

(3) マンデストロピンをラットに反復経口投与後の吸収、分布、代謝および排泄

(資料 I-3)

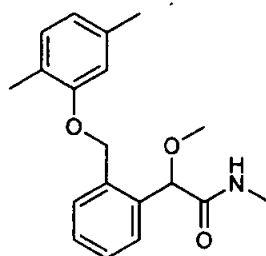
試験機関：Covance Laboratories Ltd

[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

供試標識化合物： [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン

構造式：



*：標識位置

化学名： (R,S)-2-メキシ-N-メチル-2-[α -(2,5-キシリルオキシ)- α -トリル]アセトアミド

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置の設定理由：

供試動物：Cr1:WI(Han)系ラット雌雄 7 週齢

方法：

投与方法：[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンのアセトニトリル溶液に非標識マンデストロピン（純度 100%）のアセトニトリル溶液を加えて同位体希釈を行い、溶媒を蒸発させた後、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させて投与液を調製した。ラット（4 匹/性/群）に[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン投与液を 5 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与した。

また、組織分布を調べるためにラット（4 匹/性/群）に 1 日（単回）、または、6、10 または 14 日間反復経口投与した。

用量設定根拠：

試料の採取：

【排泄物質収支】

^{14}C -マンデストロピンをラットに 1 日目投与後、ガラス製代謝ケージに個別に収容し、14 日目の投与後 24 時間まで、尿および糞を 24 時間ごとに採取し、投与期間中の放射能の回収を測定した。その後ラットを飼育ケージに移し、21 日目まで飼育した。また、投与期間終了後の放射能の回収を測定するため、1~13 日目までの投与期間中は、ラットを飼育ケージに収容し、14 日目投与後に代謝ケージに収容した。14 日目から 28 日目まで、尿および糞を 24 時間ごとに採取した。排泄物の各採取時にケージ屑を除き、ケージを水で洗浄して洗浄液も採取した。最終の洗浄時には水およびメタノールを用いて洗浄し、合わせて洗浄液とした。ケージ屑は全採取期間分を合わせた。

投与期間中の放射能の回収を測定したラットは 21 日目（最終投与後 168 時間）、投与期間終了後の放射能の回収を測定したラットは 28 日目（最終投与後 336 時間）に、麻酔下で心臓穿刺により放血させて屠殺した。血液試料から血漿および赤血球を分離し、副腎、骨、骨髄、脳、盲腸、盲腸内容物、眼、脂肪、被毛および皮膚、心臓、腎臓、大腸、大腸内容物、肝臓、肺、顎下腺、筋肉（大腿四頭筋）、卵巣（雌）、膵臓、下垂体、坐骨神経、小腸、小腸内容物、脊髄、脾臓、胃、胃内容物、精巣（雄）、胸腺、甲状腺、子宮（雌）および残屍体を採取した。

【組織分布】

^{14}C -マンデストロピンをラットに投与後、平底の飼育ケージに収容し、1、6、10 または 14 日間の最終投与後 2 時間に、各投与群の雌雄 4 匹のラットを麻酔下で心臓穿刺により放血させて屠殺した。血液試料から血漿および赤血球を分離し、副腎、骨、骨髄、脳、盲腸、盲腸内容物、眼、脂肪、被毛および皮膚、心臓、腎臓、大腸、大腸内容物、肝臓、肺、顎下腺、筋肉（大腿四頭筋）、卵巣（雌）、膵臓、下垂体、坐骨神経、小腸、小腸内容物、脊髄、脾臓、胃、胃内容物、精巣（雄）、胸腺、甲状腺、子宮（雌）および残屍体を採取した。

分析方法：尿およびケージ洗浄液中の放射能は LSC により測定した。血液、血球、組織、糞抽出残渣およびケージ屑は、組織可溶化剤を加えて可溶化させた後、LSC 分析に供した。骨は燃焼させた後、LSC 分析に供した。残屍体は水酸化カリウムを用いて分解させた後、分解物を LSC 分析に供した。

糞は水を加えてホモジナイズし、アセトニトリル（1 回）およびアセトニトリ

ル：水（1:1）（2回）を用いて抽出した後、一部を可溶化して LSC 分析に供した。血漿も同様に抽出し分析した。抽出液および尿は LSC および HPLC 分析に供した。肝臓および腎臓は、図 1 および 2 に示した方法で分析した。代謝物の同定は、HPLC による標品との保持時間の比較、および LC-MS 分析によって行った。

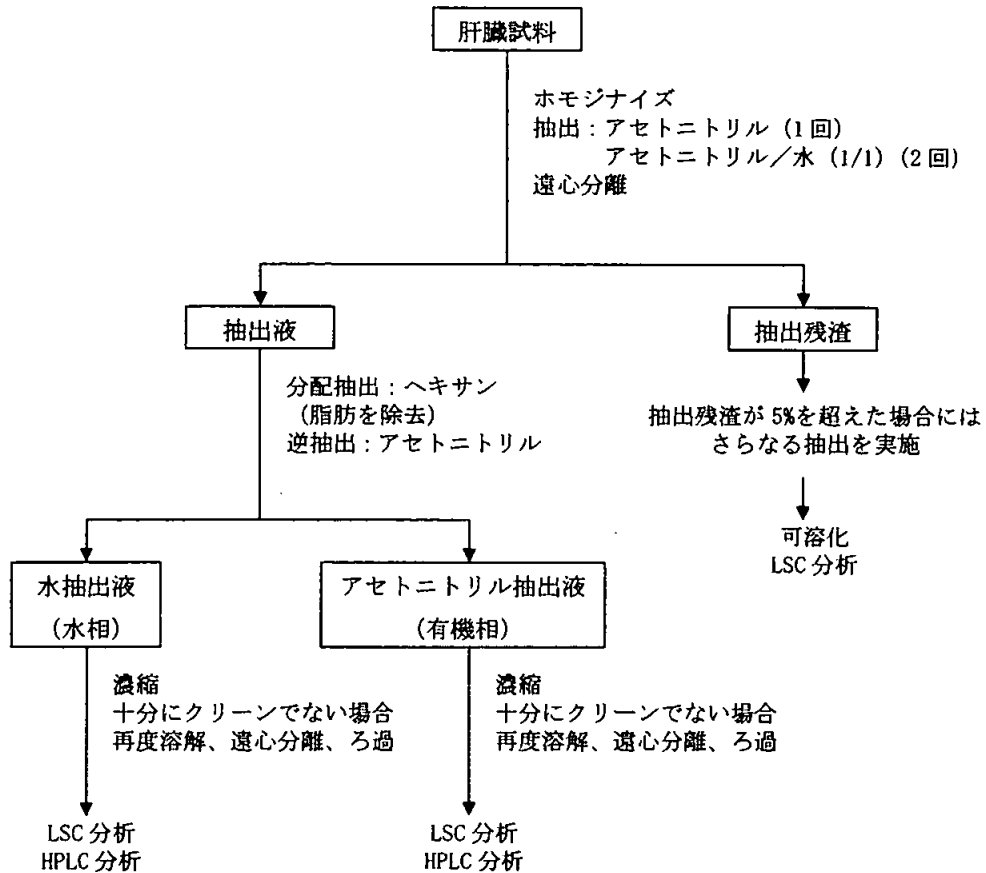


図 1 ^{14}C -マンドエストロピンを投与したラットの肝臓中代謝物の分析スキーム

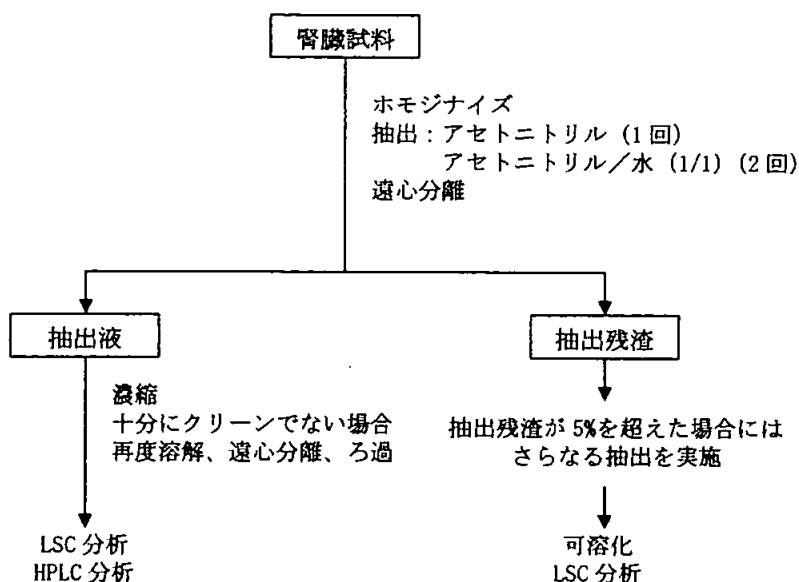


図2 ^{14}C -マンデストロピンを投与したラットの腎臓中代謝物の分析スキーム

結果：

排泄：[ベンジル- ^{14}C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与した雌雄ラットの投与期間中（1 日目～14 日目）の放射能の回収を表 1 に示す。投与した放射能の排泄は、投与期間中一定であり、24 時間ごとに、総投与量の約 5% が排泄された。投与した放射能の総回収率は 72～77% であった。糞が主要な排泄経路であり、14 日目投与後 24 時間までに、投与量の 49～57% が糞中に排泄された。尿中には、投与量の 13～15% が排泄された。組織および残屍体中に検出された放射能は、投与量の 0.2% であった。

[ベンジル- ^{14}C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与した雌雄ラットの投与終了後（14 日目～28 日目）の放射能の回収を表 2 に示す。総投与量の大部分が、14 日目までに既に排泄されていたため、この期間における放射能の総回収率は低く、投与量の 12～13% であった。尿および糞中排泄量は経時的に減少し、14 日目投与後 312～336 時間には投与量の 0.01% 未満となった。糞が主要な排泄経路であり、14 日目投与後 0～336 時間に、投与量の 10～11% が糞中に、2% が尿中に排泄された。組織および残屍体中に検出された放射能は、投与量の 0.1% 未満であった。

これらの結果から、1 日目投与後から最終投与後 336 時間までの放射能の回収率は、雌雄ともに約 80% であった。

排泄経路および排泄率に性差は認められなかった。

表1 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、投与期間中の放射能の回収(1日目~14日目)

採取試料	採取期間 (時間) ^a	投与量に対する割合(%) ^b	
		雄	雌
尿	0~24	0.360	0.389
	24~48	0.532	0.494
	48~72	0.476	0.522
	72~96	0.563	0.634
	96~120	0.886	1.251
	120~144	0.844	1.255
	144~168	0.961	1.007
	168~192	1.074	1.070
	192~216	1.128	1.279
	216~240	1.246	1.121
	240~264	1.224	1.305
	264~288	1.260	1.264
	288~312	1.218	1.658
	312~336	1.480	1.557
小計	13.25	14.81	
糞	0~24	0.930	0.493
	24~48	2.499	2.005
	48~72	2.031	1.696
	72~96	2.080	1.396
	96~120	2.908	2.562
	120~144	4.272	3.206
	144~168	4.415	3.583
	168~192	5.136	3.422
	192~216	5.226	4.699
	216~240	5.720	5.826
	240~264	5.439	4.048
	264~288	4.647	4.812
	288~312	7.136	5.690
	312~336	4.807	6.008
小計	57.25	49.45	

