	NA	5.7 (0.067)	100.0 (1.180)
標識体	未熟期	71.6 (0.755)	6.1 (0.064)	NA	8.2 (0.087)	14.1 (0.149)	100.0 (1.055)
	成熟期	61.1 (0.495)	5.7 (0.047)	NA	9.7 (0.078)	23.5 (0.191)	100.0 (0.810)
対 照	成熟期	ND	100.0 (0.001)	NA	NA	ND	100.0 (0.001)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下、NA：分析未実施

標識体を処理した未熟期土壌には 1.049 mg·eq/kg の総残留放射能 TRR が検出された。79.0%がアセトニトリル：水で、6.5%が水で抽出され、10.7%がメタノール：水：10M 水酸化ナトリウム還流抽出で遊離し、3.7%が抽出残渣中に残留した。成熟期土壌からは 1.180 mg·eq/kg TRR が検出された。残留放射能の 68.0%がアセトニトリル：水で、8.4%が水で抽出され、18.0%がメタノール：水：10M NaOH 還流抽出で遊離し、5.7%が抽出残渣中に残留した。

標識体を処理した未熟期土壌には 1.055 mg/kg の総残留放射能が含まれていた。残留放射能の 71.6%がアセトニトリル：水で、6.1%が水で抽出された。さらに 8.2%がメタノール：水：1M 酢酸還流で抽出され、14.1%が抽出残渣中に残留した。成熟期土壌には 0.810 mg·eq/kg の TRR が含まれていた。残留放射能の 61.1%がアセトニトリル：水で、5.7%が水で抽出された。さらに 9.7%がメタノール：水：1M 酢酸還流で抽出され、23.5%が抽出残渣中に残留した。

対照土壌試料には 0.001 mg·eq/kg TRR が含まれていた。この放射能物質の分析は実施しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 14： 及び 標識体処理土壌抽出物の HPLC 分析

試験化合物	試料採取時期	抽出溶媒	分析対象放射能	イミシアホス			
標識体	未熟期	アセトニトリル/水+水	85.5 (0.897)	75.0 (0.787)	ND	10.5 (0.110)	ND
		メタノール/水/NaOH 還流	10.7 (0.113)	ND	4.5 (0.047)	6.2 (0.065)	ND
		計	96.2 (1.010)	75.0 (0.787)	4.5 (0.047)	16.7 (0.175)	ND
	成熟期	アセトニトリル/水+水	76.4 (0.901)	64.1 (0.756)	ND	11.5 (0.136)	ND
		メタノール/水/NaOH 還流	18.0 (0.212)	ND	3.0 (0.036)	14.9 (0.176)	ND
		計	94.4 (1.113)	64.1 (0.756)	3.0 (0.036)	26.4 (0.312)	ND
標識体	未熟期	アセトニトリル/水+水	77.7 (0.819)	77.4 (0.816)	ND	ND	ND
		メタノール/水/酢酸還流	8.2 (0.087)	8.0 (0.084)	ND	ND	0.2 (0.002)
		計	85.9 (0.906)	85.4 (0.900)	ND	ND	0.2 (0.002)
	成熟期	アセトニトリル/水+水	66.8 (0.542)	66.8 (0.542)	ND	ND	ND
		メタノール/水/酢酸還流	9.7 (0.078)	9.3 (0.075)	ND	ND	0.4 (0.003)
		計	76.5 (0.620)	76.0 (0.617)	ND	ND	0.4 (0.003)

上段：%TRR、下段：mg·eq/kg、ND：検出限界以下

標識体処理区の未熟期土壌中ではイミシアホスが TRR の 75.0% を占めた。

がそれぞれ TRR の 16.7% 及び 4.5% 検出された。

成熟期土壌中에서도イミシアホスが TRR の 64.1% を占める結果を示した。また、

がそれぞれ TRR の 26.4% 及び 3.0% 検出された。

標識体処理区の未熟期土壌中ではイミシアホスが TRR の 85.4% を占め、非保持成分は TRR の 1% 以下で、微量な分解物であった。成熟期土壌中에서도イミシアホスが TRR の 76.0% で、非保持成分は TRR の 1% 以下で、微量な分解物であった。

以上の結果から、土壌に処理したイミシアホス及びその代謝物は植物体に吸収され、親化合物の形態の他、代謝されて体内に分布するが、一部はさらに分解されて体内の炭素プールに取り込まれ、グルコースのような生体構成成分に再構成されることが明らかになった。

本試験におけるイミシアホスの想定代謝経路を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

図 5 : イミシアホスのダイコンにおける想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(5) 代謝物 のレタスにおける植物代謝試験

(資料 代 8)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

供試標識化合物:

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 6.45 MBq/mg

供試植物: レタス (*Lactuca sativa*)、品種は Benjamin、化学物質を処理していない種子を入手し、試験に使用した。

試験方法:

レタスの栽培及び放射能標識化合物の処理;

化学物質の処理されていない土壌を 3 個の容積 54 L のプラスチック容器に入れ、うち、2 個の容器の表層 15 cm の土壌に(¹⁴C)- を 1 mg/kg の割合で処理した。残りの 1 個の容器は無処理対照とした。

処理量はイミシアホスを 4 kg/ha 処理し、20cm の深さに均等に土壌と混和され、土壌比重が 1.00 で、処理したイミシアホスの全量が に転換された場合の土壌中濃度に相当する。

レタスの栽培に使用した土壌の特性を下表に示す。

表 1: 試験植物の栽培に使用した土壌の特性

土壌入手先	Homebase Ltd. (Harrogate, North Yorkshire)		
pH	6.4		
粒子径 (UK & BBA)	2000~63 μm	63~2 μm	<2 μm
	50 %	30 %	20 %
粒子径 (USDA)	2000~53 μm	53~2 μm	<2 μm
	48 %	32 %	20 %
土壌分類	壇壤土または砂質壇壤土 (UK) 壇土 (USDA)		
有機炭素	4.5%		
有機物	7.8%		

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

被験物質処理後、20℃で1週間恒温室内に放置した後、各容器に播種を行い、発芽後、健全な4株を残して間引きした。栽培は人工照明及び天然光併用のガラス温室で行い、必要に応じて灌水した。播種後77日に予定した大きさに達したので、被験物質処理区及び対照区のすべてのレタスを根部を残して収穫した。また、レタスを栽培した土壌についても同時に採取した。

栽培期間中（2002年12月～2003年2月）の温室内の温度を以下に示す。

年月	平均温度 (°C)		
	平均	最高	最低
2002年12月	15	19	9
2003年1月	21	26	14
2003年2月	24	31	13

試料調製及び分析：

植物試料は外側の損傷した葉を除いて、ドライアイス中で粉体になるまで均質化し、アセトニトリル：水（80：20）、水及びアセトンで抽出した。アセトニトリル：水抽出物について、さらに精製を行い、HPLC分析用試料とした。

土壌試料については、アセトニトリル：水（80：20）及び水で抽出し、抽出残渣についてメタノール：水：10M NaOH（20：1：1）による抽出を行った。アセトニトリル：水抽出物及びメタノール：水：10M NaOH抽出物について、さらに精製を行い、HPLC分析用試料とした。同時にTLC分析を行い、HPLC分析結果の確認を行った。

液体試料中放射能量はLSC法により測定、固体試料中放射能量は燃焼法により精製したCO₂をシンチラントに吸収させ、LSC法で測定した。

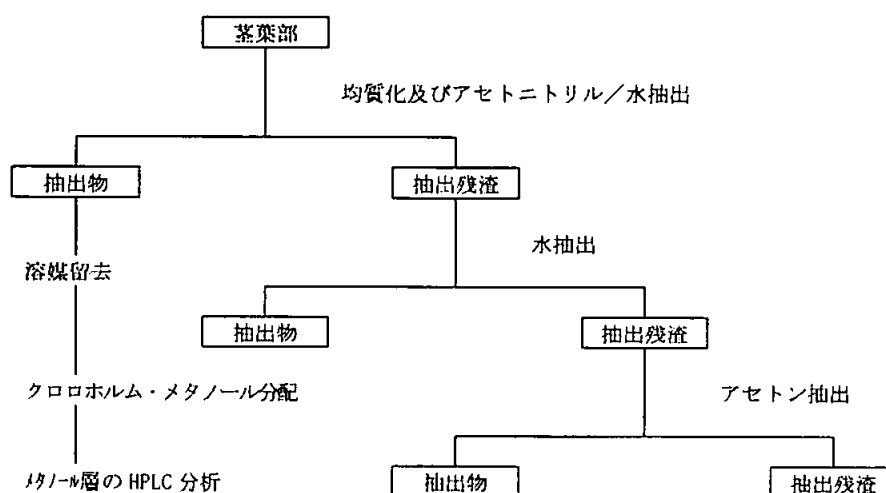


図1： 標識体処理試料の分析フローチャート

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

試験結果：

放射能残留量；

成熟期茎葉試料中放射能の分布を以下に示す。

表 2：茎葉試料中放射能の分布

	アセトニトリル/水 抽出	水抽出	アセトン抽出	抽出残渣	総残留放射能
処理区	98.0 (0.062)	ND	0.9 (0.001)	1.2 (0.001)	100.0 (0.064)
対照区	ND	ND	100.0 (0.001)	ND	100.0 (0.001)

上段：%TRR、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、ND：検出限界以下

処理区の成熟レタスの茎葉中 TRR は $0.064 \mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ であった。アセトニトリル/水抽出で残留放射能の 98.0% が抽出された。水抽出では残留放射能は抽出されず、アセトン抽出で 0.9% の残留放射能が抽出され、抽出残渣中放射能量は 1.2% であった。対照区の成熟レタスの茎葉からは $0.001 \mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ の放射能が検出された。

レタスの収穫時に同時に採取した土壤中放射能の分布を以下に示す。

表 3：試験植物栽培土壤中放射能の分布

	アセトニトリル/水 抽出	水抽出	メタノール/水/ NaOH 抽出	抽出残渣	総残留放射能
処理区	15.1 (0.122)	4.7 (0.037)	70.3 (0.564)	9.8 (0.079)	100.0 (0.802)

上段：%TRR、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、ND：検出限界以下

収穫時の土壤中には $0.802 \mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ の残留放射能が検出された。アセトニトリル/水抽出で 15.1% の残留放射能が抽出された。水抽出で 4.7% が抽出された。メタノール/水/10M NaOH 抽出で 70.3% が抽出され、9.8% の放射能が抽出残渣中に検出された。

抽出物中放射能成分の分析；

成熟期レタス茎葉試料のアセトニトリル/水抽出物並びに成熟期土壤のアセトニトリル/水及びメタノール/水/NaOH 抽出物について HPLC 分析を行った。その概要を以下に示す。

表 4：レタス茎葉抽出物及び土壤の HPLC 分析

	抽出法	抽出放射能		
成熟期レタス 茎葉部	アセトニトリル/水	98.0 (0.062)	90.2 (0.057)	7.8 (0.005)
成熟期土壤	アセトニトリル/水	15.1 (0.122)	15.0 (0.121)	ND
	メタノール/水/ NaOH	70.3 (0.564)	70.2 (0.563)	ND

上段：%TRR、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、ND：検出限界以下

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

レタス茎葉のアセトニトリル/水抽出物中には M6A が TRR の 90.2% 検出された。非保持成分は TRR の 7.8% であった。その他の分解物は検出されなかった。

成熟期に採取した土壌のアセトニトリル/水抽出物中には未変化の β -TRR が TRR の 15.0% 検出された。メタノール/水/10M NaOH 抽出物中には未変化の β -TRR が TRR の 70.2% 検出された。合計で β -TRR は TRR の 85.2% であった。その他の分解物は検出されなかった。

以上の結果から、土壌中でイミシアホスから生成された β -TRR は、レタスの根から吸収されるが、容易には代謝されず、一部が β -TRR に変化することが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

3. 土壌中運命に関する試験

(1) イミシアホスの好氣的土壌中運命試験

(資料 代 9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2002 年

供試標識化合物: [^{14}C]イミシアホス

化学構造:

化学名:

ロット番号:

比放射能: 981 MBq/mmol

放射化学的純度:

供試土壌: 砂壤土 (日本の茨城県牛久市の日本植物防疫協会試験圃場で採取した火山灰土壌) 及び壤質砂土 (米国オハイオ州マディソン市で採取した非火山灰土壌)。ISS 基準に基づく土壌特性を以下に示した。

表 1: 試験に使用した土壌の特性

土壌名	土壌分類	pH (H ₂ O)	砂 (%)	シルト質 (%)	粘土 (%)	有機物量 (%)	陽イオン交換容量 (mEq/100g)	最大保水量 (%、0 気圧)
日本	砂壤土	6.4	75	20	5	4.8	13.7	107.6
米国	壤質砂土	7.4	85	10	5	1.2	6.9	29.3

表 2: 試験に使用した土壌の微生物活性

土壌名	土壌分類	菌類 (CFU/g)	細菌類 (CFU/g)	グルコース消費量 (mg carbon/kg soil)
日本	砂壤土	1.3×10^5	2.4×10^7	72
米国	壤質砂土	6.0×10^4	7.1×10^8	230

試験方法:

1) 試験土壌の調製

篩 (2 mm) にかけて土壌試料 (乾燥重量 50 g、土壌層の厚さ 2.2~2.4 cm) を非滅菌土壌では 20 の試験容器に、滅菌土壌では 12 の試験容器に入れ、後記の培養条件下で 25 日間前培養した後に被験物質を処理した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

2) 放射能標識化合物添加及び培養条件

被験物質処理量は有効成分 4.0 kg/ha 相当量とした。土壌の比重を、日本土壌は 1.0 g/cm^3 、米国土壌は 1.3 g/cm^3 とし、20 cm の深さに均等に混入すると仮定して、日本土壌は 2.0 mg/kg 、米国土壌は 1.5 mg/kg の試験濃度とした。被験物質のアセトン溶液を各容器中の土壌に滴下し、混和後、被験物質処理土壌容器を下図のようにトラップに連結したデシケータに収容し、加湿空気を連続通気した。トラップは2個連結し、それぞれのトラップにはエチレングリコール及び 1M NaOH 水溶液を入れ、揮発性放射能を捕集した。デシケーター内にも 1M NaOH トラップを設置した。

培養条件

温度：日本土壌は 25°C 、米国土壌は 20°C

照明：暗所

水分：最大保水量の 50%

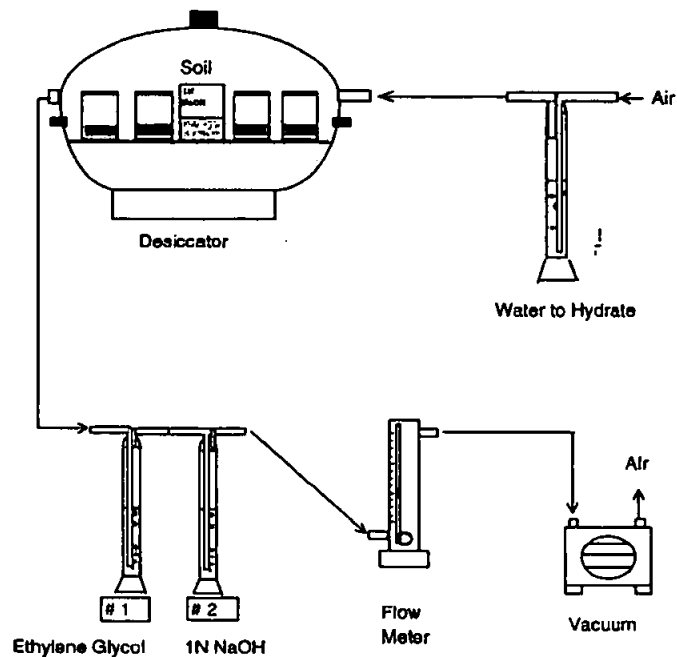


図 1：試験系の模式図

3) 試料採取

分析用試料の採取は、非滅菌の日本土壌及び米国土壌については被験物質処理の 0 (処理直後)、3、7、14、30、62、91、120、162 及び 275 日後に行った。滅菌した日本土壌の試料採取は被験物質処理後 0 (処理直後)、7、21、43、60 及び 105 日後に行った。揮発性物質捕集トラップは、非滅菌土壌については培養 3 日以降の試料採取日に、滅菌土壌については 7 日以降の試料採取日に採取した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

4) 分析法

各捕集液については LSC 法で放射エネルギーの測定を行った。各土壌試料は図 2 に示すフローシートにしたがって試料調製した。

被験物質処理後 0 日及び 3 日に採取した非滅菌土壌についてはアセトニトリル中で 10 分間超音波処理した後、振とう抽出した。この抽出工程を 3 回反復し、抽出液を濃縮して、HPLC 分析を行った。その他の土壌試料については、アセトニトリル/水 (4 : 1) 中で約 2 分間攪拌して、抽出液を濾過抽出した。この工程を 3 回反復し、抽出液を濃縮して HPLC 分析用試料とした。抽出残渣については乾燥後、燃焼法による放射エネルギーの分析に供した。

処理量の 10% を超える放射エネルギーが検出されたすべての抽出残渣試料について、メタノール/水/酢酸 (80 : 19 : 1) で還流抽出し、濃縮後、HPLC 分析に供した。さらに、この抽出残渣中放射エネルギーを燃焼法で分析した。

酸性メタノール抽出残渣試料については、代表的試料を用いて 1N HCl : メタノールを用いた還流抽出を行い、抽出物の HPLC 分析を行った。

代謝物等の同定は、土壌から単離した代謝物等について、合成標品との HPLC コクロマトグラフィーと LC/MS における質量スペクトルの比較、または TLC クロマトグラフィーに基づいて行った。NaOH トラップに捕集された放射能については、バリウム沈殿法で炭酸ガスであることの確認を行った。

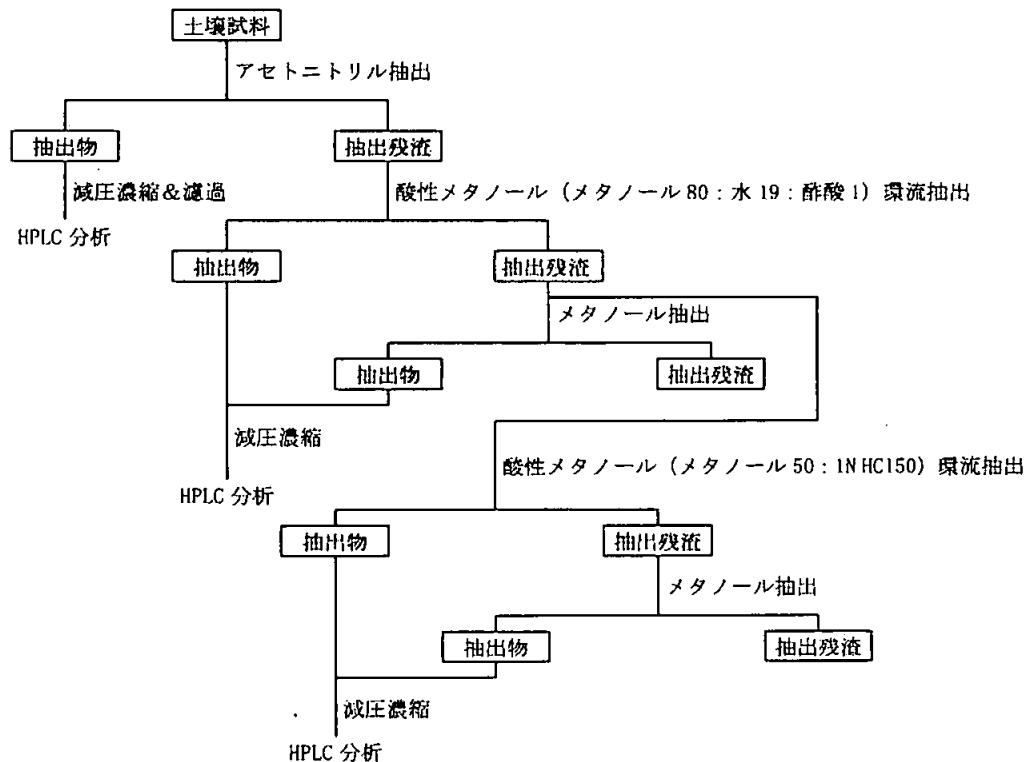


図 2 : 土壌試料中放射能の分析フローチャート

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

試験結果：

1) 放射能の分布；

各試験土壌における放射能の分布及び物質収支を以下に示す。

表 3：非滅菌の日本土壌（25℃）における放射能の分布

培養期間 (日)	アセトニトリル抽出	酸性メタノール抽出	抽出残渣	1N NaOH トラップ	物質収支
0	100.9 (2.02)	NA	3.1 (0.07)	NA	104.0 (2.09)
3	91.0 (1.82)	3.8 (0.08)	8.4 (0.17)	<0.1 (<0.01)	103.1 (2.07)
7	80.0 (1.61)	5.8 (0.12)	17.4 (0.35)	0.1 (<0.01)	103.2 (2.07)
14	59.3 (1.19)	9.5 (0.19)	32.3 (0.65)	0.5 (0.01)	101.5 (2.03)
30	37.2 (0.75)	11.6 (0.23)	50.2 (1.01)	1.2 (0.02)	100.2 (2.00)
62	22.5 (0.45)	13.2 (0.27)	61.6 (1.23)	3.2 (0.06)	100.5 (2.01)
91	18.4 (0.37)	13.6 (0.28)	63.5 (1.28)	4.5 (0.09)	99.9 (2.01)
120	14.3 (0.29)	12.3 (0.25)	65.8 (1.32)	5.2 (0.10)	97.6 (1.96)
162	14.8 (0.30)	10.0 (0.20)	61.9 (1.24)	5.9 (0.11)	92.5 (1.85)
275	14.2 (0.29)	9.9 (0.20)	64.8 (1.30)	7.1 (0.13)	95.9 (1.92)

上段：処理量%、下段：μg-eq/g、NA：分析対象外

表 4：非滅菌の米国土壌（20℃）における放射能の分布

培養期間 (日)	アセトニトリル抽出	酸性メタノール抽出	抽出残渣	1N NaOH トラップ	物質収支
0	102.5 (1.51)	NA	1.1 (0.02)	NA	103.6 (1.53)
3	97.4 (1.44)	NA	6.2 (0.09)	<0.1 (<0.01)	103.6 (1.53)
7	96.1 (1.42)	NA	6.3 (0.09)	<0.1 (<0.01)	102.5 (1.51)
14	86.1 (1.27)	8.2 (0.12)	6.8 (0.10)	0.1 (<0.01)	101.1 (1.49)
30	74.5 (1.10)	13.1 (0.19)	9.9 (0.20)	0.5 (0.01)	101.6 (1.50)
62	59.3 (0.88)	16.3 (0.24)	20.7 (0.31)	2.4 (0.04)	98.7 (1.46)
91	51.9 (0.77)	19.0 (0.28)	27.1 (0.40)	4.0 (0.06)	102.0 (1.51)
120	48.1 (0.71)	18.4 (0.28)	24.8 (0.37)	5.6 (0.08)	96.9 (1.43)
162	44.8 (0.66)	16.1 (0.24)	28.3 (0.42)	7.8 (0.11)	97.0 (1.42)
275	37.7 (0.56)	18.5 (0.28)	32.5 (0.48)	14.4 (0.21)	103.0 (1.52)

上段：処理量%、下段：μg-eq/g、NA：分析対象外

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 5：滅菌した日本土壌 (25°C) における放射能の分布

培養期間 (日)	アセトニトリル抽出	酸性メタノール抽出	抽出残渣	1N NaOH トラップ	物質収支
0	99.1 (1.99)	NA	1.3 (0.03)	NA	100.5 (2.02)
7	93.7 (1.88)	NA	8.4 (0.34)	<0.1 (<0.01)	102.1 (2.22)
21	74.4 (1.49)	8.0 (0.16)	15.8 (0.64)	<0.1 (<0.01)	98.3 (2.29)
43	56.4 (1.13)	15.3 (0.31)	28.9 (1.16)	<0.1 (<0.01)	100.7 (2.60)
60	47.2 (0.95)	11.9 (0.24)	38.6 (0.78)	<0.1 (<0.01)	97.7 (1.96)
105	26.5 (0.53)	19.2 (0.39)	47.7 (0.96)	<0.1 (<0.01)	93.4 (1.88)

上段：処理量に対する%、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、NA：分析対象外

処理放射エネルギーに対する各抽出液、揮発性物質捕集液及び抽出残渣中放射エネルギーを合算した物質収支は、非滅菌の日本及び米国土壌並びに滅菌した日本土壌のいずれにおいても、90%を下回ることがなかった。

非滅菌日本土壌：アセトニトリル抽出液中放射エネルギーの処理量に対する割合は、試験0日の100.9%から275日には14.2%に減少した。酸性メタノール/水で抽出された放射エネルギーは、3日の3.8%から91日には13.6%に増加し、その後275日の9.9%まで減少した。抽出残渣中放射エネルギーは一定の割合で増加し120日にプラトーに達したまま、以降大きな変化がなかった。275日までの $^{14}\text{CO}_2$ 産生量は少なく、7.1%であった。揮発性有機物用トラップ中には放射エネルギーは認められなかった。

非滅菌米国土壌：アセトニトリル抽出液中放射エネルギーは0日の102.5%から275日には37.7%に減少した。酸性メタノール/水抽出された放射エネルギーは、14日の8.2%から91日には19.0%に増加し、275日には18.5%であった。抽出残渣中放射エネルギーは一定の割合で増加し、0日の1.1%から275日には32.5%になった。275日までの $^{14}\text{CO}_2$ 産生量は14.4%であった。揮発性有機物はごく僅かであった。

滅菌日本土壌：アセトニトリル抽出された放射エネルギーは、0日の99.1%から105日には26.5%に減少した。酸性メタノール/水抽出された放射エネルギーは、21日の8.0%から105日には19.2%に増加した。抽出残渣中放射エネルギーは一定の割合で増加し、0日の1.3%から105日には47.7%になった。105日までの $^{14}\text{CO}_2$ の産生量は少なく、0.1%未満であった。揮発性有機物は認められなかった。

2) 抽出物の HPLC 分析

アセトニトリル抽出液及び酸性メタノール抽出液の HPLC 分析結果を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 6：非滅菌の日本土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール抽出物の HPLC 分析（合計値）

培養期間 (日)	イミシアホス				
0	99.9 (2.00)	ND	0.6 (0.01)	0.4 (0.01)	100.9 (2.02)
3	88.4 (1.77)	3.2 (0.07)	2.3 (0.05)	0.9 (0.02)	94.7 (1.90)
7	77.7 (1.57)	6.0 (0.12)	1.1 (0.02)	1.1 (0.02)	85.8 (1.72)
14	58.3 (1.17)	8.7 (0.18)	1.9 (0.04)	ND	68.8 (1.38)
30	35.4 (0.71)	12.9 (0.26)	0.5 (0.01)	ND	48.8 (0.98)
62	17.0 (0.34)	17.9 (0.36)	0.9 (0.02)	ND	35.7 (0.72)
91	10.7 (0.21)	20.2 (0.41)	0.6 (0.02)	0.5 (0.01)	31.7 (0.64)
120	7.1 (0.14)	19.4 (0.40)	0.1 (0.01)	ND	26.6 (0.54)
162	4.7 (0.09)	20.1 (0.41)	ND	ND	24.8 (0.50)
275	3.1 (0.07)	21.0 (0.42)	ND	ND	24.1 (0.49)