表1 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、投与期間中の放射能の回収(1日目~14日目)(つづき)

採取試料	採取期間 (時間) ^a	投与量に対する割合(%) ^b	
		雄	雌
ケージ洗浄液	0~24	0.077	0.113
	24~48	0.149	0.435
	48~72	0.158	0.252
	72~96	0.249	0.457
	96~120	0.265	0.461
	120~144	0.421	0.577
	144~168	0.467	0.635
	168~192	0.467	0.574
	192~216	0.559	0.617
	216~240	0.341	0.600
	240~264	0.460	0.544
	264~288	0.535	0.578
	288~312	0.529	0.633
	312~336	0.805	0.958
小計		5.482	7.434
ケージ屑	0~336	0.018	0.025
最終ケージ洗浄液	336	0.436	0.346
組織および残屍体	480	0.176	0.194
総回収率		76.61	72.25

a: 1日目投与後の時間を示す。

b: 14日間の総投与量に対する回収率を算出した。

データは4匹の平均値を示す。

表2 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、投与終了後の放射能の回収(14日目～28日目)

採取試料	採取期間 (時間) ^a	投与量に対する割合(%) ^b	
		雄	雌
尿	0～24	1.352	1.361
	24～48	0.255	0.390
	48～72	0.104	0.114
	72～96	0.074	0.081
	96～120	0.038	0.046
	120～144	0.025	0.034
	144～168	0.019	0.020
	168～192	0.009	0.007
	192～216	0.006	0.007
	216～240	0.006	0.005
	240～264	0.003	0.003
	264～288	0.002	0.004
	288～312	0.001	0.001
	312～336	0.002	0.002
小計	1.894	2.074	
糞	0～24	5.784	5.529
	24～48	2.356	2.705
	48～72	0.831	0.960
	72～96	0.487	0.580
	96～120	0.158	0.266
	120～144	0.134	0.198
	144～168	0.078	0.132
	168～192	0.050	0.065
	192～216	0.031	0.049
	216～240	0.020	0.028
	240～264	0.014	0.019
	264～288	0.010	0.014
	288～312	0.006	0.008
	312～336	0.005	0.005
小計	9.965	10.56	

表2 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、投与終了後の放射能の回収 (F群、14日目～28日目) (つづき)

採取試料	採取期間 (時間) ^a	投与量に対する割合 (%) ^b	
		雄	雌
ケージ洗浄液	0～24	0.201	0.444
	24～48	0.094	0.133
	48～72	0.066	0.060
	72～96	0.029	0.036
	96～120	0.013	0.019
	120～144	0.021	0.026
	144～168	0.008	0.010
	168～192	0.011	0.011
	192～216	0.006	0.007
	216～240	0.004	0.006
	240～264	0.005	0.007
	264～288	0.003	0.002
	288～312	0.005	0.003
	312～336	0.003	0.003
小計		0.471	0.769
ケージ屑	0～336	ND	ND
最終ケージ洗浄液	336	0.003	0.005
組織および残屍体	336	0.092	0.063
総回収率		12.42	13.47

a : 14日目投与後の時間を示す。

b : 14日間の総投与量に対する回収率を算出した。

データは4匹の平均値を示す。

ND : 検出されず。

組織分布 : [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに1、6または10日間投与後2時間、または14日間投与後2、168または336時間における組織中放射能の分布を表3～6に示す。

1日目投与後2時間には、採取した組織試料中に、投与放射能の約50%が認められたが、投与日数の経過とともに、投与量に対する割合は減少し、14日目投与後2時間には12%となった。14日目投与後168時間には、組織中放射能は、投与量の0.2%に減少し、336時間には0.1%未満となった。1、6、10または14日目投与後2時間には、組織中放射能の大部分が胃および小腸とその内容物に認められ、大腸および盲腸とその内容物中の放射能の割合もやや高かった。1日目投与後2時間には、肝臓に投与量の2～4%が認められたが、投与日数の経過とともに減少した。14日目投与後168時間および336時間には、各組織中の放

射能の割合は非常に減少し、総投与量の0.1%を超える組織はなかった。

1日目投与後2時間における組織中放射能濃度は、消化管内容物および残屍体を除くと、肝臓で最も高かった。6、10および14日目投与後2時間には、消化管内容物および残屍体を除くと、肝臓、腎臓、膵臓、雌の子宮および卵巣で放射能濃度が高く、脂肪、甲状腺および脾臓でもやや高かった。各組織における放射能濃度は、10日目または14日目投与後2時間に最大となった。14日目投与後168時間および336時間には、全ての組織中濃度が減少し、336時間後には血漿および多くの組織で検出限界未満となった。

以上の結果から、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復投与したラットの組織において、放射能の明らかな蓄積はなく、投与終了後には非常に減少することが示された。また、組織への放射能の分布に性差は認められなかった。

組織中濃度/血漿中濃度比：[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに1、6または10日間投与後2時間、または14日間投与後2、168または336時間の組織中放射能濃度/血漿中放射能濃度比を表7および8に示す。血漿中濃度より高濃度を示した組織は、雄では、肝臓および腎臓であり、他に、膵臓、血液、脂肪、甲状腺、副腎、肺、赤血球、坐骨神経および心臓でやや高濃度であった。雌では、肝臓、子宮、卵巣、膵臓、腎臓、脂肪および甲状腺で血漿中濃度より高濃度を示した。肝臓における組織中放射能濃度/血漿中放射能濃度比は、14日間の投与期間を通して比較的一定であり、雄では6~10、雌では10~12の範囲であった。

表 3 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雄ラットに 1、6 または 10 日間投与後 2 時間における組織中放射能の分布

組織	1 日投与		6 日投与		10 日投与	
	2 時間		2 時間		2 時間	
	µg/g*	TAR%**	µg/g*	TAR%**	µg/g*	TAR%**
副腎	0.315	0.00	0.462	0.00	0.734	0.00
骨	0.066	0.01	0.094	0.00	0.151	0.00
骨髄	0.057	0.00	0.195	0.00	0.146	0.00
脳	0.039	0.01	0.071	0.00	0.108	0.00
盲腸	2.648	0.31	20.27	0.33	33.17	0.35
眼	0.076	0.00	0.131	0.00	0.227	0.00
脂肪	0.339	0.04	0.603	0.01	0.997	0.02
皮膚および被毛	0.167	0.02	0.301	0.01	0.452	0.00
心臓	0.209	0.01	0.301	0.00	0.484	0.00
腎臓	1.157	0.17	1.730	0.04	3.057	0.04
大腸	0.644	0.06	6.706	0.11	16.68	0.16
肝臓	4.724	4.10	7.762	1.01	11.76	0.76
肺	0.288	0.03	0.473	0.01	0.737	0.01
顎下腺	0.147	0.01	0.231	0.00	0.366	0.00
筋肉 (大腿四頭筋)	0.092	0.02	0.145	0.01	0.253	0.00
膵臓	0.571	0.02	1.019	0.01	1.622	0.00
下垂体	0.068	0.00	0.094	0.00	0.751	0.00
坐骨神経	0.221	0.00	0.301	0.00	0.476	0.00
小腸	21.98	6.90	43.02	2.16	62.13	1.60
脊髄	0.033	0.00	0.080	0.00	0.159	0.00
脾臓	0.169	0.01	0.504	0.00	0.476	0.00
胃	7.592	0.98	19.31	0.37	33.77	0.36
精巣	0.131	0.02	0.179	0.01	0.273	0.01
胸腺	0.094	0.01	0.197	0.00	0.280	0.00
甲状腺	0.322	0.00	0.492	0.00	0.908	0.00
血液	0.495	0.01	0.686	0.00	1.031	0.00
血漿	0.773	0.02	1.052	0.00	1.582	0.00
赤血球	0.275	0.01	0.319	0.00	0.431	0.00
胃内容物	20.25	7.23	54.78	2.36	83.54	1.71
小腸内容物	44.26	25.9	132.7	10.3	176.4	7.37
盲腸内容物	3.234	2.02	34.52	3.30	55.55	3.03
大腸内容物	0.160	0.06	15.55	0.65	34.30	0.85
残屍体	0.215	3.27	0.621	1.47	0.996	1.33
合計		51.3		22.1		17.6

データは 4 匹の平均値を示す。

*: µg マンデストロピン換算/g 組織

** : 投与日数 (1、6 または 10 日) における総投与量に対する割合 (%)

表4 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雄ラットに14日間投与後2、168または336時間における組織中放射能の分布

組織	14日投与					
	2時間		168時間		336時間	
	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**
副腎	0.673	0.00	0.013	0.00	ND	ND
骨	0.134	0.00	0.020	0.00	ND	ND
骨髄	0.129	0.00	ND	ND	ND	ND
脳	0.078	0.00	ND	ND	ND	ND
盲腸	42.42	0.23	0.351	0.00	0.032	0.00
眼	0.212	0.00	0.008	0.00	ND	ND
脂肪	1.956	0.02	0.007	0.00	ND	ND
皮膚および被毛	0.450	0.00	0.093	0.00	0.081	0.00
心臓	0.336	0.00	0.008	0.00	ND	ND
腎臓	2.459	0.02	0.109	0.00	0.040	0.00
大腸	20.32	0.10	0.168	0.00	0.009	0.00
肝臓	10.15	0.45	0.415	0.02	0.115	0.00
肺	0.632	0.00	0.032	0.00	ND	ND
顎下腺	0.302	0.00	ND	ND	ND	ND
筋肉(大腿四頭筋)	0.237	0.00	ND	ND	ND	ND
膵臓	11.59 ^a	0.03	0.040	0.00	ND	ND
下垂体	0.428	0.00	ND	ND	ND	ND
坐骨神経	0.433	0.00	0.038	0.00	ND	ND
小腸	95.13	1.70	0.381	0.01	0.061	0.00
脊髄	0.102	0.00	ND	ND	ND	ND
脾臓	0.707	0.00	0.029	0.00	0.021	0.00
胃	26.01	0.17	0.030	0.00	ND	ND
精巣	0.229	0.00	ND	ND	ND	ND
胸腺	0.250	0.00	0.007	0.00	ND	ND
甲状腺	1.122	0.00	0.028	0.00	ND	ND
血液	0.781	0.00	0.064	0.00	0.007	0.00
血漿	1.197	0.00	0.014	0.00	ND	ND
赤血球	0.382	0.00	0.105	0.00	0.038	0.00
胃内容物	94.49	0.98	0.044	0.00	0.016	0.00
小腸内容物	228.3	5.27	1.240	0.05	0.100	0.00
盲腸内容物	53.21	2.11	0.465	0.02	0.047	0.00
大腸内容物	27.34	0.44	0.316	0.01	0.040	0.00
残屍体	0.933	0.83	0.059	0.06	0.086	0.08
合計		12.4		0.18		0.09

a: 特に高濃度であった1例を含む値。

データは4匹の平均値を示す。

ND: 検出されず。

*: μg マンデストロピン換算/g 組織

** : 投与日数(14日)における総投与量に対する割合(%)

表 5 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌ラットに 1、6 または 10 日間投与後 2 時間における組織中放射能の分布

組織	1 日投与		6 日投与		10 日投与	
	2 時間		2 時間		2 時間	
	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**
副腎	0.090	0.00	0.298	0.00	0.427	0.00
骨	0.022	0.00	0.055	0.00	0.092	0.00
骨髓	ND	ND	ND	ND	ND	ND
脳	0.012	0.00	0.039	0.00	0.045	0.00
盲腸	8.859	1.19	30.42	0.42	56.13	0.51
眼	0.041	0.00	0.059	0.00	0.125	0.00
脂肪	0.270	0.02	1.124	0.01	1.151	0.01
皮膚および被毛	0.067	0.01	0.145	0.00	0.302	0.00
心臓	0.081	0.01	0.128	0.00	0.185	0.00
腎臓	0.446	0.07	0.923	0.02	1.094	0.01
大腸	1.466	0.15	10.63	0.18	14.57	0.12
肝臓	2.025	1.68	4.687	0.55	6.618	0.42
肺	0.137	0.02	0.215	0.00	0.417	0.01
顎下腺	0.051	0.00	0.112	0.00	0.192	0.00
筋肉 (大腿四頭筋)	0.058	0.01	0.099	0.00	0.167	0.00
卵巣	0.874	0.01	1.813	0.00	2.360	0.00
膵臓	0.635	0.03	3.239	0.02	2.878	0.01
下垂体	ND	ND	0.091	0.00	ND	ND
坐骨神経	ND	ND	0.095	0.00	0.223	0.00
小腸	17.45	5.70	37.68	1.84	57.84	1.58
脊髄	0.027	0.00	0.035	0.00	0.097	0.00
脾臓	0.168	0.01	0.724	0.01	1.319	0.00
胃	5.772	0.73	8.914	0.17	17.40	0.21
胸腺	0.050	0.00	0.098	0.00	0.149	0.00
甲状腺	0.246	0.00	0.249	0.00	1.201	0.00
子宮	1.310	0.04	3.189	0.02	4.379	0.02
血液	0.145	0.00	0.322	0.00	0.376	0.00
血漿	0.227	0.01	0.513	0.00	0.582	0.00
赤血球	0.067	0.00	0.141	0.00	0.148	0.00
胃内容物	22.32	7.80	16.44	0.78	31.43	0.93
小腸内容物	45.22	21.0	132.0	9.80	167.0	5.71
盲腸内容物	12.29	7.07	41.87	4.22	78.19	3.73
大腸内容物	0.498	0.16	14.71	0.74	44.16	0.64
残屍体	0.239	3.71	0.603	1.45	1.041	1.44
合計		49.5		20.3		15.4

データは 4 匹の平均値を示す。

ND : 検出されず。

* : μg マンデストロピン換算/g 組織

** : 投与日数 (1、6 または 10 日) における総投与量に対する割合 (%)

表6 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雌ラットに14日間投与後2、168 または 336 時間における組織中放射能の分布

組織	14日投与					
	2時間		168時間		336時間	
	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**	μg/g*	TAR%**
副腎	0.522	0.00	0.017	0.00	ND	ND
骨	0.115	0.00	0.010	0.00	0.032	0.00
骨髓	0.092	0.00	ND	ND	ND	ND
脳	0.061	0.00	ND	ND	ND	ND
盲腸	71.51	0.36	0.486	0.00	0.047	0.00
眼	0.119	0.00	ND	ND	ND	ND
脂肪	0.803	0.01	0.036	0.00	ND	ND
皮膚および被毛	0.272	0.00	0.044	0.00	0.040	0.00
心臓	0.244	0.00	ND	ND	ND	ND
腎臓	1.574	0.01	0.091	0.00	0.027	0.00
大腸	16.98	0.09	0.271	0.00	0.014	0.00
肝臓	8.868	0.40	0.686	0.03	0.150	0.01
肺	0.426	0.00	0.033	0.00	ND	ND
顎下腺	0.227	0.00	ND	ND	ND	ND
筋肉(大腿四頭筋)	0.248	0.00	0.006	0.00	ND	ND
卵巣	1.123	0.00	0.105	0.00	0.012	0.00
膵臓	4.370	0.01	0.067	0.00	ND	ND
下垂体	0.261	0.00	ND	ND	ND	ND
坐骨神経	0.336	0.00	ND	ND	ND	ND
小腸	67.35	1.20	0.814	0.02	0.065	0.00
脊髄	0.075	0.00	ND	ND	ND	ND
脾臓	0.840	0.00	0.036	0.00	0.011	0.00
胃	27.01	0.20	0.119	0.00	0.006	0.00
胸腺	0.171	0.00	ND	ND	ND	ND
甲状腺	0.686	0.00	ND	ND	ND	ND
子宮	4.810	0.01	0.090	0.00	0.008	0.00
血液	0.571	0.00	0.044	0.00	ND	ND
血漿	0.868	0.00	0.008	0.00	ND	ND
赤血球	0.208	0.00	0.068	0.00	0.021	0.00
胃内容物	49.32	1.31	0.103	0.00	0.035	0.00
小腸内容物	100.6	4.60	1.508	0.04	0.098	0.00
盲腸内容物	51.58	2.28	0.551	0.02	0.065	0.00
大腸内容物	36.90	0.71	0.622	0.01	0.033	0.00
残屍体	1.165	1.03	0.062	0.06	0.052	0.05
合計		12.3		0.19		0.06

データは4匹の平均値を示す。

ND: 検出されず。

*: μg マンデストロピン換算/g 組織

** : 投与日数(14日)における総投与量に対する割合(%)

表7 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雄ラットに1、6、10または14日間投与後2時間、または14日間投与後168または336時間の組織中放射能濃度/血漿中放射能濃度比

組織	組織/血漿比					
	1日投与	6日投与	10日投与	14日投与		
	2時間	2時間	2時間	2時間	168時間	336時間
副腎	0.425	0.452	0.450	0.626	2.965	NA
骨	0.083	0.090	0.097	0.116	1.455	NA
骨髄	0.226	0.229	0.169	0.227	NA	NA
脳	0.051	0.069	0.071	0.071	NA	NA
盲腸	3.862	20.53	22.47	39.62	23.44	NA
眼	0.099	0.126	0.151	0.187	0.856	NA
脂肪	0.509	0.648	0.586	1.519	1.528	NA
皮膚および被毛	0.217	0.292	0.293	0.413	5.366	NA
心臓	0.273	0.286	0.309	0.292	1.759	NA
腎臓	1.534	1.723	1.950	2.199	7.056	NA
大腸	0.968	7.111	11.60	16.83	11.60	NA
肝臓	6.089	7.562	7.747	9.837	25.76	NA
肺	0.391	0.449	0.480	0.532	2.356	NA
顎下腺	0.191	0.220	0.232	0.261	NA	NA
筋肉(大腿四頭筋)	0.120	0.141	0.160	0.190	NA	NA
膵臓	0.885	1.054	0.997	7.275	4.316	NA
下垂体	0.267	0.287	0.573	0.441	NA	NA
坐骨神経	0.458	0.280	0.304	0.393	NA	NA
小腸	29.73	43.42	41.56	104.3	24.91	NA
脊髄	0.081	0.079	0.129	0.096	NA	NA
脾臓	0.230	0.553	0.298	0.645	2.075	NA
胃	9.542	22.50	21.85	24.58	2.248	NA
精巣	0.162	0.175	0.176	0.212	NA	NA
胸腺	0.121	0.188	0.179	0.210	1.511	NA
甲状腺	0.454	0.473	0.554	1.423	6.197	NA
血液	0.641	0.658	0.657	0.665	4.029	NA
血漿	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	NA
赤血球	0.366	0.308	0.280	0.345	6.665	NA
胃内容物	29.21	50.66	56.47	105.9	3.330	NA
小腸内容物	60.64	130.2	127.7	252.1	80.63	NA
盲腸内容物	4.846	33.63	37.65	53.30	30.89	NA
大腸内容物	0.256	15.49	24.48	26.74	19.99	NA
残屍体	0.290	0.624	0.646	0.882	3.390	NA

データは4匹の平均値を示す。

NA: 該当せず。(組織中濃度または血漿中濃度が検出されなかったため算出せず。)

表8 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雌ラットに1、6、10または14日間投与後2時間、または14日間投与後168または336時間の組織中放射能濃度/血漿中放射能濃度比

組織	組織/血漿比					
	1日投与	6日投与	10日投与	14日投与		
	2時間	2時間	2時間	2時間	168時間	336時間
副腎	0.737	0.709	0.770	0.653	NA	NA
骨	0.108	0.128	0.165	0.145	NA	NA
骨髄	NA	NA	NA	0.245	NA	NA
脳	0.100	0.148	0.083	0.076	NA	NA
盲腸	57.41	82.69	106.4	92.94	15.82	NA
眼	0.213	0.135	0.220	0.147	NA	NA
脂肪	1.504	3.025	1.897	1.003	NA	NA
皮膚および被毛	0.331	0.312	0.538	0.322	1.630	NA
心臓	0.385	0.287	0.324	0.290	NA	NA
腎臓	2.212	2.157	1.896	1.913	3.714	NA
大腸	8.288	31.40	26.78	22.03	8.539	NA
肝臓	10.32	11.05	11.89	10.86	28.63	NA
肺	0.621	0.460	0.777	0.495	1.136	NA
顎下腺	0.248	0.240	0.356	0.277	NA	NA
筋肉 (大腿四頭筋)	0.306	0.256	0.279	0.334	NA	NA
卵巣	4.674	3.669	4.101	1.423	3.840	NA
膵臓	3.584	6.805	5.739	6.313	3.143	NA
下垂体	NA	0.387	NA	0.523	NA	NA
坐骨神経	NA	0.281	0.668	0.436	NA	NA
小腸	84.93	93.39	108.3	87.73	47.02	NA
脊髄	0.146	0.150	0.224	0.097	NA	NA
脾臓	1.003	2.120	2.490	1.109	2.069	NA
胃	28.18	22.07	31.95	34.66	9.309	NA
胸腺	0.264	0.213	0.281	0.204	NA	NA
甲状腺	1.963	0.547	1.996	0.823	NA	NA
子宮	7.907	7.893	7.888	6.643	5.465	NA
血液	0.638	0.645	0.645	0.671	1.849	NA
血漿	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	NA
赤血球	0.313	0.303	0.267	0.258	2.491	NA
胃内容物	86.39	43.12	54.12	66.72	8.578	NA
小腸内容物	238.8	319.4	298.4	133.9	97.43	NA
盲腸内容物	73.29	108.6	147.0	69.14	12.27	NA
大腸内容物	2.310	39.54	81.83	51.88	15.68	NA
残屍体	1.253	1.467	1.921	1.520	2.389	NA