上段：処理量に対する％、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{g}$ 、ND：未検出

表 7：非滅菌の米国土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール抽出物の HPLC 分析（合計値）

培養期間 (日)	イミシアホス				
0	101.5 (1.50)	ND	0.7 (0.01)	0.4 (0.01)	102.5 (1.51)
3	95.1 (1.40)	1.0 (0.02)	1.5 (0.02)	ND	97.5 (1.44)
7	86.3 (1.27)	2.9 (0.04)	1.8 (0.03)	5.3 (0.08)	96.2 (1.42)
14	74.3 (1.10)	17.6 (0.26)	1.7 (0.03)	0.7 (0.01)	94.2 (1.39)
30	54.6 (0.81)	29.6 (0.44)	0.8 (0.01)	2.6 (0.04)	87.6 (1.29)
62	29.3 (0.43)	45.8 (0.68)	0.5 (0.01)	ND	75.5 (0.24)
91	18.3 (0.27)	51.8 (0.77)	0.9 (0.02)	ND	71.0 (1.05)
120	13.4 (0.20)	52.9 (0.78)	0.2 (0.01)	ND	66.5 (0.98)
162	7.1 (0.10)	53.8 (0.80)	ND	ND	60.9 (0.90)
275	3.5 (0.06)	52.6 (0.78)	ND	ND	56.1 (0.83)

上段：処理量に対する％、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{g}$ 、ND：未検出

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 8 : 滅菌の日本土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール抽出物の HPLC 分析 (合計値)

培養期間 (日)	イミシアホス				
0	98.5 (1.98)	ND	ND	0.6 (0.01)	99.1 (1.99)
7	84.5 (1.70)	1.2 (0.02)	7.4 (0.15)	ND	93.1 (1.87)
21	26.4 (0.53)	41.2 (0.83)	11.8 (0.24)	3.1 (0.06)	82.5 (1.66)
43	45.2 (0.91)	15.8 (0.32)	9.7 (0.19)	ND	70.7 (1.42)
60	36.1 (0.72)	15.0 (0.30)	7.9 (0.16)	ND	59.0 (1.18)
105	19.3 (0.39)	22.6 (0.45)	3.8 (0.08)	ND	45.7 (0.92)

上段 : 処理量に対する%、下段 : $\mu\text{g}\cdot\text{cg/g}$ 、ND : 未検出

日本と米国の非滅菌土壌及び日本の滅菌土壌の抽出液から主要代謝物 2 種類を単離し、合成標品と HPLC コクロマトグラフィー及び LS/MS の質量スペクトル、または HPLC 及び TLC コクロマトグラフィーにより、それぞれと同一とされた。

非滅菌日本土壌 : 25°C で培養した非滅菌日本土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール/水抽出液中イミシアホスは 0 日の 99.9% から 275 日には 3.1% に低下した。主要代謝物であるイミシアホスは 0 日の ND 以下から 275 日の 21.0% 増加した。イミシアホスは少なく、最高でも 2.5% 以下で、275 日までに 0.1% 以下となった。その他に有意な代謝物は認められなかった。

非滅菌米国土壌 : 20°C で培養した非滅菌米国土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール/水抽出液中イミシアホスは 0 日の 101.5% から 275 日には 3.5% に低下した。主要代謝物であるイミシアホスは 0 日の 0.1% 以下から 162 日の 53.8% に増加し、その後は減少して 275 日には 52.6% となった。代謝物イミシアホスは少なく、最高値が 2.5% 以下で 275 日までに 0.1% 以下となった。その他に有意な代謝物は認められなかった。

滅菌日本土壌 : 25°C で培養した滅菌日本土壌のアセトニトリル及び酸性メタノール/水抽出液中イミシアホスは 0 日の 98.5% から 105 日には 19.3% に低下した。主な代謝物であるイミシアホスは 0 日の 0.1% 以下から 105 日の 22.6% に増加した。21 日のイミシアホスの濃度は 41.2% であったが、この数値は 7 日及び 43 日の測定値と比較して一貫性に欠けるものであり、21 日のイミシアホスの測定値は、アーティファクトと考えられた。代謝物イミシアホスは少なく、0 日の 0.1% 以下から 21 日には 11.8% に増加したが、その後は 105 日に 3.8% に低下した。その他に有意な代謝物は認められなかった。

3) 抽出残渣の特徴付け

非滅菌の日本土壌及び米国土壌の一部について、抽出残渣中放射能の 1N HCl : メタノールによる還流抽出を行い、得られた抽出物の HPLC 分析を行った。その結果を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表9：塩酸：メタノール還流抽出された放射能量（処理量%）及びその HPLC 分析

土壌の種類	米国土壌		日本土壌	
	30日	91日	14日	62日
培養期間（日）	30日	91日	14日	62日
分析対象放射能量	13.6	29.7	31.9	63.1
HCl で還流抽出された放射能量	12.0	27.7	26.8	53.5
	9.7	27.7	26.8	53.5
抽出残渣	1.6	2.0	5.1	9.6

1N HCl：メタノールによる還流抽出で抽出残渣中放射能の80%以上が遊離され、その大部分が ^{14}C であった。HCl による還流抽出で抽出されなかった放射能量はいずれも処理量の10%以下であった。

4) イミシアホスの減衰速度；

親化合物及び代謝物の土壌中動態を下図に示す。

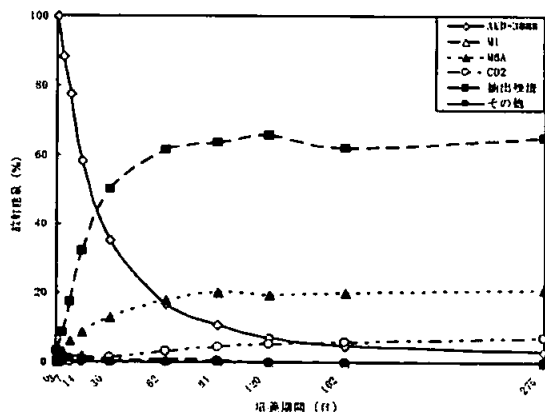


図3：非滅菌日本土壌における動態

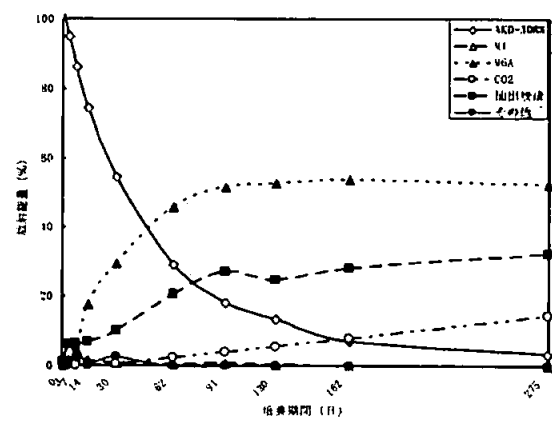
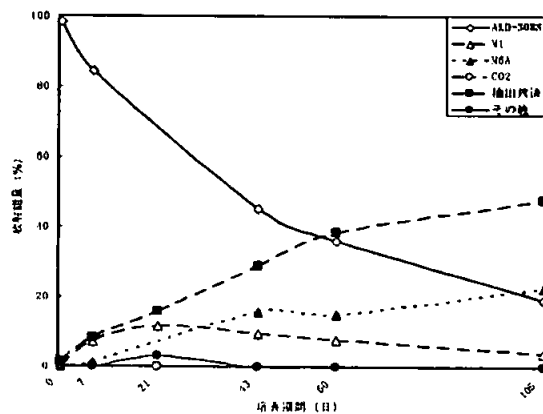


図4：非滅菌米国土壌における動態



申請書付：処理後 21 日の AKD-308R 及び V6A の分析値は明らかに異常値であったためグラフから除外した。

図5：滅菌日本土壌における動態

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

イミシアホスは二相性の一次反応 ($C/C_0=C_{1e}^{-k_1t} \cdot C_{2e}^{-k_2t}$) に従って減衰した。カーブフィッティングプログラムで算出した本試験における親化合物の消長速度計算値を下表に示す。

表 10 : イミシアホスの土壌中における減衰速度計算値 (k_1 及び k_2 は速度定数)

土壌の種類	k_1	k_2	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)
非滅菌日本土壌 (25℃)	0.0521	0.0130	18	82
非滅菌米国土壌 (20℃)	0.0292	0.0089	30	122
滅菌日本土壌 (25℃)	0.0630	0.0160	33	131

5) 推定代謝経路

本試験結果に基づいて想定される代謝経路を以下に示す。

図 4 : イミシアホスの好氣的土壌における想定代謝経路

以上の結果から、イミシアホスは好氣的土壌中で中等度の速度で分解されることが明らかになった。イミシアホスの主要代謝物は であつた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(2) イミシアホスの好氣的土壤中運命試験

(資料 代 10)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

供試標識化合物: [^{14}C] イミシアホス

化学構造:

化学名:

ロット番号:

比放射能: 3.61MBq/mg

放射化学的純度:

供試土壌: 米国土壌 (オハイオ州マディソンの農場で採取した壤質砂土) 及び日本土壌 (茨城県牛久市の日本植物防疫協会試験場内で採取した軽埴土: 火山灰土壌) を試験に使用した。各土壌の ISS 基準に基づく土壌特性を以下に示した。

表 1: 試験に使用した土壌の特性

土壌の 名称	土壌分類	pH (H_2O)	粒子径分布 (%)			有機物 (%)	陽イオン 交換容量 (mEq/100g)	最大保水量 (% pF2.5)	微生物バイオマス ($\mu\text{gC/g}$)
			20~2000 μm	2~20 μm	<2 μm				
米 土 壌	壤質砂土	6.3	88	4	8	1.2	1.4	7.9	200.54 (0日) 66.36 (120日)
日 本 土 壌	軽埴土	6.6	54	19	27	4.7	19.2	53.6	107.67 (0日) 74.75 (180日)

試験方法:

1) 試験土壌の調製

篩 (2 mm) にかけた土壌試料 (乾燥重量 50 g、土壌層の厚さ 2~3 cm) を必要数の試験容器に入れ、後記培養条件下で 7 日間前培養した後に被験物質を処理した。

2) 放射能標識化合物添加及び培養

被験物質を容器当り 77 μg (米国土壌) または 100 μg (日本土壌) 処理した。この処理量はそれぞれ 1.54 mg/kg 土壌 (米国土壌) 及び 2.0 mg/kg 土壌 (日本土壌) に相当し、圃場にイミシアホスを 4.0 kg/ha 処理し、20 cm の深さに均等に混和され、米国土壌の比重が 1.3、日本土壌の比重が 1.0 と仮定した場合の処理量に相当する。被験物質の A

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

セトニトリル溶液を各容器中の土壤に滴下し、混和後、被験物質処理土壤容器を図1のようにトラップに連結し、加湿空気を連続通気した。トラップは4個連結し、それぞれのトラップにはエタンジオール、2%パラフィンキシレン溶液及び2M NaOH水溶液(2本)を入れ、揮発性放射能を捕集した。また、培養期間終了時のバイオマス測定用に同量の非放射能標識体を各土壤に処理し、同様な条件で培養した。

培養条件

温度：日本土壤は25℃、米国土壤は20℃

照明：暗所

水分：最大保水量の45%

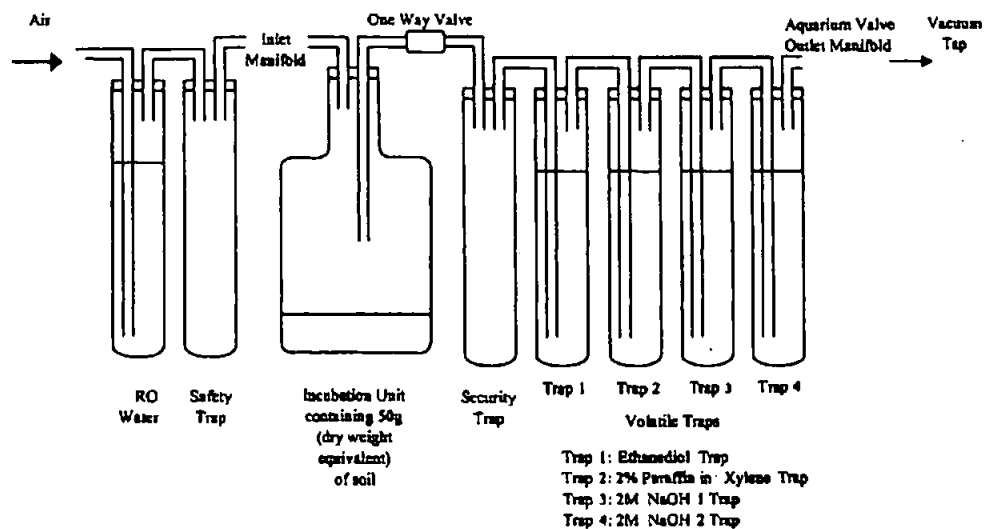


図1：試験系の模式図

3) 試料採取

米国土壤における分析用試料の採取は、被験物質処理後0(処理直後)、2、7、14、29、61、91及び120日に行った。日本土壤では上記に加えて180日にも試料を採取した。揮発性物質捕集トラップは、土壤試料採取時に加えて29、61、91、120、149日に行った。また、各土壤採取時にはアセトニトリルで土壤を除いた容器を洗浄し、容器に付着した放射能の回収を行った。