データは4匹の平均値を示す。

NA: 該当せず。(組織中濃度または血漿中濃度が検出されなかったため算出せず。)

代謝:

(1) 糞尿中の代謝物

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、1日目投与後0~24時間および14日目投与後0~24時間の尿中代謝物の割合を表9に示す。

いずれの投与群においても尿中にマンデストロピンは認められなかった。

1日目投与後0~24時間の尿中主要代謝物は5-CA-S-2200-NHM、5-CA-MCBX-NDMおよび5-COOH-S-2200であり、それぞれ投与量の約1.7~1.9%、0.5~0.7%および0.5%を占めた。また、5-CA-2-HM-S-2200-NHM、5-CA-2-HM-S-2200および4-OH-S-2200-GlucAがそれぞれ投与量の0.2~1.0%含まれていた。

14日目投与後0~24時間の尿中主要代謝物は5-CA-S-2200-NHMおよび5-CA-MCBX-NDMであり、それぞれ投与量の0.2~0.4%および0.1~0.2%を占めた。また、2-COOH-S-2200、5-COOH-S-2200および4-OH-S-2200-GlucAがそれぞれ投与量の0.02~0.2%含まれていた。

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、1日目投与後0~24時間および14日目投与後0~24時間の糞中代謝物の割合を表10に示す。

いずれの投与群においても糞中にマンデストロピンが認められたが、1日目投与後0~24時間には投与量の約0.1%であったのに対し、14日目投与後0~24時間には投与量の約0.01%に減少した。

1日目投与後0~24時間の糞中主要代謝物は5-CA-S-2200-NHM、5-CA-2-HM-S-2200-NHM、5-COOH-S-2200、5-CA-2-HM-S-2200、5-CA-MCBX-NDMおよび4-OH-S-2200であり、それぞれ投与量の3.7~6.7%、0.5~2.4%、1.2~1.7%、1.2~1.5%、0.3~1.2%および0.7~0.9%を占めた。また、5-CA-2-HM-MCBXおよび5-CA-S-2200-NDMがそれぞれ投与量の0.1~0.7%含まれていた。

14日目投与後0~24時間の糞中主要代謝物は5-CA-S-2200-NHM、4-OH-S-2200、De-Xy-S-2200および5-COOH-S-2200であり、それぞれ投与量の1.3~1.5%、0.5~1.2%、0.2~1.1%および0.7~0.8%を占めた。また、5-CA-2-HM-S-2200-NHM、5-CA-2-HM-S-2200および5-CA-MCBX-NDMがそれぞれ投与量の0.1~0.5%含まれていた。

雌雄の糞中プロファイルにおいて、幾つかの代謝物の割合に定量的な差はあったが、定性的に顕著な差は認められなかった。また、認められた代謝物の種類に、反復投与による顕著な影響はなかった。

(2) 組織中の代謝物

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに1日目投与後2時間または14日間投与後2時間における血漿中代謝物濃度を表11に示

す。

血漿中代謝物として、5-COOH-S-2200、4-OH-S-2200-GlucA、COOH-S-2200 グルクロナイド、5-CA-S-2200-NHM、5-CA-S-2200-NDM および 2-COOH-S-2200 などが認められた。血漿中代謝物濃度は、1 日目投与後 2 時間と比較して、14 日目投与後 2 時間では、同等またはやや高い代謝物が多かった。

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 日目投与後 2 時間または 14 日目投与後 2 時間における肝臓中代謝物濃度を表 12 および表 13 に示す。

肝臓中代謝物として、5-CA-S-2200-NDM、5-COOH-S-2200、De-Xy-S-2200、5-CA-S-2200-NHM、5-CA-MCBX-NDM、5-CA-2-HM-S-2200、2-COOH-S-2200 および 5-CA-2-HM-S-2200-NHM などが認められた。

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 日目投与後 2 時間または 14 日目投与後 2 時間における腎臓中代謝物濃度を表 14 に示す。

腎臓中代謝物として、1 日目投与後 2 時間の雄では、5-CA-S-2200-NHM、5-COOH-S-2200、5-CA-2-HM-S-2200-NHM、De-Xy-S-2200、5-CA-2-HM-S-2200 および 2-COOH-S-2200 が認められ、14 日目投与後 2 時間にはさらに、5-CA-MCBX-NDM および 5-CA-S-2200-NDM も認められた。雌では、このうち、5-COOH-S-2200、5-CA-S-2200-NHM、5-CA-MCBX-NDM および De-Xy-S-2200 が認められたのみであった。

以上の結果から、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに単回または 14 日間反復投与後の尿、糞、血漿および肝臓の代謝物プロファイルに性差および単回投与と反復投与との差は認められなかったが、腎臓のプロファイルにおいて、代謝物の種類および数に、性差および単回投与と反復投与との差が認められた。

表9 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを5 mg/kg/日の用量で14日間反復経口投与した雌雄ラットの、1日目投与後0～24時間および14日目投与後0～24時間の尿中代謝物の割合

代謝物 ^c	尿中代謝物の割合 (投与量に対する%)			
	1日目投与後0～24時間 ^a		14日目投与後0～24時間 ^b	
	雄	雌	雄	雌
5-CA-2-HM-MCBX	0.105	ND	ND	0.016
5-CA-2-HM-S-2200-NHM	0.365	0.170	0.060	0.039
5-CA-2-HM-S-2200	0.328	0.299	0.063	0.060
5-CA-2-HM-MCBX (-2H)	0.115	ND	0.026	ND
4-OH-S-2200-GlucA	0.242	1.048	0.023	0.147
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 33.10～33.30 min)	ND	0.186	0.010	0.051
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 33.90 min)	ND	ND	0.010	ND
5-CA-MCBX-NDM	0.666	0.475	0.169	0.099
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 35.70～35.90 min)	0.090	0.412	0.011	0.059
2-COOH-S-2200	0.149	ND	0.047	0.102
5-CA-S-2200-NHM	1.713	1.946	0.209	0.403
5-CA-S-2200-NDM	0.141	0.167	0.043	0.044
5-COOH-S-2200	0.471	0.535	0.040	0.080
未同定 合計 ^d	2.499	2.503	0.640	0.260
成分数 (個)	19	19	25	16
最大成分	0.367	0.954	0.105	0.114
合計	6.881	7.741	1.352	1.361

a: 1日目の投与量に対する割合を示す。

b: 14日目までの総投与量に対する割合を示す。

c: LC-MSで確認。

d: 申請者が計算。

ND: 検出されず。

表 10 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与した雌雄ラットの、1 日目投与後 0~24 時間および 14 日目投与後 0~24 時間の糞中代謝物の割合

代謝物 ^c	糞中代謝物の割合 (投与量に対する%)			
	1 日目投与後 0~24 時間 ^a		14 日目投与後 0~24 時間 ^b	
	雄	雌	雄	雌
De-Xy-S-2200	0.310	0.446	0.157	1.053
5-CA-2-HM-MCBX	0.669	0.139	0.214	0.029
5-CA-2-HM-S-2200-NHM	2.403	0.521	0.458	0.114
5-CA-2-HM-S-2200	1.506	1.150	0.408	0.298
5-CA-MCBX-NDM	1.157	0.314	0.360	0.128
2-COOH-S-2200	0.189	0.046	0.106	0.040
4-OH-S-2200	0.695	0.896	0.547	1.164
5-CA-S-2200-NHM	6.747	3.693	1.471	1.266
5-CA-S-2200-NDM	0.497	0.275	0.179	0.154
5-COOH-S-2200	1.715	1.229	0.677	0.830
マンデストロピン	0.148	0.097	0.009	0.012
未同定 合計 ^d	1.607	0.789	1.196	0.442
成分数 (個)	7	8	19	13
最大成分	0.430	0.163	0.267	0.060
合計	17.64	9.594	5.784	5.529

a : 1 日目の投与量に対する割合を示す。

b : 14 日目までの総投与量に対する割合を示す。

c : LC-MS で確認。

d : 申請者が計算。

表 11 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 日目投与後 2 時間または 14 日間投与後 2 時間における血漿中代謝物濃度

代謝物 ^a	血漿中代謝物濃度 (μg マンデストロピン換算/g 組織)			
	1 日目投与後 2 時間		14 日目投与後 2 時間	
	雄	雌	雄	雌
Rt = 31.30 min	-	-	0.067	ND
4-OH-S-2200-GlucA	0.074	0.058	0.187	0.283
Rt = 33.90 min	0.088	ND	0.094	0.092
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 34.50 min)	ND	ND	0.063	ND
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 35.30~35.50 min)	0.020	ND	0.014	ND
2-COOH-S-2200	0.023	ND	0.109	ND
COOH-S-2200 Glucuronide (Rt = 36.90~37.10 min)	0.067	ND	ND	0.045
Rt = 37.50~38.10 min	0.138	<LOQ	0.147	0.068
Rt = 38.50~39.30 min	0.081	0.055	0.081	0.058
5-CA-S-2200-NHM	0.055	ND	0.049	0.081
5-CA-S-2200-NDM	0.028	ND	0.026	0.027
5-COOH-S-2200	0.116	0.065	0.131	0.194
未同定 合計 ^b	0.396	0.055	0.637	0.239
成分数 (個)	8	1	14	4
最大成分	0.138	-	0.147	0.092
濃度 (μg 換算/g 組織)	0.778	0.230	1.215	0.870

a : LC-MS で確認。未同定の各成分については、一部を示す。

b : 申請者が計算。

ND : 検出されず。

<LOQ : 定量限界未満。

表 12 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 日目投与後 2 時間における肝臓中代謝物濃度

代謝物 ^a	肝臓中代謝物濃度 (μg マンデストロピン換算/g 組織)			
	雄		雌	
	水相	有機相	水相	有機相
De-Xy-S-2200	0.442	0.535	0.333	ND
5-CA-2-HM-S-2200-NHM	0.088	ND	0.030	ND
Rt = 29.10~29.30 min	0.275	-	0.055	-
5-CA-2-HM-S-2200	0.177	ND	0.055	ND
5-CA-MCBX-NDM	0.251	ND	0.106	ND
Rt = 35.90~36.50 min	0.144	-	0.085	-
2-COOH-S-2200	0.131	ND	ND	ND
5-CA-S-2200-NHM	0.303	0.548	0.164	ND
5-CA-S-2200-NDM	1.393	2.710	0.651	1.016
5-COOH-S-2200	1.127	1.221	0.745	1.238
Rt = 48.10~48.50 min	0.484	-	ND	-
未同定 合計 ^b	1.102	ND	0.170	ND
成分数 (個)	8	-	3	-
最大成分	0.484	-	0.085	-
濃度 (μg 換算/g 組織)	5.014	5.014	2.254	2.254

a : LC-MS で確認。未同定の各成分については、一部を示す。

b : 申請者が計算。

ND : 検出されず。

表 13 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 14 日目投与後 2 時間における肝臓中代謝物濃度