4) 分析法

各捕集液についてはLSC法で放射能量の測定を行った。土壤試料の調製法フローチャートを図2に示した。

土壤試料についてはアセトニトリルで2回、アセトニトリル：水で1回振とう抽出し、遠心分離した上清をプールして分析用とした。抽出残渣についてはメタノール：水：1M酢酸で還流抽出し、抽出物を遠心分離した後、上清は分析用試料とし、抽出残渣につい

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

では、さらに腐植質の分析に供した。

抽出物は HPLC 分析に供した。固形物中放射能量は燃焼法で生成した $^{14}\text{CO}_2$ を LSC 分析して定量した。液体試料中放射能量は直接 LSC 法で測定した。

代謝物の同定は HPLC 及び TLC における合成標品とのコクロマトグラフィーで行った。 $^{14}\text{CO}_2$ は NaOH 捕集液に塩化バリウムを加え、 $^{14}\text{CO}_2$ を沈殿させて同定した。

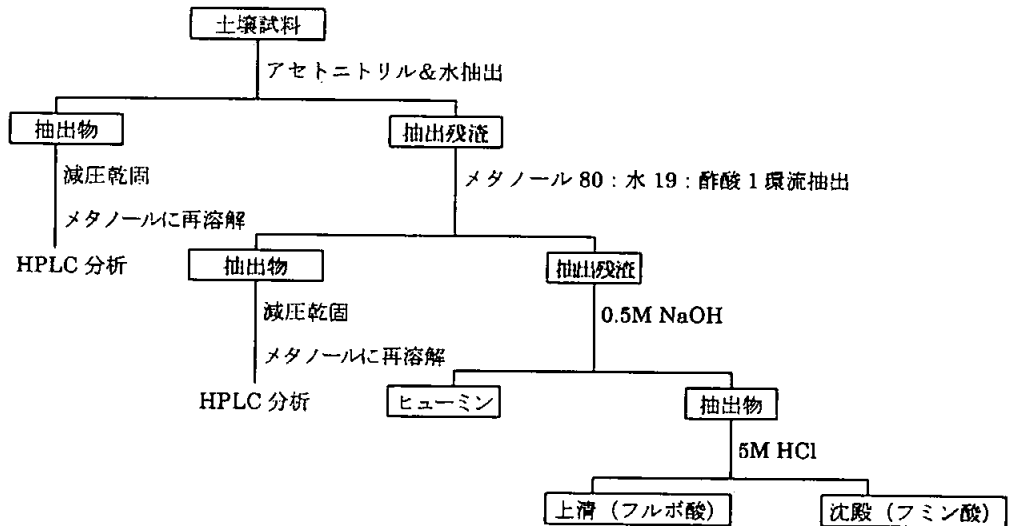


図 2：土壤試料中放射能の分析フローチャート

試験結果：

1) 放射能の分布；

土壤中放射能分布及び揮発性放射能を以下に示す。

表 2：米国土壤における土壤中放射能の分布及び揮発性放射能量の推移（処理量%）

培養期間 (日)	溶媒抽出物 (%)	還流抽出物 (%)	抽出残渣 (%)	容器洗浄液 (%)	揮発性放射能 (%)		物質収支 (%)
					有機溶媒	2M NaOH	
0	99.1	0.5	0.2	0.0	NA	NA	99.8
2	92.7	2.9	1.6	0.0	0.0	1.8	99.0
7	73.3	5.0	6.7	0.0	0.0	13.0	98.0
14	59.0	5.4	10.0	0.0	0.0	23.0	97.4
29	44.1	6.6	14.1	0.0	0.0	31.5	96.3
61	27.2	6.8	17.6	0.0	0.0	45.4	97.0
91	15.5	5.7	20.8	0.0	0.0	55.0	97.0
120	13.3	5.7	19.9	0.0	0.0	58.2	97.1

NA：未分析

表 3：米国土壤抽出残渣中放射能の腐植質中分布（処理量%）

培養期間 (日)	分析対象放射能	フルボ酸	フミン酸	ヒューミン	計
29	14.1	4.4	2.4	6.8	13.6
91	20.8	6.6	3.6	10.4	20.6

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

米国土壌: 土壌から有機溶媒抽出された放射エネルギーは、0日の99.1%から、29日には44.1%に低下、その後120日には13.3%に低下した。還流抽出物は0日の0.5%から、29日に6.6%に増加し、その後は一定であったが、培養終了時では処理放射能の5.7%に僅かに低下した。

土壌試料の燃焼により回収された抽出残渣中放射エネルギーは、29日には14.1%に増加し、91日に20.8%に増加した後、120日には19.9%に僅かに低下した。捕捉された揮発性放射エネルギーは、試験期間中を通して増加し、試験終了時には処理放射能の58.2%に達した。この放射能は全て、水酸化ナトリウム捕集液中に認められ、塩化バリウム沈殿法により二酸化炭素であることが確認された。揮発性有機物は検出されなかった。

表4: 日本土壌における土壌中放射能の分布及び揮発性放射エネルギーの推移 (処理量%)

培養期間 (日)	溶媒抽出物 (%)	還流抽出物 (%)	抽出残渣 (%)	容器洗浄液 (%)	揮発性放射能 (%)		物質収支 (%)
					有機溶媒	2M NaOH	
0	92.7	3.0	1.0	0.0	NA	NA	96.7
2	87.1	5.2	4.1	0.0	0.0	1.8	98.2
7	67.4	5.7	8.8	0.0	0.1	13.6	95.6
14	51.7	5.9	13.1	0.0	0.0	24.5	95.2
29	35.8	5.5	17.5	0.0	0.0	37.2	96.0
61	17.7	4.8	18.7	0.0	0.0	55.7	96.9
91	11.1	4.4	20.0	0.0	0.0	60.8	96.3
120	7.4	4.0	20.4	0.0	0.0	64.6	96.4
180	3.8	3.2	20.9	0.0	0.0	69.1	97.0

NA: 未分析

表5: 日本土壌抽出残渣中放射能の腐植質中分布 (TRR%)

培養期間 (日)	分析対象放射エネルギー	フルボ酸	フミン酸	ヒューミン	計
29	17.5	2.8	0.1	13.5	16.4
180	20.9	2	0.1	18.4	20.5

日本土壌: 土壌から有機溶媒抽出された放射エネルギーは、0日の92.7%から、29日には35.8%、180日には3.8%に低下した。還流抽出物は0日の3.0%から14日に最大の5.9%に増加した後は一定であったが、180日培養後には3.2%に低下した。

土壌抽出残渣中放射エネルギーは、29日には17.5%に増加し、180日に最大の20.9%に増加した。29及び180日の溶媒抽出及び還流抽出を完了した土壌試料について、抽出残渣中放射エネルギーの腐植質分析を行い、ヒューミン画分に多く残留していた。

揮発性放射エネルギーは、試験期間中を通して増加し、試験終了時には処理放射能の69.1%に達した。この放射能の全量が水酸化ナトリウム捕集液中に認められ、塩化バリウム沈殿法でCO₂であることが確認された。捕集された揮発性有機物は処理放射能の1%以下であった。

2) 抽出物の HPLC 分析

アセトニトリル及びアセトニトリル:水で抽出された放射能物質の HPLC 分析結果を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 6：米国土壌抽出物の HPLC 分析（溶媒抽出及び還流抽出物の合計値）

培養期間 (日)	イミシアホス	最大未同定物	その他の未同定物	未分離成分	分析対象放射能
0	97.9 (1.517)	0.6 (0.009)	0.5 (0.008)	0.1 (0.002)	99.6 (1.544)
2	94.8 (1.469)	0.0 (0.000)	0.0 (0.000)	0.7 (0.011)	95.6 (1.482)
7	76.9 (1.192)	0.5 (0.008)	0.5 (0.008)	0.4 (0.006)	78.3 (1.214)
14	63.1 (0.978)	0.4 (0.006)	0.0 (0.000)	0.2 (0.003)	64.4 (0.998)
29	48.9 (0.758)	0.4 (0.006)	0.2 (0.003)	0.4 (0.006)	50.7 (0.786)
61	31.8 (0.493)	1.1 (0.017)	0.2 (0.003)	0.1 (0.002)	34.0 (0.527)
91	17.9 (0.277)	1.2 (0.019)	1.1 (0.017)	0.1 (0.002)	21.2 (0.329)
120	16.6 (0.257)	1.0 (0.016)	0.4 (0.006)	0.2 (0.003)	19.0 (0.295)

上段は処理量%、下段は $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$

米国土壌：有機溶媒抽出物及び還流抽出物中放射能の主要成分はイミシアホスであった。その濃度は、0日の97.9%から、29日には48.9%に低下し、さらに120日には16.6%に低下した。同定された分解物はなかったが、未同定の分解生成物は微量で、その合計値は91日に最大値を示したが、処理量の2.3%に過ぎなかった。

表 7：日本土壌抽出物の HPLC 分析（溶媒抽出及び還流抽出物の合計値）

培養期間 (日)	イミシアホス	最大未同定物	その他の未同定物	未分離成分	分析対象放射能
0	94.1 (1.882)	0.6 (0.012)	0.5 (0.010)	0.6 (0.012)	95.7 (1.914)
2	91.5 (1.830)	0.0 (0.000)	ND	0.8 (0.016)	92.3 (1.846)
7	72.7 (1.454)	0.1 (0.002)	0.1 (0.002)	0.2 (0.004)	73.1 (1.462)
14	57.0 (1.140)	0.2 (0.004)	ND	0.4 (0.008)	57.6 (1.152)
29	40.2 (0.804)	0.8 (0.016)	ND	0.3 (0.006)	41.3 (0.826)
61	21.9 (0.438)	0.5 (0.010)	ND	0.2 (0.004)	22.5 (0.450)
91	14.4 (0.288)	0.6 (0.012)	ND	0.0 (0.000)	15.5 (0.310)
120	10.3 (0.206)	0.5 (0.010)	ND	0.0 (0.000)	11.4 (0.228)
180	6.2 (0.124)	0.3 (0.006)	ND	0.1 (0.002)	7.0 (0.140)

上段は処理量%、下段は $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、ND：検出限界以下

日本土壌：有機溶媒抽出物及び還流抽出物により抽出された放射能の大部分はイミシアホスで、その濃度は、0日の94.1%から、29日には40.2%に低下し、その後180日には6.2%に低下した。未同定分解生成物の合計は、0日の1.1%が最大であった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

3) イミシアホスの減衰速度

好氣的条件下における米国土壤（20℃）及び日本土壤（25℃）中でイミシアホスは一相性の一次反応式に従って低下した。消長を図3に示すとともに、一次指数モデルから算出され他減衰速度を表8に示す。

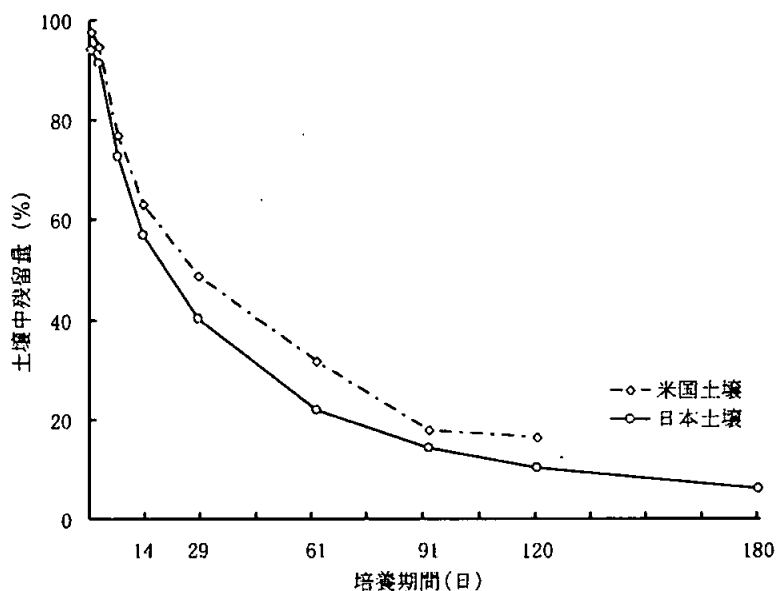


図3：好氣的条件下における土壤中イミシアホスの消長

表8：一次指数モデルで求めた 標識体の好氣的土壤における減衰速度

	米国土壤 (20℃)	日本土壤 (25℃)
DT ₅₀	36 日	27 日
DT ₉₀	120 日	91 日
相関係数 R ²	0.9703	0.9791

標識体の好氣的条件下における半減期 (DT₅₀) は米国土壤 (20℃) で 36 日、日本土壤 (25℃) では 27 日であり、DT₉₀ はそれぞれ 120 日及び 91 日であった。また、二酸化炭素及び主としてヒューミン画分に取り込まれた結合残留物以外の主要代謝分解生成物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および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(3) の好氣的土壤中運命試験

(資料代11)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

供試標識化合物: [¹⁴C]

化学構造:

化学名:

ロット番号:

比放射能:

放射化学的純度:

供試土壌: 軽埴土 (千葉県千葉市の県立千葉農業試験場内で採取)。ISS 基準に基づく土壌特性を以下に示した。

表 1: 試験に使用した土壌の特性

土壌分類	pH (H ₂ O)	粒子径分布 (%)			有機物 (%)	陽イオン 交換容量 (mEq/100g)	最大保水量 (%、pF2.5)	微生物バイオマス (μ gC/g)
		20~2000 μ m	2~20 μ m	<2 μ m				
軽埴土	6.5	41	22	37	13.1	44.8	67.1	97.93 (0日) 107.86 (181日)

試験方法:

1) 試験土壌の調製

篩 (2 mm) にかけた土壌試料 (乾燥重量 50 g、土壌層の厚さ 2~3 cm) を 11 の試験容器に入れ、後記する培養条件下で 7 日間前培養した後に被験物質 [¹⁴C] を処理した。

2) 放射能標識化合物添加及び培養

被験物質処理量は容器当り 52 μ g、即ち 104 μ g/100g 土壌とした。この処理量は圃場にイミシアホスを 4.0 kg/ha 処理し、20 cm の深さに均等に混和され、イミシアホスが 100% に変換された場合の濃度に相当量する (土壌の比重は 1.0 と仮定)。被験物質の水溶液を各容器中の土壌に滴下し、混和後、被験物質処理土壌容器を図 1 のようにトラップに連結し、加温空気を連続通気した。トラップは 4 個連結し、それぞれのトラップにはエタンジオール、2%パラフィンキシレン溶液及び 2M NaOH 水溶液 (2 本) を入れ、揮発性放射能を捕集した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

培養条件

温度：25℃

照明：暗所

水分：最大保水量の45%

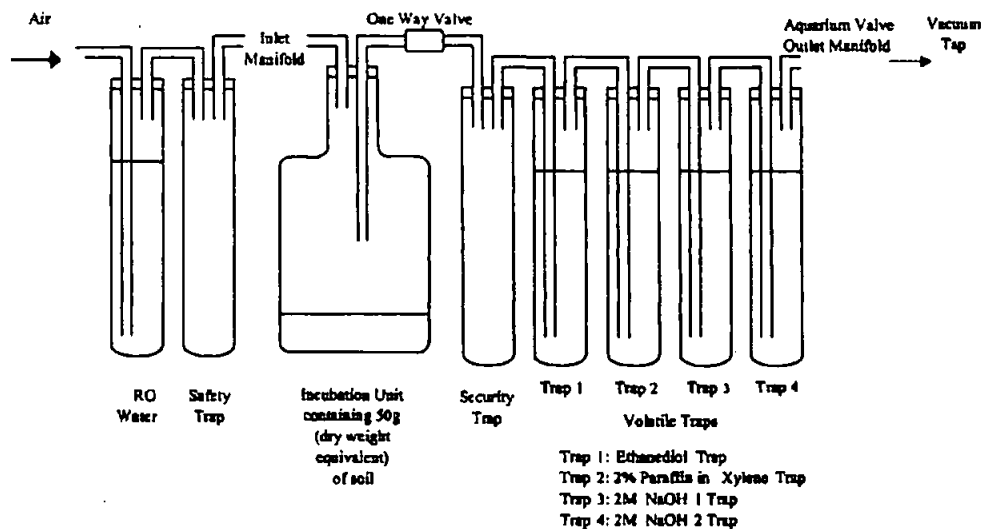


図1：試験系の模式図

3) 試料採取

分析用試料の採取は、被験物質処理後0（処理直後）、2、7、14、30、61、90、120及び181日後に行った。揮発性物質捕集トラップは、土壌試料採取時に加えて30、61、90、120、148及び181日に行った。

4) 分析法

各捕集液についてはLSC法で放射エネルギーの測定を行った。

土壌試料は図2のフローチャートに示すように調製した。即ち、メタノール：水：10M水酸化ナトリウムで4回振とう抽出した。抽出液と土壌は遠心分離により分け、各抽出液をプールし、放射エネルギーをLSCにより測定した。プールした抽出液を濃塩酸でpH7～8に調整した後、HPLC分析に供した。抽出残渣中放射エネルギーは燃焼させ、精製した $^{14}\text{CO}_2$ をLSCにより測定した。

また、土壌抽出残渣の腐植質について30日及び181日の試料を用いて分析した。その後、 ^{14}C の嫌氣的土壌代謝試験（資料代13）において、フルボ酸画分中の含まれることが判明したため、本試験においても、全ての土壌抽出残渣について腐植質の画分を行い、フルボ酸画分のHPLC分析を行った。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

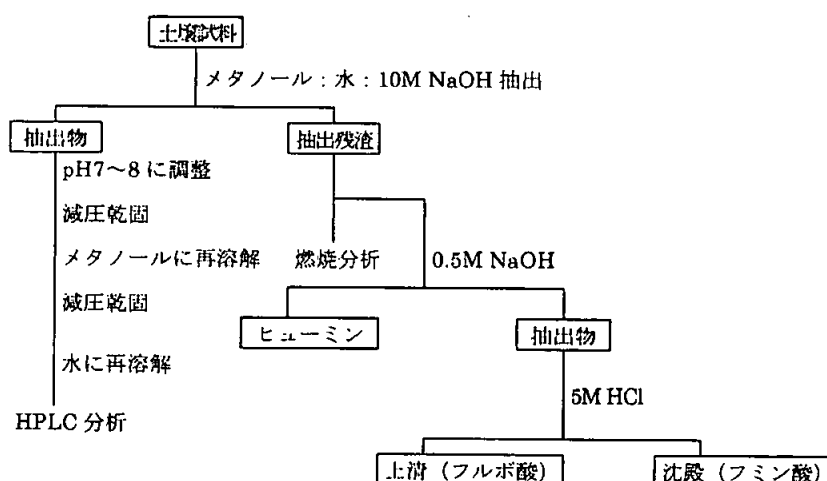


図 2：土壌試料中放射能の分析フローチャート

試験結果：

1) 放射能の分布；

土壤中放射能分布及び揮発性放射能を以下に示す。

表 2：土壌中放射能の分布及び揮発性放射能量の推移（処理量%）

培養期間 (日)	溶媒抽出物 (%)	抽出残渣 (%)	容器洗浄液 (%)	揮発性放射能		物質収支 (%)
				有機溶媒* (%)	2M NaOH (%)	
0	90.3	8.8	0.0	NA	NA	99.1
2	80.0	18.9	0.0	0.0	0.1	99.0
7	74.6	23.8	0.0	0.0	0.3	98.7
14	69.9	27.2	0.0	0.0	0.5	97.6
30	68.4	30.3	0.0	0.0	0.8	99.5
61	67.2	31.1	0.0	0.0	1.3	99.6
90	64.9	33.5	0.0	0.0	1.7	100.1
120	61.7	33.7	0.0	0.0	2.1	97.5
181	60.2	35.3	0.0	0.0	3.1	98.6

* エタンジオール及び 2%パラフィンキシレン溶液中に検出された放射能の合計、NA：分析未実施

土壤から抽出された放射能量は培養期間の経過と共に低下したが、181日での時点でも処理量の 60.2%が抽出された。反対に抽出残渣中放射能は徐々に増加し、揮発性放射能の発生量は試験終了時でも 3.1%にとどまった。有機溶媒に捕集された放射能は検出されなかった。本試験における総放射能回収率（物質収支、%）はいずれも 97%以上であった。

2) 抽出物の HPLC 分析

塩基性メタノールで抽出された放射能物質の HPLC 分析結果を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 3：塩基性メタノール（メタノール：水：10M水酸化ナトリウム）抽出された放射能の HPLC 分析

培養期間 (日)		最大未同定物質	その他の未同定物質	未分離成分	塩基性メタノール 抽出放射能
0	89.0 (0.935)	1.0 (0.011)	ND	0.3 (0.003)	90.3 (0.948)
2	79.3 (0.833)	ND	ND	0.7 (0.007)	80.0 (0.840)
7	74.1 (0.778)	ND	ND	0.5 (0.005)	74.6 (0.783)
14	69.9 (0.734)	ND	ND	0.1 (0.001)	69.9 (0.734)
30	67.2 (0.706)	0.7 (0.007)	ND	0.5 (0.005)	68.4 (0.718)
61	65.8 (0.691)	1.2 (0.013)	ND	0.3 (0.003)	67.2 (0.706)
90	64.0 (0.672)	0.5 (0.005)	ND	0.4 (0.004)	64.9 (0.681)
120	61.6 (0.647)	ND	ND	0.1 (0.001)	61.7 (0.648)
181	58.9 (0.618)	1.0 (0.011)	ND	0.3 (0.003)	60.2 (0.632)

上段：処理量に対する%、下段： $\mu\text{g}\cdot\text{eq/g}$ 、ND：未検出

塩基性メタノールで土壌から抽出された放射能の大部分は であった。その濃度は、初期値の 89.0%から 30 日には 67.2%に低下し、その後 181 日には 58.9%まで低下した。主要分解生成物は認められず、未同定の分解生成物が微量検出されたに過ぎなかった。

3) 抽出残渣中放射能の特徴付け

塩基性メタノール抽出されなかった抽出残渣中放射能について、腐植質中における分布について検討した。その結果を下表に示す。

表 4：抽出残渣中放射能の腐植質中における分布（処理量%）

培養期間 (日)	抽出残渣	フルボ酸	フミン酸	フミン質
0*	8.8	4.2	0.5	3.5
2*	18.9	9.0	1.1	8.6
7*	23.8	10.9	1.2	11.4
14*	27.2	13.0	1.6	12.8
30	30.3	13.3	0.9	14.9
61*	31.1	13.8	1.3	15.4
90*	33.5	14.5	1.7	14.6
120*	33.7	15.9	2.3	15.9
181	35.3	11.3	3.4	18.5

* 追加分析された値

4) の減衰速度

本試験で得られた抽出物中 及びフルボ酸中 の分析値及びこの分析値から求めた の好氣的条件下における土壌中減衰速度を表 5 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 5：塩基性メタノール抽出物中及びフルボ酸画分中の処理量%

培養期間 (日)	溶媒抽出物	フルボ酸画分	合計
0	89.0 (0.935)	4.1 (0.043)	93.1 (0.978)
2	79.3 (0.833)	8.9 (0.094)	88.2 (0.927)
7	74.1 (0.778)	10.8 (0.113)	84.9 (0.891)
14	69.9 (0.734)	12.8 (0.134)	82.7 (0.868)
30	67.2 (0.706)	13.2 (0.139)	80.4 (0.845)
61	65.8 (0.691)	13.8 (0.145)	79.6 (0.836)
90	64.0 (0.672)	14.2 (0.149)	78.2 (0.821)
120	61.6 (0.647)	15.8 (0.166)	77.4 (0.813)
181	58.9 (0.618)	11.1 (0.117)	70.0 (0.735)

() : mg·ep/kg

表 6：土壌中減衰速度（二相性モデル）

	軽塩土
DT ₅₀ (日)	670
DT ₉₀ (日)	2498
相関係数R ²	0.976

フルボ酸画分中放射能の大部分は未変化の ^{14}C であった。最初の溶媒抽出により抽出された ^{14}C とフルボ酸中 ^{14}C を合算して求めた ^{14}C 合計量は二相性に一次減衰式 ($y=b \cdot e^{-k_2t} + a \cdot e^{-k_1t}$) に従って減少した。この減衰式から算出した ^{14}C の好氣的土壌中における DT₅₀ は 670 日、DT₉₀ は 2498 日で、 ^{14}C の好氣的土壌中ではゆっくり分解されることが明らかになった。また、本試験条件における ^{14}C の主要分解生成物は腐植質から検出される結合残留物以外は検出されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(4) イミシアホスの嫌氣的土壤中運命試験

(資料 代 12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

供試標識化合物:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学構造:

化学名:

ロット番号:

比放射能: 3.31 MBq/mg

放射化学的純度:

[¹⁴C-]イミシアホス

化学名:

ロット番号:

放射化学的純度:

比放射能: 3.61 MBq/mg

供試土壌: 英国及び日本の土壌を試験に使用した。試験に使用した土壌の特性を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 1：試験土壌の特性

土壌の名称		PT102	Fukuoka
採取地		英国 Ipswich (草原)	福岡県 (試験場)
採取年月日		2002年12月19日	2003年4月23日
粒径分布 (USDA 法)	53~2000 μm	50	41
	2~53 μm	38	39
	<2 μm	12	20
粒径分布 (ISS 法)	20~2000 μm	56	47
	2~20 μm	32	33
	<2 μm	12	20
pH (H ₂ O)		6.2	6.4
有機物量 (%)		5.5	2.4
陽イオン交換容量 (mEq/100g)		13.7	33.0
最大保水量 (%、pF 0)		55.5	65.0
バイオマス ($\mu\text{g C/g}$ 土壌)		238	347
土壌分類	USDA 法	壤土	壤土
	ISS 法	壤土	壤壤土

試験方法：試験は EC ガイドラインに準拠した方法（以下、EC 法：英国土壌）及び農林水産省のガイドラインに準拠した方法（以下、JMAFF 法：日本土壌）で実施した。

1) 試験土壌の調製

[EC 法]

土壌試料を個別の試験容器（内径約 6 cm）に 5 cm の深さになるように入れた（乾燥重量約 102 g）。土壌表面上 3 cm の深さになるように試験容器に逆浸透水を加えた。試験容器には窒素を連続的に流すと同時に、全試験期間を通じて試験容器を 20±2℃、暗所で維持した。試験容器には、30 日間の前培養後に放射能標識被験物質約 115 μg (1.54 mg/kg、土壌密度を 1.3 g/cm³ と仮定した場合の有効成分投下量 4 kg/ha に相当) を処理した。この時点で、土壌の酸化還元電位は 200 mV 以下であった。

[JMAFF 法]

土壌試料を個別の試験容器（内径約 4.5 cm）に 5 cm の深さになるように入れた（乾燥重量約 112 g）。土壌表面上 6 cm の深さになるように試験容器に逆浸透水を加えた。試験容器には窒素を連続的に流すと同時に、全試験期間を通じて試験容器を 25±2℃、暗所で維持した。土壌の酸化還元電位が 0 mV 以下に低下した時点（88 日）で、試験容器に放射能標識被験物質約 224 μg (2.0 mg/kg、土壌密度を 1.0 g/cm³ と仮定した場合の有効成分投下量 4 kg/ha に相当) を処理した。

2) 放射能標識化合物添加及び培養

放射能標識化合物のアセトニトリル溶液（ $\leq 120\mu\text{L}$ ）を水層に処理し、培養 0 日試料を除いて、直ちに揮発性物質トラップ系と接続して培養を開始した。但し、JMAFF 法では放射能標識化合物を処理後、揮発性物質トラップ系と接続する前に水層と土壌層を攪