代謝物 ^a	肝臓中代謝物濃度 (μg マンデストロピン換算/g 組織)			
	雄		雌	
	水相	有機相	水相	有機相
Rt = 16.70~16.90 min	0.360	-	0.213	-
De-Xy-S-2200	1.286	1.073	2.081	1.174
Rt = 20.90~21.10 min	0.067	-	0.136	-
Rt = 24.50 min	0.111	-	0.096	-
Rt = 25.30~25.70 min	0.096	-	0.118	-
Rt = 26.70~27.10 min	0.130	-	0.054	-
Rt = 27.90 min	0.138	-	0.079	-
5-CA-2-HM-S-2200-NHM	0.320	ND	0.176	ND
Rt = 29.10~29.30 min	0.678	-	0.158	-
5-CA-2-HM-S-2200	0.324	ND	0.328	ND
5-CA-MCBX-NDM	1.275	1.500	0.812	0.580
Rt = 35.90~36.50 min	0.273	-	0.153	-
2-COOH-S-2200	0.172	ND	0.032	ND
5-CA-S-2200-NHM	0.413	1.135	0.826	1.790
5-CA-S-2200-NDM	1.331	3.885	0.779	1.787
5-COOH-S-2200	1.686	2.114	1.644	2.912
Rt = 48.10~48.50 min	0.669	-	ND	-
未同定 合計 ^b	3.261	0.364	1.567	ND
成分数 (個)	23	1	17	-
最大成分	0.678	-	0.213	-
濃度 (μg 換算/g 組織)	10.070	10.070	8.244	8.244

a : LC-MS で確認。未同定の各成分については、一部を示す。

b : 申請者が計算。

ND : 検出されず。

表 14 [ベンジル-¹⁴C]マンデストロピンを 5 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 日目投与後 2 時間または 14 日間投与後 2 時間における腎臓中代謝物濃度

代謝物 ^a	腎臓中代謝物濃度 (μg マンデストロピン換算/g 組織)			
	1 日目投与後 2 時間		14 日目投与後 2 時間	
	雄	雌	雄	雌
De-Xy-S-2200	0.083	ND	0.111	<LOQ
Rt = 24.90 min	-	-	0.135	ND
Rt = 27.10 min	-	-	0.157	ND
Rt = 28.10 min	-	-	0.127	ND
5-CA-2-HM-S-2200-NHM	0.147	ND	0.136	ND
5-CA-2-HM-S-2200	0.085	ND	0.104	ND
Rt = 32.10~32.50 min	-	-	0.130	0.171
5-CA-MCBX-NDM	ND	ND	0.366	0.208
Rt = 34.70~35.50 min	0.105	ND	0.104	ND
2-COOH-S-2200	0.067	ND	0.073	ND
5-CA-S-2200-NHM	0.311	0.158	0.372	0.720
5-CA-S-2200-NDM	ND	ND	0.064	ND
5-COOH-S-2200	0.179	0.108	0.216	0.418
未同定 合計 ^b	0.229	<LOQ	0.929	0.171
成分数 (個)	3	-	8	1
最大成分	0.105	-	0.157	-
濃度 (μg 換算/g 組織)	1.101	0.403	2.371	1.597

a : LC-MS で確認。未同定の各成分については、一部を示す。

b : 申請者が計算。

ND : 検出されず。

<LOQ : 定量限界未満。

推定代謝経路：推定代謝経路を図 3 に示す。マンデストロピンのラットにおける主要代謝経路は、酸化とそれに続くグルクロン酸抱合、脱メチル化とそれに続く酸化、または酸化とそれに続く脱メチル化であった。

図3 マンデストロピンのラットにおける推定代謝経路

(4) マンデストロビンR体およびS体の *in vitro* 代謝試験

(資料 I-4)

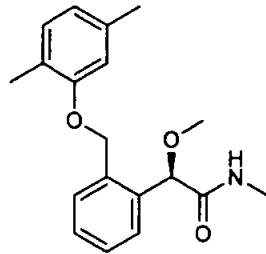
試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2013年

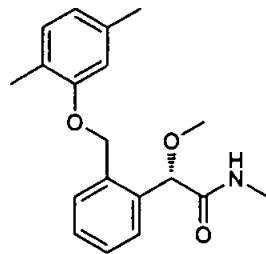
供試標識被験物質： [ベンジル-¹⁴C]マンデストロビンR体

[ベンジル-¹⁴C]マンデストロビンS体

構造式：



[ベンジル-¹⁴C]マンデストロビンR体



[ベンジル-¹⁴C]マンデストロビンS体

* : ¹⁴C 標識位置

化学名： R体：(R)-2-メキシ-N-メチル-2-[α-(2,5-キシロキシ)-o-トリル]アセトアミド

S体：(S)-2-メキシ-N-メチル-2-[α-(2,5-キシロキシ)-o-トリル]アセトアミド

	[ベンジル- ¹⁴ C] マンデストロビンR体	[ベンジル- ¹⁴ C] マンデストロビンS体
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

標識位置の設定理由：

試験方法：

ラット肝 S9 画分およびマウス肝 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験：100 匹のプールド雌雄ラット肝 S9 画分(終濃度 0.3mg protein/mL)および 1025 匹のプールド雄性マウス肝 S9 画分(終濃度 0.2mg protein/mL)を用いて、 β -NADPH(終濃度 3mM)と基質(マンデストロピン R 体および S 体、終濃度 1、2、10 μ M)の存在下、37°C、好氣的条件にてインキュベーションを実施した。インキュベーション時間は、ラット肝 S9 画分では 10 分(基質濃度 1 および 2 μ M) および 30 分(基質濃度 10 μ M)、マウス肝 S9 画分では 5 分(基質濃度 1 および 2 μ M) および 20 分(基質濃度 10 μ M) とした。アセトニトリル添加により反応を停止した後、HPLC 分析を実施し、生成物を定量した。

ラットシトクロム P450 (CYP) のバキュロウイルス発現系マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験：バキュロウイルス発現系マイクロソーム (CYP1A1、1A2、2A1、2A2、2B1、2C6、2C11、2C12、2C13、2D1、2D2、2E1、3A1 および 3A2) (終濃度 20 pmol P450/mL)、緩衝液 (100mM リン酸緩衝液、pH7.4)、 β -NADPH (終濃度 3mM)、 $MgCl_2$ (終濃度 3mM) および基質マンデストロピン R 体および S 体 (終濃度 1 μ M) の存在下、37°C、好氣的条件にて 30 分間インキュベーションした。アセトニトリル添加により反応を停止した後、HPLC 分析を実施し、生成物を定量した。

ラット肝 S9 画分に CYP 抗体および阻害剤を添加した *in vitro* 代謝試験：マンデストロピン R 体および S 体を基質(終濃度 1 μ M)として、ラット肝 S9 画分と CYP2C6 および CYP2C11 抗体(雄性ラットのみ)、あるいはコントロール血清(それぞれ、肝 S9 容量の 1/2 容量)を混和し、肝 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験と同様の方法にて試験を実施した。阻害剤を添加する際は、CYP2C の阻害剤 sulfaphenazole (終濃度 10、50、100 μ M) を肝 S9 画分の反応液に添加した。

結果：

ラット肝 S9 画分およびマウス肝 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝試験：雌雄ラット肝 S9 画分、雄性マウス肝 S9 画分いずれの *in vitro* 代謝試験においても、主要な代謝物は、マンデストロピン R 体および S 体共に、2- CH_2OH -S-2200、4-OH-S-2200 および 5- CH_2OH -S-2200 であった。

雄性ラットおよびマウスの肝 S9 画分の *in vitro* 代謝試験の結果を表 1 および表 2 に示す。代謝速度を算出した結果、ラット肝 S9 画分ではいずれの反応においても S 体に比べて R 体の代謝クリアランスが大きい傾向が認められ、5- CH_2OH -S-2200 生成反応のクリアランスは S 体の約 4 倍であった。また、R 体においては 5 位のメチル基の水酸化速度が大きく、S 体においては 4-OH-S-2200 の

生成比率が高かった。R体およびS体共に、生成する代謝物の種類に雌雄差は認められなかった。

マウス肝S9画分では、マンデストロビンR体およびS体のいずれにおいても、5位のメチル基の水酸化速度が大きく、ラット肝S9画分とは異なる傾向を示した。また、ラット肝S9画分と比較して、全体的に代謝クリアランスが大きく、代謝速度が速いことが明らかとなった。

表1 マンデストロビンR体およびS体のラット肝S9画分を用いた代謝試験結果

	代謝物	V_{max} (pmol/min/mg S9 protein)	K_m (μM)	クリアランス (V_{max}/K_m)
R体	2-CH ₂ OH-S-2200	103	2.83	36.4
	4-OH-S-2200	115	1.17	98.1
	5-CH ₂ OH-S-2200	370	2.18	169
S体	2-CH ₂ OH-S-2200	88.7	3.46	25.6
	4-OH-S-2200	155	2.30	67.6
	5-CH ₂ OH-S-2200	150	3.79	39.5

表2 マンデストロピンR体およびS体のマウス肝S9画分を用いた代謝試験結果

	代謝物	V_{max} (pmol/min/mg S9 protein)	K_m (μ M)	クリアランス (V_{max}/K_m)
R体	2-CH ₂ OH-S-2200	206	0.59	349
	4-OH-S-2200	303	1.68	180
	5-CH ₂ OH-S-2200	449	0.83	544
S体	2-CH ₂ OH-S-2200	142	1.29	110
	4-OH-S-2200	249	0.93	268
	5-CH ₂ OH-S-2200	637	1.03	620

ラットシトクロム P450 (CYP) のバキュロウイルス発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験: ラットシトクロム P450 (CYP) のバキュロウイルス発現系ミクロソームを用いて、マンデストロピン R 体および S 体の *in vitro* 代謝試験を実施した。R 体および S 体のいずれにおいても CYP1A1、2C6、2C11、2D2 および 3A2 に代謝活性が確認された。また、CYP2A1 では R 体のみで代謝活性が認められた。ラット肝臓における各分子種の発現量等を考慮すると、マンデストロピンの代謝に寄与している主要な CYP は CYP2C6 および CYP2C11 であると推測された。CYP2C6 および CYP2C11 について、代謝速度を表 3 および表 4 に示す。R 体においては、CYP2C6 および CYP2C11 のいずれも 5 位のメチル基の水酸化が主要であったが、S 体においては、CYP2C6 では 4-OH-S-2200 および 5-CH₂OH-S-2200 が、CYP2C11 では 2-CH₂OH-S-2200 および 5-CH₂OH-S-2200 の生成が主要であった。

表3 マンデストロビンR体およびS体のCYP2C6を用いた代謝試験結果

	代謝物	V_{max} (pmol/min /pmol P450)	K_m (μ M)	クリアランス (V_{max}/K_m)
R体	2-CH ₂ OH-S-2200	0.81	1.71	0.47
	4-OH-S-2200	2.18	0.77	2.81
	5-CH ₂ OH-S-2200	6.47	1.01	6.39
S体	2-CH ₂ OH-S-2200	1.17	1.39	0.84
	4-OH-S-2200	9.84	1.10	8.94
	5-CH ₂ OH-S-2200	6.16	1.21	5.10

表4 マンデストロビンR体およびS体のCYP2C11を用いた代謝試験結果

	代謝物	V_{max} (pmol/min /pmol P450)	K_m (μ M)	クリアランス (V_{max}/K_m)
R体	2-CH ₂ OH-S-2200	4.02	3.02	1.33
	4-OH-S-2200	0.33	0.75	0.44
	5-CH ₂ OH-S-2200	10.34	3.51	2.95
S体	2-CH ₂ OH-S-2200	5.65	2.15	2.63
	4-OH-S-2200	0.87	1.03	0.85
	5-CH ₂ OH-S-2200	4.81	2.12	2.27

ラット肝 S9 画分に CYP 抗体および阻害剤を添加した *in vitro* 代謝試験：マンデストロビン R 体を基質として、ラット肝 S9 画分に CYP2C6 および CYP2C11 (雄性ラットのみ) の抗体を加えて *in vitro* 代謝試験を行った。結果を表 5 に示す。雄性ラット肝 S9 画分において、CYP2C6 および CYP2C11 抗体を添加した場合は、コントロール血清を添加した場合と比較して 5-CH₂OH-S-2200 の生成が 50% 以上阻害された。同様に 2-CH₂OH-S-2200 および 4-OH-S-2200 についても、10~70% 程度の阻害が確認された。

マンデストロビン S 体を基質として同様に *in vitro* 代謝試験を行った結果を表 6 に示す。CYP2C6 および CYP2C11 抗体を添加した場合は、4-OH-S-2200 の生成が 30% 以上阻害された。同様に 2-CH₂OH-S-2200 および 5-CH₂OH-S-2200 についても、10~50% 程度の阻害が確認された (ただし、雄性ラット肝 S9 画分では 2-CH₂OH-S-2200 の生成阻害は認められなかった)。

また、マンデストロビン R 体を基質としてラット肝 S9 画分に阻害剤 (sulfaphenazole) を添加した際の結果を表 7 および表 8 に示す。表 8 に示すように、阻害剤濃度 100 μM では代謝物生成の抑制が認められた。

マンデストロビン S 体を基質としてラット肝 S9 画分に阻害剤を添加した際の結果を表 9 に示す。阻害剤濃度 10 および 50 μM でも代謝物生成の抑制が認められた。

以上の結果から、CYP2C6 によって主に 4-OH-S-2200 および 5-CH₂OH-S-2200 が、CYP2C11 によって 2-CH₂OH-S-2200、4-OH-S-2200 および 5-CH₂OH-S-2200 が生成すると考えられた。CYP2C6 に関しては、雌雄ラット肝 S9 画分共に同様の傾向が認められた。また、代謝に関与する主要な CYP 分子種に異性体による顕著な違いはなく、同一の部位が酸化された代謝物が生成することが明らかとなった。

表5 マンデストロビンR体のラット肝S9画分におけるCYP2C6/CYP2C11抗体による代謝物生成阻害

	抗体	代謝物生成量 [pmol/min/mg S9 protein]		
		2-CH ₂ OH-S-2200	4-OH-S-2200	5-CH ₂ OH-S-2200
雄	コントロール血清	43.8	64.8	166.3
	CYP2C6 抗体	26.0	36.6	72.8
	CYP2C11 抗体	15.5	60.7	47.2
雌	コントロール血清	28.9	64.2	147.1
	CYP2C6 抗体	24.1	40.7	71.2
	CYP2C11 抗体	-	-	-

表6 マンデストロビンS体のラット肝S9画分におけるCYP2C6/CYP2C11抗体による代謝物生成阻害

	抗体	代謝物生成量 [pmol/min/mg S9 protein]		
		2-CH ₂ OH-S-2200	4-OH-S-2200	5-CH ₂ OH-S-2200
雄	コントロール血清	25.1	80.4	48.7
	CYP2C6 抗体	28.0	51.1	42.5
	CYP2C11 抗体	19.5	55.4	22.2
雌	コントロール血清	5.7	63.3	39.8
	CYP2C6 抗体	3.5	39.0	21.5
	CYP2C11 抗体	-	-	-

表7 マンデストロビンR体のラット肝S9画分におけるCYP2C阻害剤による代謝物生成阻害

	阻害剤濃度	代謝物生成量 [pmol/min/mg S9 protein]		
		2-CH ₂ OH-S-2200	4-OH-S-2200	5-CH ₂ OH-S-2200
雄	0 μM	25.6	52.3	101.9
	10 μM	26.4	58.1	110.9
	50 μM	23.9	48.1	99.2
雌	0 μM	18.2	48.2	80.4
	10 μM	21.5	46.0	85.0
	50 μM	18.0	44.7	73.3

表8 マンデストロビンR体のラット肝S9画分におけるCYP2C阻害剤による代謝物生成阻害(2回目)

	阻害剤濃度	代謝物生成量 [pmol/min/mg S9 protein]		
		2-CH ₂ OH-S-2200	4-OH-S-2200	5-CH ₂ OH-S-2200
雄	0 μM	21.1	42.7	86.1
	100 μM	19.2	36.8	71.9
雌	0 μM	15.7	35.6	66.0
	100 μM	16.7	32.0	52.4

表9 マンデストロピンS体のラット肝S9画分におけるCYP2C阻害剤による代謝物生成阻害

	阻害剤濃度	代謝物生成量 [pmol/min/mg S9 protein]		
		2-CH ₂ OH-S-2200	4-OH-S-2200	5-CH ₂ OH-S-2200
雄	0 μM	26.0	66.1	43.8
	10 μM	21.8	42.8	25.4
	50 μM	20.6	40.8	25.1
雌	0 μM	7.6	57.3	34.8
	10 μM	2.4	40.7	16.0
	50 μM	4.8	29.6	14.8

2. 植物代謝に関する試験

(1) マンデストロピンのレタスにおける代謝試験

(資料 II-1)

試験機関：Springborn Smithers Laboratories

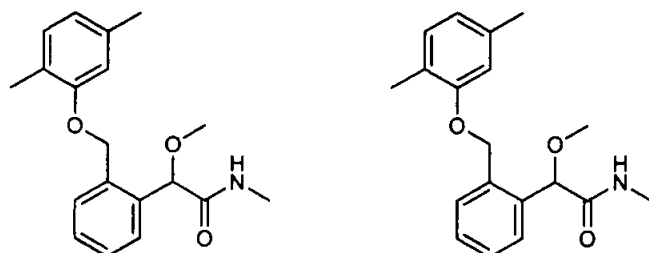
[GLP 対応]

報告書作成年：2010 年

供試標識化合物： [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン

[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

構造式：



[フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

*：標識位置

化学名： (RS)-2-メキシ-*N*-メチル-2-[α -(2,5-キシリルオキシ)-*o*-トリル]アセアミド

	[フェノキシ- ¹⁴ C] 標識体	[ベンジル- ¹⁴ C] 標識体
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物：レタス（品種：Buttercrunch）（温室栽培）

方法：

処理液の調製： [¹⁴C] マンデストロピンおよび非標識マンデストロピンをアセトニトリルに溶解後、水および空製剤 (SC) を加えて混合し、25%SC 製剤を調製した。

処理方法： 播種 41 日後のレタスに処理液を 800 g ai/ha の割合^{a)}で 10 日間隔で 2 回、

手動ポンプ式散布機を用いてレタスの上部から散布した。

採取時期： 第1回目処理の5日後(中間採取)および第2回目処理の5日後(最終収穫)にそれぞれレタス葉を採取した。

分析方法： レタス試料の分析方法のスキームを図1に示した。

マンデストロピンおよびその代謝物は、標品とのHPLCおよびTLCコクロマトグラフィーにより同定・定量した。抱合体の同定は、該当ピークを単離後、セルラーゼおよびβ-グルコシダーゼによる加水分解(37℃で最大7日間インキュベート)に供し、得られたアグリコンと標品とのHPLCコクロマトグラフィーにより行った。

最終収穫時の抽出残渣については、ドリセラゼ(37℃で一晩)、0.1M塩酸(40℃で一晩)および0.1M水酸化ナトリウム(40℃で一晩)を用いて段階的に加水分解を実施した。

また、一部の試料については、キラルHPLC分析を行うことにより、マンデストロピンのR:S異性体比を測定した。

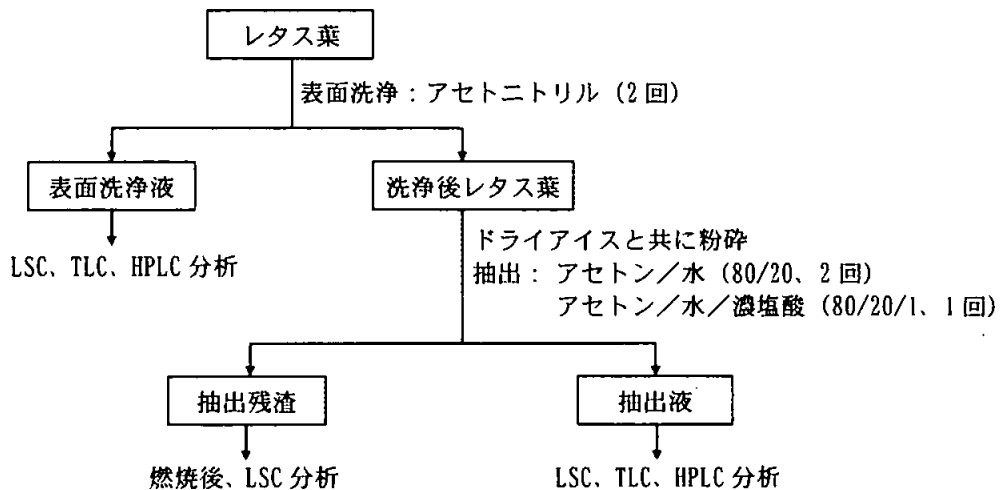


図1 レタス葉の抽出および分析スキーム

試験結果：

¹⁴C 分布：レタス葉における¹⁴C分布を表1および2に示した。

レタス葉における総残留放射能 (TRR) 濃度は、中間採取および最終収穫でそれぞれ27.9~35.1および41.6~43.1 ppmであった。回収された放射能の78.5~88.4%TRRが表面洗浄液中に存在し、抽出液および抽出残渣中の放射能はそれぞ