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

拌混和した。

被験物質処理後、試験系の表面を通過させた空気を一連のトラップ（エタンジオール、2%パラフィン/キシレン溶液及び2個の2M水酸化ナトリウム溶液）に通して、発生した放射能物質を捕集した（図1）。EC法では、標識体の試験において、77日に2個の2M水酸化ナトリウム溶液トラップを連結した触媒コンバーターを上記の水酸化ナトリウムトラップの後段に接続した（図2）。JMAFF法では、異なるトラップ系も使用した。すなわち、標識体の試験において、ポリウレタンフォームトラップ、冷却エタノール：プロパノールトラップ、2M硫酸トラップ、エタンジオールトラップ、2%パラフィン/キシレントラップ及び2個の2M水酸化ナトリウム溶液トラップから構成されるトラップ系を使用し、さらに14日以降はその後段に触媒コンバーター（2個の水酸化ナトリウム溶液トラップ付き）を併用した（図3）。以上の他に、日本土壌では試験容器から発生するすべての揮発性物質を触媒コンバーター（2個の水酸化ナトリウム溶液トラップ付き）を直接繋いだものも使用した（図4）。

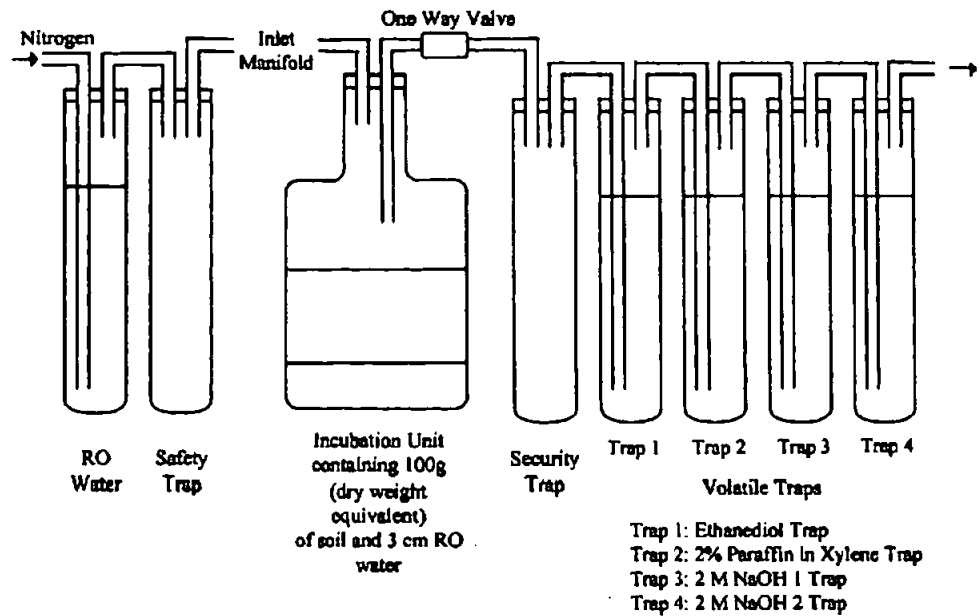


図1：EC法及びJMAFF法における基本的な試験系模式図

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

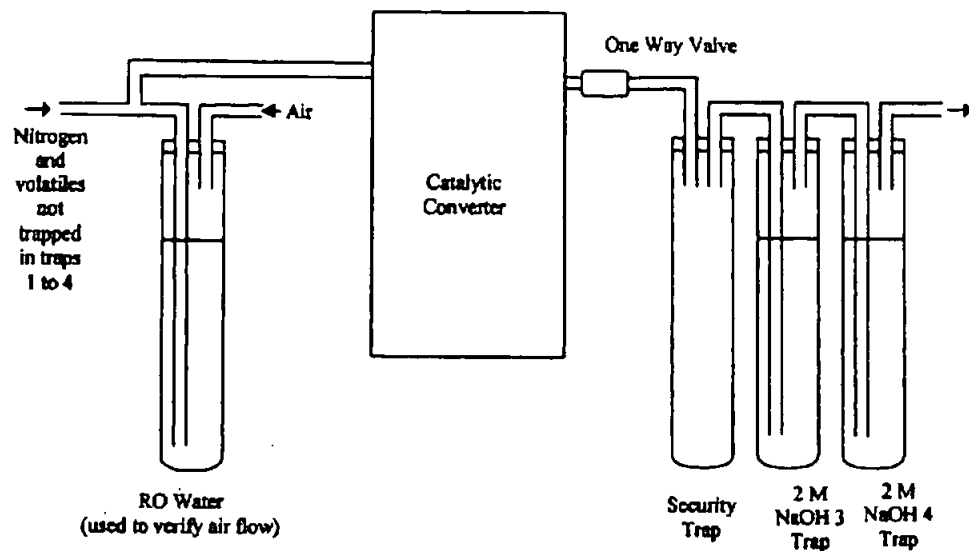


図 2 : EC 法で 77 日以降に適用した触媒コンバーター系の模式図

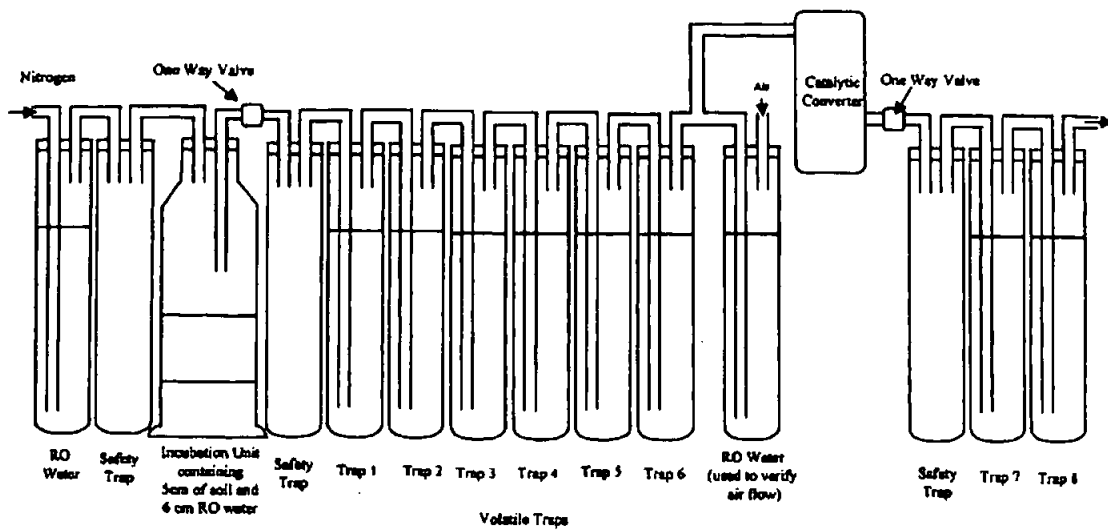


図 3 : JMAFF 法で 標識体に適用した試験系の模式図

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

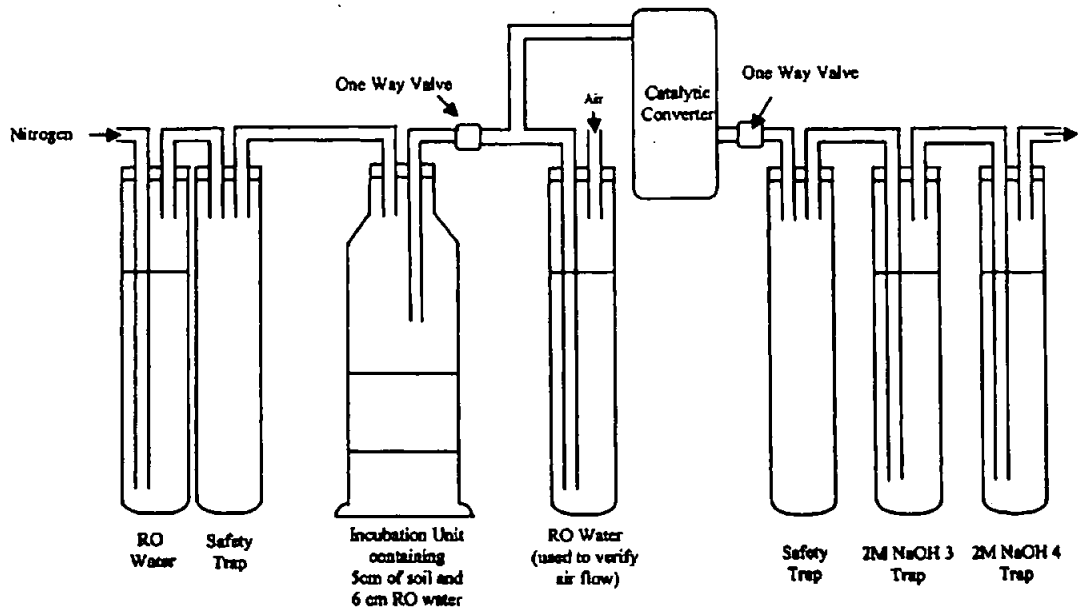


図 4：日本土壌試験容器に触媒コンバーターを直結された試験系の模式図

3) 試料採取及び分析法

被験物質添加後 0 日（添加直後）、3 日、1 週、2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、4 ヶ月及び 6 ヶ月各 1 個の試験容器を採取し、表層水と土壌層に分別した。0 日を除く試料採取日には、トラップ中の捕集液も分析用に採取した。

表層水は浮遊物を遠心分離により除去して LSC 分析及び HPLC 分析に供した。この際、標識体処理試料については表層水の一部を、2M NaOH トラップに繋ぎ、次いで表層水試料に塩酸を滴下して、水層中に溶存している $^{14}\text{CO}_2$ を捕集した。

土壌試料は図 5 に示すフローチャートに従って調製した。即ち、土壌はアセトニトリル：水及びアセトニトリルで抽出し、HPLC 分析及び LSC 分析に供した。必要に応じて、メタノール：水：水酸化ナトリウムを用いた塩基抽出法及びメタノール：水：酢酸による還流抽出法も採用した。

抽出残渣中放射能量は燃焼法で測定した。一部試料については腐植質の分画も行った。また、

代謝物の同定は、合成標品との HPLC 及び TLC によるコクロマトグラフィーにより行った。また、水酸化ナトリウムトラップに捕集された放射能は炭酸バリウム沈殿法で炭酸ガスであることを確認した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

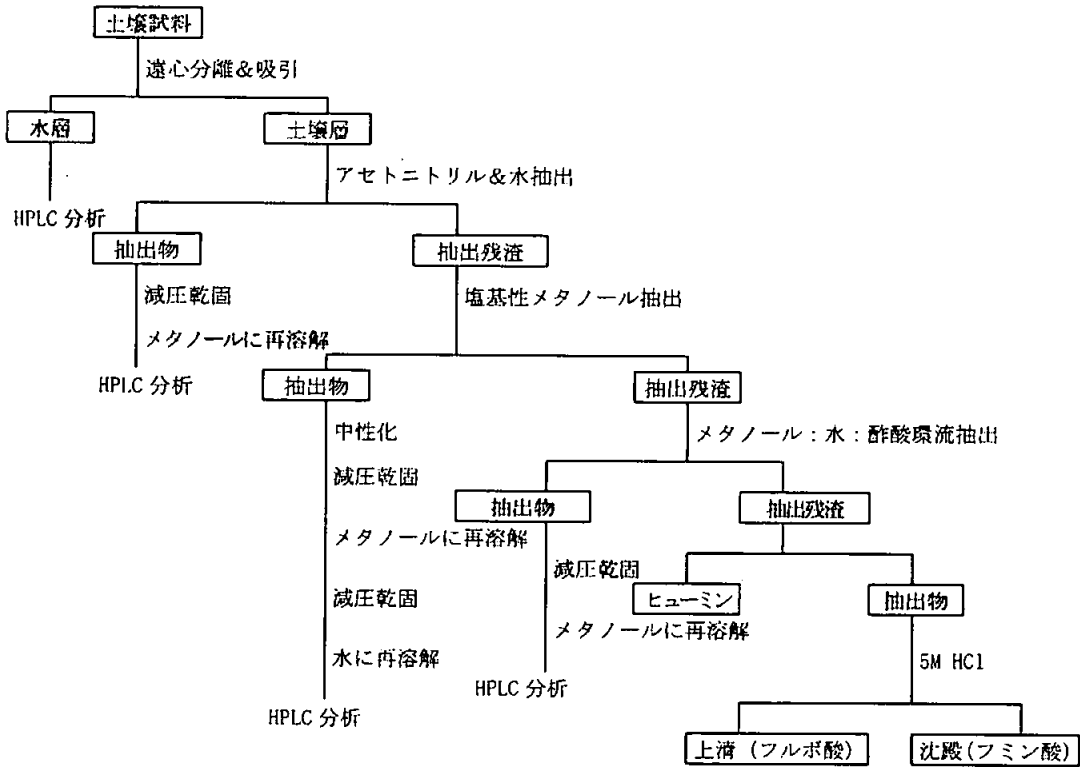


図5：土壌試料中放射能の分析フローチャート

試験結果：

1) 酸化還元電位及び酸素濃度

試験期間中の土壌における酸化還元電位及び酸素濃度を以下に示す。

表2：培養期間中の土壌の酸化還元電位及び水中溶存酸素濃度

培養期間 (日)	酸化還元電位 (mV)				溶存酸素 (%)			
	標識体		標識体		標識体		標識体	
	PT102	Fukuoka	PT102	Fukuoka	PT102	Fukuoka	PT102	Fukuoka
0	115	-16	90	-9	1	0	1	0
3	69	77	104	54	2	20	1	13
6 (7)	106	64	99	58	1	5	2	5
14	93	3	82	2	0	4	0	4
30 (31)	88	21	73	17	1	1	3	3
58 (59)	40	131	71	132	1	0	2	0
119 (120)	26	28	14	18	1	1	0	1
180 (181)	55	-4	47	-3	3	1	2	3

被験物質処理時点の酸化還元電位はPT102で90~115 mV、Fukuoka土壌で-9 mV~-16 mVであった。Fukuoka土壌ではその後プラスに転じたが、いずれの土壌においても、培養期間中は概ね100 mV以下であった。また溶存酸素量も一部の例外を除いて

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

5%以下、大部分は3%以下であった。

2) 放射能の分布及び物質収支

被験物質添加後の経時的放射能分布及び物質収支（処理量%）を以下に示す。

表3： 標識体を用いた試験における放射能分布（%）

試験化合物	試験土壌	培養期間（日）	表層水	土壌抽出物				抽出残渣	揮発性放射能	物質収支
				溶媒抽出	塩基抽出	還流抽出	小計			
標識体	PT102	0	99.8	0.4	ND	NA	0.4	ND	NA	100.2
		3	88.1	10.6	0.7	NA	11.3	0.1	ND	99.5
		6	80.9	16.6	1.6	NA	18.2	0.3	ND	99.4
		14	66.7	25.9	5.2	NA	31.1	1.5	ND	99.3
		31	52.7	28.8	13.2	NA	42.0	4.9	ND	99.6
		59	34.5	34.4	21.2	NA	55.6	8.8	ND	98.9
		119	23.0	32.5	27.9	NA	60.4	15.5	ND	98.9
		180	16.1	30.8	31.1	NA	61.9	19.7	ND	97.7
	Fukuoka	0	49.8	47.8	NA	NA	47.8	2.6	NA	100.2
		3	58.8	36.6	4.0	NA	40.6	1.0	ND	100.4
		7	53.3	39.0	5.8	NA	44.8	1.8	ND	99.9
		14	55.1	33.3	6.9	NA	40.2	2.8	ND	98.1
		30	44.9	32.0	16.8	NA	48.8	6.2	ND	99.9
		58	31.3	35.4	21.2	NA	56.6	11.3	ND	99.2
		120	13.7	33.3	30.4	NA	63.7	21.3	ND	98.7
181		11.0	28.9	34.1	NA	63.0	25.0	0.4	99.4	

表4： 標識体を用いた試験における放射能分布（%）

試験化合物	試験土壌	培養期間（日）	表層水	土壌抽出物				抽出残渣	揮発性放射能	物質収支
				溶媒抽出	塩基抽出	還流抽出	小計			
標識体	PT102	0	99.5	0.5	ND	NA	0.5	ND	NA	100.0
		3	89.7	9.9	0.5	NA	10.4	0.2	0.1	100.4
		6	82.9	15.5	0.8	NA	16.3	0.6	0.3	100.1
		14	69.3	24.9	2.3	NA	27.2	2.4	0.4	99.3
		31	55.9	27.8	1.5	3.9	33.2	4.7	3.8	97.6
		59	35.3	24.2	NA	4.1	28.3	13.1	11.0	87.7
		119	12.5	11.8	NA	3.4	15.2	21.8	32.6	82.1
		180	7.5	6.2	NA	3.6	9.8	22.5	40.1	79.9
	Fukuoka	0	56.5	43.7	NA	NA	43.7	2.2	NA	102.4
		3	62.9	32.9	NA	3.0	35.9	1.7	0.2	100.7
		7	61.6	30.9	NA	3.4	34.3	3.1	0.8	99.8
		14	55.3	28.9	NA	4.1	33.0	5.0	3.3	96.6
		30	41.4	30.4	NA	5.8	36.2	9.6	9.0	96.2
		58	23.3	24.9	NA	8.1	33.0	15.0	14.9	86.2
		120	7.3	15.2	NA	5.8	21.0	20.5	33.3	82.3
181		2.4	9.0	NA	5.3	14.3	25.0	24.0	65.8	

EC法（PT102土壌）における水層中放射能量は、処理直後のほぼ100%から180日に

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

は 16.1% (標識体) 及び 7.5% (標識体) に減少した。 標識体処理した土壌から抽出された放射能量は、180 日後には処理放射能の 61.9%に増加した。 標識体を用いた場合、31 日に 33.2%に増加した後、180 日には 9.8%に減少した。 標識体処理土壌から発生した揮発性放射能量は 180 日には 40.1%に増加したが、 標識体処理土壌では、明らかな揮発性代謝物は認められなかった。

JMAFF 法 (Fukuoka 土壌) では、被験物質処理直後、土壌と水層を混合したことから、放射能分布は EC 法と異なっていた。全体的に、水層中放射能量は 181 日には処理放射能の 49.8~56.5%から 2.4% (標識体) 及び 11.0% (標識体) に減少した。土壌から抽出された放射能量は、181 日間に、処理放射能量の 47.8%~63.0% (標識体) 及び 43.7%~14.3% (標識体) に変化した。 標識体処理土壌から発生した揮発性放射能は 120 日には 33.3%に増加したが、 標識体で処理した試験系には、明らかな揮発性代謝物は形成されなかった。

試験系全体における放射能回収率は 標識体を用いた試験では PT102 及び Fukuoka のいずれも放射能回収率は 97%以上であった。 標識体を使用した試験ではいずれの土壌においても徐々に放射能回収率は低下し、180 日の時点では 65.8~79.9%であった。

以下に 標識体及び 標識体における揮発性物質の分布を示す。

表 5 : 標識体を用いた試験における揮発性放射能及び洗浄液中放射能 (%)

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	水層 + 土壌中放射能	揮発性放射能				物質収支
				エタンジ オール	パラフィン キレン	NaOH	小計	
標識体	PT102	0	100.2	NA	NA	NA	NA	100.2
		3	99.5	ND	ND	ND	ND	99.5
		6	99.4	ND	ND	ND	ND	99.4
		14	99.3	ND	ND	ND	ND	99.3
		31	99.6	ND	ND	ND	ND	99.6
		59	98.9	ND	ND	ND	ND	98.9
		119	98.9	ND	ND	ND	ND	98.9
		180	97.7	ND	ND	ND	ND	97.7
	Fukuoka	0	100.2	NA	NA	NA	NA	100.2
		3	100.4	ND	ND	ND	ND	100.4
		7	99.9	ND	ND	ND	ND	99.9
		14	98.1	ND	ND	ND	ND	98.1
		30	99.9	ND	ND	ND	ND	99.9
		58	99.2	ND	ND	ND	ND	99.2
	120	98.7	ND	ND	ND	ND	98.7	
	181	99.0	ND	ND	0.4	0.4	99.4	

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 6： 標識体を用いた試験における揮発性放射能及び洗浄液中放射能 (%)

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	水層 + 土壌中放射能	揮発性放射能					チューブ等洗浄液	物質収支
				エタノール	パラフィンキレン	NaOH	追加トラップ	小計		
標識体	PT102	0	100.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100.0
		3	100.3	ND	ND	0.1	NA	0.1	NA	100.4
		6	99.8	ND	0.1	0.2	NA	0.3	NA	100.1
		14	98.9	ND	0.1	0.3	NA	0.4	NA	99.3
		31	93.8	0.1	0.5	3.2	NA	3.8	NA	97.6
		59	76.7	0.1	1.6	9.3	NA	11.0	NA	87.7
		119	49.5	0.2	1.0	31.4	NA	32.6	NA	82.1
		180	39.8	0.2	1.2	38.1	NA	40.1	NA	79.9
	Fukuoka	0	102.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	102.4
		3	100.5	ND	ND	0.2	ND	0.2	NA	100.7
		7	99.0	ND	ND	0.8	ND	0.8	NA	99.8
		14	93.3	ND	ND	2.9	0.4	3.3	NA	96.6
		30	87.2	ND	ND	8.5	0.5	9.0	NA	96.2
		58	71.3	ND	ND	14.3	0.6	14.9	NA	86.2
		120	48.8	0.1	0.7	31.3	1.2	33.3	0.2	82.3
181	41.7	ND	0.1	23.0	0.9	24.0	0.1	65.8		

標識体ではいずれの土壌にも有意な揮発性物質の発現は認められなかったが、標識体では NaOH トラップに多くの放射能が捕集され、大部分が炭酸ガスであることが確認された。

放射能回収率の改善を試みるために、標識体の Fukuoka 土壌試験において、ウレタンフォームトラップ、エタノール/プロパノールトラップ、硫酸トラップ及び NaOH トラップを追加し、さらに試験容器及びチューブ類に吸着されている放射能の回収を試みた。その結果を下表に示す。

表 7： 追加トラップ及び洗浄液中放射能 (%)

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	追加トラップ				洗浄液	
			ウレタン泡栓	エタノール/プロパノール	硫酸	NaOH	チューブ類	試験容器
標識体	Fukuoka	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		3	ND	ND	ND	ND	NA	NA
		7	ND	ND	ND	ND	NA	NA
		14	ND	0.4	ND	ND	NA	NA
		30	ND	0.5	ND	ND	NA	NA
		58	ND	0.6	ND	ND	NA	NA
		120	ND	0.8	ND	0.4	0.2	NA
		181	ND	0.9	ND	ND	0.1	NA

表 7 に示す通り、追加トラップでは有意な放射能の回収ができず、試験系に使用したチューブ類や試験容器からも、有意な放射能は回収されなかった。

そこで、試験系に触媒コンバーターを直結して、全ての揮発性放射能を触媒コンバーターで炭酸ガスに変換して NaOH トラップで捕集した。その結果 (%) を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 8：触媒コンバーターを土壤容器と直結して培養した場合の放射能分布 (%)

試験化合物	試験土壤	培養期間 (日)	水層	土壤	揮発性放射能	チューブ等洗浄液	容器洗浄液	物質収支
標識体	Fukuoka	181	2.4	39.3	24.0	0.1	NA	65.8
			4.0	33.4	59.7	ND	0.1	97.2

上段は通常の試験、下段は触媒コンバーターを直結した試験

この試験における水層中及び土壤中放射能量は通常の試験法の結果と大差なかった。触媒コンバーターを土壤容器と直結して 181 日間培養した後の放射能回収率は 97.2%と良好で、特に揮発性放射能回収量が増加した。このことは通常の試験系で発生した揮発性放射能が、採用したトラップ系では捕集されないことを示していた。

3) 抽出物の HPLC 分析

土壤抽出物及び水層中の放射能物質の HPLC 分析結果を水層中から NaOH トラップに回収された溶存炭酸ガス量 (標識体試料のみ) と併せて以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 9： 標識体処理した PT102 土壌における分解生成物（処理量%）

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	分析試料	イミシ アホス						合計	
標識体	PT102	0	水層	98.6	ND	ND	ND	ND	1.2	99.8	
			土壌層	溶媒抽出物	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND
		合計	98.6	ND	ND	ND	ND	1.6	100.2		
		3	水層	83.0	ND	1.7	3.1	ND	0.3	88.1	
			土壌層	溶媒抽出物	10.4	ND	ND	0.2	ND	ND	10.6
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	NA	0.7	0.7
		合計	93.4	ND	1.7	3.3	ND	1.0	99.4		
		6	水層	70.2	ND	3.4	6.2	0.6	0.5	80.9	
			土壌層	溶媒抽出物	15.1	0.6	0.4	0.3	ND	0.2	16.6
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	NA	1.6	1.6
		合計	85.3	0.6	3.8	6.5	0.6	2.3	99.1		
		14	水層	47.4	2.2	6.3	9.3	0.7	0.8	66.7	
			土壌層	溶媒抽出物	21.3	2.8	0.8	1.0	ND	ND	25.9
				塩基抽出物	ND	3.6	ND	1.6	ND	ND	5.2
		合計	68.7	8.6	7.1	11.9	0.7	0.8	97.8		
		31	水層	25.7	4.1	9.2	12.1	0.7	0.9	52.7	
			土壌層	溶媒抽出物	20.3	5.4	1.0	2.0	ND	0.1	28.8
				塩基抽出物	ND	11.1	ND	1.8	ND	0.3	13.2
		合計	46.0	20.6	10.2	15.9	0.7	1.3	94.7		
		59	水層	15.7	4.9	7.0	6.2	0.4	0.3	34.5	
			土壌層	溶媒抽出物	18.4	11.0	2.0	2.6	ND	0.4	34.4
				塩基抽出物	ND	17.1	ND	2.7	ND	1.4	21.2
		合計	34.1	33.0	9.0	11.5	0.4	2.1	90.1		
119	水層	3.0	10.0	5.3	4.5	ND	0.2	23.0			
	土壌層	溶媒抽出物	7.8	19.8	1.3	3.2	ND	0.4	32.5		
		塩基抽出物	ND	26.3	ND	1.1	ND	0.5	27.9		
合計	10.8	56.1	6.6	8.8	ND	1.1	83.4				
180	水層	1.4	9.7	1.8	3.2	ND	1.1	16.1			
	土壌層	溶媒抽出物	3.2	23.1	0.6	3.7	ND	0.2	30.8		
		塩基抽出物	ND	29.4	ND	1.2	ND	0.6	31.1		
合計	4.6	62.1	2.4	8.0	ND	0.8	78.0				

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 10： 標識体処理した Fukuoka 土壌における分解生成物 (処理量%)