れ 11.4~20.4%および 0.2~1.1%TRR であった。

最終収穫の抽出残渣については、ドリセラーゼ、0.1 M 塩酸および 0.1 M 水酸化ナトリウムによる段階的な加水分解を行った結果、最終的な残渣（結合性残渣）は 0.3~0.6%TRR (0.118~0.261 ppm) となった。

表 1: レタス葉における ¹⁴C 分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	中間採取		最終収穫	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR
表面洗浄液	31.030	88.38	35.317	81.87
抽出液	4.008	11.42	7.327	16.99
7エトン/水抽出液	3.913	11.14	7.092	16.44
7エトン/水/酸抽出液	0.095	0.27	0.235	0.54
抽出残渣	0.073	0.21	0.494	1.14
合計	35.110 ^c	100.00 ^d	43.137 ^c	100.00

a: マンデストロピン換算値

b: レタス葉中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

d: 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

表 2: レタス葉における ¹⁴C 分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	中間採取		最終収穫	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR
表面洗浄液	24.536	87.82	32.643	78.49
抽出液	3.342	11.96	8.501	20.44
7エトン/水抽出液	3.267	11.69	8.158	19.61
7エトン/水/酸抽出液	0.075	0.27	0.343	0.83
抽出残渣	0.061	0.22	0.443	1.07
合計	27.940 ^c	100.00	41.587	100.00

a: マンデストロピン換算値

b: レタス葉中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

代謝: レタス葉における代謝物の分析結果を表 3~6 に示した。

レタス葉における主要残留物は未変化のマンデストロピンであり、89.0~93.9%TRR (25.948~39.278 ppm) 検出された。代謝物として 2-CH₂OH-S-2200 抱

合体、4-OH-S-2200 抱合体、5-CH₂OH-S-2200 抱合体、MCBX および De-Xy-S-2200 が検出されたが、いずれも 2.8%TRR 以下であった。

また、キラル HPLC 分析の結果、試料中のマンデストロピンの R:S 異性体比は約 50:50 であり、アセトアミド基の 2 位におけるエピマー化は認められなかった。

表 3 : レタス葉における代謝物分布 (中間採取、[フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水 /酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	31.030	88.38	3.913 ^d	11.15	0.095	0.27	35.038	99.79 ^c
マンデストロピン	31.030	88.38	1.890	5.38	0.050	0.14	32.970	93.90
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.145	0.41	0.003	0.01	0.148	0.42
4-OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.758	2.16	0.015	0.04	0.773	2.20
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.321	0.91	0.006	0.02	0.327	0.93
MCBX	ND	ND	0.234	0.67	0.005	0.02	0.239	0.68
その他	ND	ND	0.564	1.61	0.016	0.05	0.580 ^c	1.65 ^{c,e}
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.073	0.21
合計	31.030	88.38	3.913	11.15	0.095	0.27	35.110 ^d	100.00

ND : 検出せず

a : マンデストロピン換算値

b : レタス葉中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c : 5 成分以上から成り、最大成分は 1.01%TRR (0.356 ppm)

d : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

e : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

表4：レタス葉における代謝物分布（中間採取、[ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区）

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	24.536	87.82	3.267	11.69	0.075	0.27	27.878 ^d	99.78
マンデストロピン	24.303	86.98	1.608	5.75	0.037	0.13	25.948	92.87 ^e
De-Xy-S-2200	0.061	0.22	0.136	0.49	ND	ND	0.197	0.71
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.099	0.36	0.002	0.01	0.102	0.36 ^e
4-OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.427	1.53	0.010	0.04	0.437	1.56 ^e
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.194	0.69	0.004	0.01	0.198	0.71 ^e
MCBX	ND	ND	0.153	0.55	0.005	0.02	0.158	0.57
その他	0.172	0.61	0.650	2.32	0.017	0.06	0.839 ^c	3.01 ^{c,e}
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.061	0.22
合計	24.536	87.82	3.267	11.69	0.075	0.27	27.940 ^d	100.00

ND：検出せず

a：マンデストロピン換算値

b：レタス葉中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）

c：5成分以上から成り、最大成分は0.90%TRR（0.252 ppm）

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

e：小数第3位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

表5：レタス葉における代謝物分布（最終収穫、[フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区）

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	35.317	81.87	7.092	16.44	0.235	0.54	42.644	98.86 ^e
マンデストロピン	35.317	81.87	3.874	8.98	0.087	0.20	39.278	91.05
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.220	0.51	0.006	0.01	0.226	0.52
4-OH-S-2200 抱合体	ND	ND	1.148	2.66	0.029	0.07	1.177	2.73
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.530	1.23	0.015	0.03	0.545	1.26
MCBX	ND	ND	0.246	0.57	0.009	0.02	0.255	0.59
その他	ND	ND	1.074	2.49	0.089	0.20	1.163 ^c	2.70 ^{c,e}
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.494	1.14
合計	35.317	81.87	7.092	16.44	0.235	0.54	43.137 ^d	100.00

ND：検出せず

a：マンデストロピン換算値

b：レタス葉中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）

c：4成分以上から成り、最大成分は1.71%TRR（0.736 ppm）

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

e：小数第3位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

表 6 : レタス葉における代謝物分布 (最終収穫, [ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出成分	32.643	78.49	8.157 ^d	19.62	0.343 ^d	0.83	41.144 ^d	98.93 ^e
マンデストロピン	32.643	78.49	4.214	10.13	0.139	0.33	36.996	88.96 ^e
De-Xy-S-2200	ND	ND	0.249	0.60	0.020	0.05	0.268	0.65
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.259	0.62	0.010	0.02	0.268	0.65 ^e
4-OH-S-2200 抱合体	ND	ND	1.110	2.67	0.042	0.10	1.152	2.77
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.600	1.44	0.026	0.06	0.626	1.50
MCBX	ND	ND	0.389	0.94	0.015	0.04	0.404	0.97 ^e
その他	ND	ND	1.337	3.21	0.092	0.22	1.429 ^c	3.44 ^{c,e}
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.443	1.07
合計	32.643	78.49	8.157	19.62	0.343	0.83	41.587	100.00

ND : 検出せず

a : マンデストロピン換算値

b : レタス葉中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c : 4 成分以上から成り、最大成分は 0.75%TRR (0.312 ppm)

d : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

e : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の合計が一致しない

推定代謝経路 : マンデストロピンのレタスにおける推定代謝経路を図 2 に示した。

マンデストロピンのレタスにおける代謝経路は、ジメチルフェノキシ基の 4 位の水酸化もしくはジメチルフェノキシ基に結合した 2 つのメチル基の水酸化とこれらに続く糖抱合体化、メトキシ基の脱メチル化およびベンジルエーテル結合の開裂であり、一部は植物構成成分に取込まれると考えられた。

図 2 : マンデストロピンのレタスにおける推定代謝経路

(2) マンデストロピンの小麦における代謝試験

(資料Ⅱ-2)

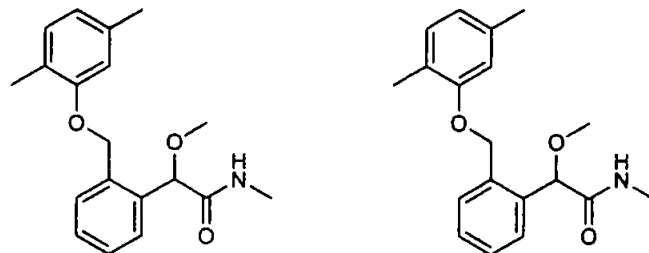
試験機関：Springborn Smithers Laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年：2010年

供試標識化合物： [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン
[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

構造式：



[フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

*：標識位置

化学名： (RS)-2-メトキシ-N-メチル-2-[α-(2,5-キシロキシ)-o-トリル]アセトアミド

	[フェノキシ- ¹⁴ C] 標識体	[ベンジル- ¹⁴ C] 標識体
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物：小麦（品種：Promontory）（温室栽培）

方法：

処理液の調製： [¹⁴C] マンデストロピンおよび非標識マンデストロピンをアセトニトリルに溶解後、水および空製剤（SC）を加えて混合し、25%SC 製剤を調製した。

処理方法：播種 37 日後の小麦に 300 g ai/ha の処理量^{a)} で、手動ポンプ式散布機を用いて処理液を小麦植物の上部から散布した。

採取時期: 処理 7 日後および 14 日後に、それぞれ未成熟の青刈りおよび干し草を採取し、
処理 104 日後の成熟時に麦わらおよび穀粒を収穫した。

分析方法: 小麦試料の分析方法のスキームを図 1 に示した。

マンデストロピンおよびその代謝物は、標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。抱合体の同定は、該当ピークを単離後、セルラーゼおよび β -グルコシダーゼによる加水分解 (39°C で最大 7 日間インキュベート) に供し、得られたアグリコンと標品との HPLC コクロマトグラフィーにより行った。

干し草試料の抽出残渣については、ドリセラーゼ (37°C で一晩)、0.1 M 塩酸 (40°C で一晩) および 0.1 M 水酸化ナトリウム (40°C で一晩) による段階的加水分解を実施した。麦わら試料の抽出残渣については、0.1 M 塩酸 (40°C で一晩)、6 M 塩酸 (80°C で 4 時間)、1 M 水酸化ナトリウム (40°C で一晩) および 6 M 水酸化ナトリウム (80°C で一晩) による段階的加水分解を実施した。

また、一部の試料については、キラル HPLC 分析を行うことにより、マンデストロピンの R:S 異性体比を測定した。

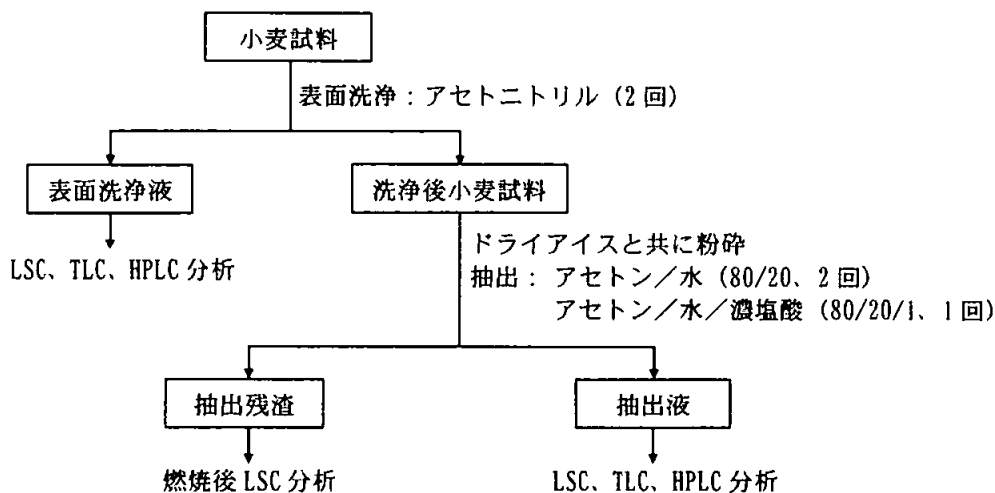


図 1 小麦試料 (青刈り、干し草、麦わら、穀粒) の抽出および分析スキーム
(注: 穀粒については、表面洗浄を実施しなかった。)