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	分析試料	イミシ アホス						合計	
標識体	Fukuoka	0	水層	48.0	ND	ND	ND	ND	1.8	49.8	
			土壌層	溶媒抽出物	47.1	0.1	ND	0.2	ND	0.4	47.8
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			合計	95.1	0.1	ND	0.2	ND	2.2	97.6	
		3	水層	56.5	0.3	0.3	1.0	ND	0.7	58.8	
			土壌層	溶媒抽出物	35.0	ND	ND	1.3	ND	0.3	36.6
				塩基抽出物	ND	0.7	ND	3.3	ND	ND	4.0
			合計	91.5	1.0	0.3	5.7	ND	0.9	99.4	
		7	水層	48.6	0.3	0.9	2.7	0.7	0.1	53.3	
			土壌層	溶媒抽出物	35.6	ND	0.3	2.8	ND	0.3	39.0
				塩基抽出物	ND	1.8	ND	4.0	ND	ND	5.8
			合計	84.2	2.1	2.6	9.5	0.7	0.4	98.1	
		14	水層	44.0	1.4	2.4	5.8	1.1	0.4	55.1	
			土壌層	溶媒抽出物	28.4	0.3	0.1	4.3	0.2	0.1	33.3
				塩基抽出物	ND	2.9	ND	4.0	ND	ND	6.9
			合計	72.4	4.5	2.6	14.1	1.3	0.5	95.3	
		30	水層	26.3	8.9	4.9	3.4	1.0	0.4	44.9	
			土壌層	溶媒抽出物	23.9	0.9	0.5	6.6	ND	0.2	32.0
				塩基抽出物	ND	12.2	ND	4.5	ND	0.1	16.8
			合計	50.2	22.0	5.4	14.4	1.0	0.7	93.7	
		58	水層	14.4	1.8	3.0	9.4	ND	2.7	31.3	
			土壌層	溶媒抽出物	19.3	0.6	0.4	14.3	ND	0.8	35.4
				塩基抽出物	ND	12.2	ND	8.9	ND	0.2	21.2
			合計	33.7	14.6	3.4	32.6	ND	3.7	87.9	
		120	水層	4.1	2.1	0.6	6.9	ND	0.1	13.7	
			土壌層	溶媒抽出物	12.0	2.0	ND	18.7	ND	0.6	33.3
				塩基抽出物	ND	20.9	ND	8.3	ND	1.3	30.4
合計	16.0		25.0	0.6	33.9	ND	1.9	77.4			
181	水層	1.3	2.7	0.6	6.4	ND	0.1	11.0			
	土壌層	溶媒抽出物	6.3	1.8	ND	20.7	ND	0.1	28.9		
		塩基抽出物	ND	26.1	ND	6.4	ND	1.8	34.1		
	合計	7.6	30.6	0.6	33.4	ND	1.9	74.0			

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 11 : 標識体処理した PT102 土壌における分解生成物 (処理量%)

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	分析試料	イミシ アホス						合計	
標識体	PT102	0	水層	97.3	ND	ND	ND	2.2	NA	99.5	
			土壌層	溶媒抽出物	NA	NA	NA	NA	0.5	NA	0.5
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	ND	NA	ND
			合計	97.3	ND	ND	ND	2.7	NA	100.0	
		3	水層	81.0	1.3	5.1	ND	1.3	NA	89.7	
			土壌層	溶媒抽出物	9.4	ND	0.5	ND	ND	NA	9.9
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	0.5	NA	0.5
			合計	90.4	1.3	5.6	ND	2.8	NA	100.1	
		6	水層	69.5	2.1	8.4	1.5	1.4	NA	82.9	
			土壌層	溶媒抽出物	14.9	0.2	0.3	ND	0.1	NA	15.5
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	0.8	NA	0.8
			合計	84.4	2.3	8.7	1.5	2.3	NA	99.2	
		14	水層	54.7	3.6	8.6	2.3	0.1	NA	69.3	
			土壌層	溶媒抽出物	21.8	0.7	0.6	ND	1.8	NA	24.9
				塩基抽出物	ND	ND	0.2	ND	1.3	0.5	2.0
			合計	76.5	4.3	9.4	2.3	3.2	0.5	96.2	
		31	水層	26.2	6.9	15.0	6.6	1.3	NA	55.9	
			土壌層	溶媒抽出物	22.9	1.0	1.0	ND	2.9	NA	27.8
				環流抽出物	2.0	ND	0.2	ND	0.3	1.3	3.8
				塩基抽出物	NA	NA	NA	NA	1.5	NA	1.5
		合計	51.1	7.9	16.2	6.6	6.0	1.3	89.0		
		59	水層	13.5	5.5	6.2	9.7	0.4	NA	35.3	
			土壌層	溶媒抽出物	20.3	1.8	0.6	ND	1.5	NA	24.2
				塩基抽出物	3.7	ND	ND	ND	ND	0.6	4.3
			合計	37.5	7.3	6.8	9.7	1.9	0.6	63.8	
		119	水層	3.1	2.5	ND	6.7	0.2	NA	12.5	
			土壌層	溶媒抽出物	9.0	0.9	ND	ND	0.2	0.2	10.3
				塩基抽出物	2.7	ND	ND	ND	ND	0.6	3.3
			合計	14.8	3.4	ND	6.7	0.4	0.8	26.1	
		180	水層	0.6	1.8	0.6	4.4	0.1	NA	7.5	
土壌層	溶媒抽出物		4.4	0.6	0.2	ND	ND	0.2	5.4		
	塩基抽出物		2.7	ND	ND	ND	0.1	0.5	3.2		
合計	7.7		2.4	0.8	4.4	0.1	0.7	16.1			

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 12： 標識体処理した Fukuoka 土壌における分解生成物（処理量%）

試験化合物	試験土壌	培養期間 (日)	分析試料	イミシアホス						合計	
標識体	Fukuoka	0	水層	54.2	ND	1.3	ND	1.1	NA	56.5	
			土壌層	溶媒抽出物	42.5	ND	0.3	ND	0.9	NA	43.7
				塩基抽出物	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA
			合計	96.6	ND	1.6	ND	2.0	NA	100.2	
		3	水層	59.3	ND	1.9	0.8	0.9	NA	62.9	
			土壌層	溶媒抽出物	32.0	ND	0.3	ND	0.6	NA	32.9
				塩基抽出物	3.0	ND	ND	ND	ND	NA	3.0
			合計	94.3	ND	2.2	0.8	1.4	NA	98.8	
		7	水層	53.8	1.1	4.7	1.4	0.6	NA	61.6	
			土壌層	溶媒抽出物	30.1	ND	0.6	ND	0.2	NA	30.9
				塩基抽出物	3.4	ND	ND	ND	ND	NA	3.4
			合計	87.2	1.1	5.4	1.4	0.9	NA	95.9	
		14	水層	44.1	2.0	6.2	2.6	0.4	NA	55.3	
			土壌層	溶媒抽出物	27.8	0.3	0.6	ND	0.2	NA	28.9
				塩基抽出物	2.8	ND	0.5	ND	ND	0.7	4.1
			合計	74.7	2.3	7.3	2.6	0.6	0.7	88.3	
		30	水層	32.3	1.5	3.5	4.0	ND	NA	41.4	
			土壌層	溶媒抽出物	29.7	0.2	0.2	ND	ND	0.3	30.4
				還流抽出物	4.8	ND	0.3	ND	ND	0.7	5.8
			合計	66.8	1.7	4.0	4.0	0.1	1.0	77.6	
		58	水層	15.5	1.5	1.7	4.1	0.5	NA	23.3	
			土壌層	溶媒抽出物	23.7	0.4	0.2	ND	0.2	0.4	24.9
				還流抽出物	6.0	ND	0.8	ND	0.1	1.2	8.1
			合計	45.3	1.8	2.8	4.1	0.7	1.6	56.3	
		120	水層	4.4	0.6	0.4	1.9	0.1	NA	7.3	
			土壌層	溶媒抽出物	14.4	ND	ND	ND	0.2	0.6	15.2
				還流抽出物	3.5	ND	0.5	ND	0.5	1.3	5.7
			合計	22.3	0.6	0.9	1.9	0.8	1.9	28.3	
		181	水層	1.9	ND	ND	ND	0.6	NA	2.4	
			土壌層	溶媒抽出物	8.5	ND	ND	ND	0.1	0.4	9.0
還流抽出物	3.6			ND	0.4	ND	ND	1.3	5.3		
合計	13.9		ND	0.4	ND	0.7	1.7	16.7			

[EC法]

試験系全体におけるイミシアホス濃度は、初期の処理放射能の98.6%（標識体）あるいは97.3%（標識体）から培養期間終了時には4.6%（標識体）あるいは7.7%（標識体）に減少した。最初、イミシアホスは全て水層中で認められた。180日には、水層中濃度は処理放射能の約1%に減少した（両標識体）。標識体を用いた場合、土壌中濃度は14日に21.3%に増加した後、180日には3.2%に減少した。標識体でも非常に類似した結果（31日の最大24.9%から180日には7.1%に減少）が得られた。代謝物がイミシアホスの主要な代謝物であった。が脱落した代謝物であることから、標識体処理試料において検出された。全試験系において、濃度は培養期間中を通して速やかに増加し、180日には処理放射能の62.1%に達した。水層中濃度は10.0%（119日）がピークであったが、土壌中濃度はより高く、速やかに増加（180日で52.5%）した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

代謝物 もイミシアホスの主要な代謝物であり、 と同様に

が脱落した代謝物であることから、それは 標識体処理試料に検出された。全試験系において、濃度は 31 日には処理放射能の最大 15.9%に達したが、その後、180 日には 8.0%に減少した。また、水層中濃度も 31 日 (12.1%) にピークに達した。土壤中濃度は水層中濃度よりも低く、59 日後には処理放射能の 6.2%であった。

代謝物 はイミシアホスのその他の主要な代謝物であった。代謝物には

含まれていることから、 標識体及び 標識体処理試料に
検出された。 であることから、

標識体試料における処理量%は 標識体に比べて低く算定される。

標識体を処理した後、全試験系の 濃度は 31 日に処理放射能の最大 10.2%に達したが、180 日には 2.4%に減少した。 のほとんどは水層中で認められ、土壤中濃度は 2%以下であった。

代謝物 はイミシアホスの主要な代謝物で、 標識体処理試料中に検出されただけ
であり、 に対応するものであった。全試験系における濃度は 31

日に処理放射能の 16.2%に増加した後、180 日は 1%以下に減少した。化合物は主に水層中で認められ、土壤中放射能は 1%以下であった。

水層中に認められた溶存二酸化炭素は、 標識体処理試料の水層における主要放射能成分であった。濃度は 59 日に処理放射能の 9.7%に増加した後、180 日には 4.4%に減少した。

その他の化合物は僅か (は 1%未満、 標識体処理試料におけるその他の化合物は合計で 1%以下、EP 標識体処理試料における他の化合物は合計で処理放射能の 4%以下) であった。

[JMAFF 法]

全試験系のイミシアホス濃度は、0 日における処理放射能の 95.1% (標識体) あるいは 96.6% (標識体) から培養期間終了時には 7.6% (標識体) あるいは 13.9% (標識体) に減少した。試験溶液を混合したことから、イミシアホスの 48.0% (標識体) あるいは 54.2% (標識体) だけが、最初に水層中で認められた。181 日には、水層中濃度は処理放射能の 1.3% (標識体) あるいは 1.9% (標識体) に減少した。土壤中濃度は、181 日には 6.3% (標識体) あるいは 12.1% (標識体) に減少した。

全試験系中の 濃度は、培養期間中を通して増加し、181 日には処理放射能の 30.6% に達した。水層中濃度は 8.9% (30 日) でピークに達したが、土壤中濃度はより高く速やかに増加 (181 日で 27.9%) した。

全試験系中の 濃度は、58 日には処理放射能の約 32.6%となりプラトーに達した。水層中濃度は 58 日 (9.4%) でピークに達したが、181 日 (6.4%) には減少した。土壤中濃度は水層中濃度よりも高く、120 及び 181 日は約 27%でプラトーに達した。

標識体イミシアホスを処理した後、全試験系の 濃度は 30 日に処理放射能の最大 5.4%に達したが、181 日には 1%以下に減少した。 のほとんどは水層中で認められ、土壤中濃度は 1%以下であった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

全試験系中の濃度は、14日に処理放射能の7.3%に増加した後、58日には3%以下に減少した。化合物は主に水層中で認められ、土壌中濃度は1%以下であった。

標識体使用後に水層中に認められた溶存二酸化炭素は58日に処理放射能の4.1%に増加した後、181日には0%に減少した。

その他の化合物の存在は僅か（は1%未満、標識体処理試料におけるその他の化合物は合計で3%以下、標識体処理した試料におけるその他の化合物は合計で処理放射能の2%以下）であった。

180日間培養した土壌を用いて抽出残渣中放射能の分画を行った。

結果は以下の通りであった。

試験化合物	試験土壌	培養期間(日)	抽出残渣	フルボ酸	フミン酸	ヒューミン
標識体	PT102	180	19.7	9.0	2.5	9.1
	Fukuoka	181	25.0	9.2	0.3	14.6
標識体	PT102	180	22.5	4.1	6.7	11.7
	Fukuoka	181	25.0	6.0	3.0	14.6

抽出残渣中放射能が腐植質中に取り込まれていることから、土壌中で分解の進んでいることが示唆された。

3) イミシアホスの分解速度及び想定代謝経路

本試験で得られたイミシアホスの濃度推移を一次線形モデルで解析して得られた減衰速度を以下に示す。なお、標識体と標識体の親化合物の動態は類似していたので、その平均値を用いて減衰速度を算出した。

	PT102 土壌 (EC法)			Fukuoka (JMAFF法)		
	全体	水	土壌	全体	水	土壌
DT50 (日)	38	14	81	48	33	85
DT90 (日)	125	74	246	158	108	282

イミシアホスは嫌氣的条件下でも分解されることが示唆され、土壌中より水中における消失速度が速かった。

以下に想定代謝経路図を示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

イミシアホスの嫌氣的湛水土壌中における想定代謝経路図