試験結果:

^{14}C 分布: 小麦各試料における ^{14}C 分布を表 1 および 2 に示した。

小麦における総残留放射能 (TRR) 濃度は、青刈り、干し草、麦わらおよび穀粒でそれぞれ 10.4~11.1 ppm、6.2~9.0 ppm、1.9~2.5 ppm および 0.012~0.089 ppm であった。表面洗浄液中の放射能は、青刈り、干し草および麦わらにおいて

それぞれ 33.9~41.0%TRR、19.1~23.3%TRR および 2.8~3.7%TRR であった。抽出液中の放射能は、いずれの試料においても 53.2~72.7%TRR であった。抽出残渣中の放射能は、青刈り、干し草、麦わらおよび穀粒でそれぞれ 5.5~5.8%TRR、8.1~10.9%TRR、32.5~37.6%TRR および 27.3~33.0%TRR であり、干し草および麦わらの抽出残渣は更に酵素、酸および塩基を用いて段階的に加水分解した(表3および4)。

表1 小麦における ¹⁴C 分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	青刈り		干し草		麦わら		穀粒	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
表面洗浄液	4.570	41.01	1.450	23.34	0.069	3.72	NA	NA
抽出液	5.931	53.23	4.086	65.76	1.087	58.71	0.008	66.97
アセトン/水抽出液	5.576	50.04	3.793	61.05	0.757	40.87	0.006	54.40
アセトン/水/酸抽出液	0.355	3.19	0.293	4.71	0.330	17.84	0.002	12.57
抽出残渣	0.642	5.76	0.677	10.90	0.696	37.58	0.004	33.03
合計	11.142 ^c	100.00 ^d	6.213	100.00	1.851 ^c	100.00 ^d	0.012	100.00

NA: 分析せず(穀粒は表面洗浄実施せず)

a: マンデストロピン換算値

b: 小麦各試料中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

d: 小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表2 小麦における ¹⁴C 分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	青刈り		干し草		麦わら		穀粒	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
表面洗浄液	3.542	33.94	1.729	19.13	0.070	2.79	NA	NA
抽出液	6.325	60.61	6.576	72.75	1.612	64.70	0.065	72.67
アセトン/水抽出液	6.110	58.55	6.381	70.60	1.163	46.67	0.048	53.29
アセトン/水/酸抽出液	0.215	2.06	0.195	2.15	0.449	18.03	0.017	19.38
抽出残渣	0.569	5.45	0.734	8.12	0.810	32.51	0.024	27.33
合計	10.435 ^c	100.00	9.040 ^c	100.00	2.493 ^c	100.00	0.089	100.00

NA: 分析せず(穀粒は表面洗浄実施せず)

a: マンデストロピン換算値

b: 小麦各試料中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表3 干し草抽出残渣の段階的加水分解の結果

	[フェノキシ- ¹⁴ C] 標識体			[ベンジル- ¹⁴ C] 標識体		
	%PES ^a	ppm ^b	%TRR ^c	%PES	ppm	%TRR
酵素加水分解	13.45	0.091	1.47	43.38	0.319	3.52
酸加水分解	13.25	0.090	1.44	18.13	0.133	1.47
塩基加水分解	53.46	0.362	5.83	28.36	0.208	2.30
結合性残渣	12.01	0.081	1.31	5.08	0.037	0.41
合計	92.18	0.624	10.05	94.96	0.697	7.72

a: 干し草抽出残渣 (PES) に対する割合 (%)

b: マンデストロピン換算値

c: 干し草中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

表4 麦わら抽出残渣の段階的加水分解の結果

	[フェノキシ- ¹⁴ C] 標識体			[ベンジル- ¹⁴ C] 標識体		
	%PES ^a	ppm ^b	%TRR ^c	%PES	ppm	%TRR
弱酸加水分解	15.73	0.109	5.91	15.21	0.123	4.94
強酸加水分解	13.49	0.094	5.07	9.58	0.078	3.11
弱塩基加水分解	30.12	0.210	11.32	31.66	0.257	10.29
強塩基加水分解	43.68	0.304	16.41	34.70	0.281	11.28
結合性残渣	2.94	0.020	1.11	1.76	0.014	0.57
合計	105.97	0.737	39.82	92.91	0.753	30.21

a: 麦わら抽出残渣 (PES) に対する割合 (%)

b: マンデストロピン換算値

c: 麦わら中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

代謝: 小麦各試料における代謝物の分析結果を表5~12に示した。

青刈りにおける主要残留物は未変化のマンデストロピン (51.0~59.9%TRR、5.684~6.254 ppm) であった。主要代謝物として 2-CH₂OH-S-2200 抱合体 (5.5~10.6%TRR、0.570~1.177 ppm) が検出され、微量代謝物として 4-OH-S-2200 抱合体、5-CH₂OH-S-2200 抱合体、2-CH₂OH-S-2200、MCBX、De-Xy-S-2200 が生成したが、いずれも 6.2%TRR 以下であった。

干し草における主要残留物は未変化のマンデストロピン (22.7~26.2%TRR、1.630~2.051 ppm) であった。主要代謝物は 2-CH₂OH-S-2200 抱合体 (11.2~12.6%TRR、0.697~1.137 ppm) および 4-OH-S-2200 抱合体 (5.5~13.1%TRR、0.496~0.813 ppm) であり、その他の微量代謝物として、2-CH₂OH-S-2200、5-CH₂OH-S-2200 抱合体、MCBX および De-Xy-S-2200 が検出されたが、いずれも 6.9%TRR 以下であった。

麦わらでは未変化のマンデストロピンは 1.4~2.0%TRR (0.026~0.050 ppm) であった。主要代謝物は、De-Xy-S-2200 (11.8%TRR, 0.294 ppm) であった。微量代謝物として 2-CH₂OH-S-2200、MCBX、5-CH₂OH-S-2200、5-COOH-S-2200 および 4-OH-S-2200 が検出されたが、いずれも 9.5%TRR 以下であった。

穀粒においては、マンデストロピンは検出されず、主要代謝物として De-Xy-S-2200 (60.6%TRR, 0.054 ppm) が検出され、その他の代謝物として 2-CH₂OH-S-2200 が (3.1%TRR, 0.003 ppm) 生成した。¹⁴C の多くは植物構成成分に取り込まれた。

また、キラル HPLC 分析の結果、試料中のマンデストロピンの R:S 異性体比は被験物質同様約 50:50 であり、アセトアミド基の 2 位におけるエピマー化は認められなかった。

表 5 青刈りにおける代謝物分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	4.570 ^d	41.01 ^e	5.576	50.04	0.355 ^d	3.19 ^e	10.501	94.24
マンデストロピン	4.289	38.49	1.330	11.94	0.065	0.58	5.684	51.01
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	0.035	0.32	1.079	9.68	0.063	0.57	1.177	10.57
4-OH-S-2200 抱合体	0.011	0.10	0.344	3.08	0.020	0.18	0.375	3.36
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.661	5.93	0.024	0.22	0.686 ^d	6.15 ^e
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX	0.033	0.30	ND	ND	ND	ND	0.033	0.30
その他	0.200	1.79	2.162	19.41	0.184	1.65	2.546 ^e	22.85 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.642	5.76
合計	4.570	41.01	5.576	50.04	0.355	3.19	11.142 ^d	100.00

ND: 検出せず

a: マンデストロピン換算値

b: 青刈り中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 7 成分以上から成り、最大成分は 3.00%TRR (0.335 ppm)

d: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表 6 青刈りにおける代謝物分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	3.542 ^d	33.94	6.110 ^d	58.55 ^e	0.215 ^d	2.06 ^e	9.867	94.55
マンデストロピン	3.163	30.31	3.062	29.34	0.029	0.28	6.254	59.93
De-Xy-S-2200	0.072	0.69	0.249	2.38	0.013	0.13	0.334	3.20
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	0.024	0.23	0.524	5.02	0.023	0.22	0.570 ^d	5.47
4-OH-S-2200 抱合体	0.023	0.22	0.517	4.95	0.023	0.22	0.563	5.40 ^e
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	0.021	0.20	0.407	3.90	0.017	0.16	0.445	4.26
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	0.022	0.22	0.022	0.22
MCBX	0.028	0.27	0.269	2.58	ND	ND	0.297	2.84 ^e
その他	0.210	2.02	1.084	10.37	0.087	0.84	1.381 ^e	13.23 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.569	5.45
合計	3.542	33.94	6.110	58.55	0.215	2.06	10.435 ^d	100.00

ND: 検出せず

a: マンデストロピン換算値

b: 青刈り中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 5成分以上から成り、最大成分は 3.32%TRR (0.346 ppm)

d: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表 7 干し草における代謝物分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	1.450 ^d	23.34	3.793 ^d	61.05	0.293 ^d	4.71	5.536	89.10
マンデストロピン	1.302	20.96	0.303	4.88	0.025	0.40	1.630	26.24
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	0.009	0.15	0.659	10.60	0.029	0.47	0.697	11.22
4-OH-S-2200 抱合体	0.011	0.17	0.769	12.37	0.034	0.55	0.813 ^d	13.09
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.376	6.04	0.014	0.22	0.389 ^d	6.26
2-CH ₂ OH-S-2200	0.018	0.29	0.036	0.58	0.026	0.42	0.081 ^d	1.30 ^e
MCBX	0.031	0.51	0.015	0.24	ND	ND	0.046	0.74 ^e
その他	0.078	1.26	1.636	26.34	0.164	2.65	1.878 ^e	30.25 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.677	10.90
合計	1.450	23.34	3.793	61.05	0.293	4.71	6.213	100.00

ND: 検出せず

a: マンデストロピン換算値

b: 干し草中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 8成分以上から成り、最大成分は 1.97%TRR (0.123 ppm)

d: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表8 干し草における代謝物分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	1.729 ^d	19.13 ^e	6.381 ^d	70.59 ^e	0.195 ^d	2.15 ^e	8.305	91.88 ^e
マンデストロピン	1.478	16.35	0.550	6.09	0.023	0.25	2.051	22.68 ^e
De-Xy-S-2200	ND	ND	0.133	1.48	0.004	0.04	0.137	1.52
2-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	0.028	0.31	1.089	12.05	0.019	0.22	1.137 ^d	12.58
4-OH-S-2200 抱合体	0.012	0.14	0.475	5.26	0.009	0.09	0.496	5.49
5-CH ₂ OH-S-2200 抱合体	ND	ND	0.603	6.67	0.016	0.18	0.619	6.85
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	0.062	0.68	0.021	0.23	0.083	0.91
MCBX	0.022	0.24	0.053	0.59	ND	ND	0.075	0.83
その他	0.188	2.10	3.415	37.79	0.104	1.15	3.707 ^e	41.04 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.734	8.12
合計	1.729	19.13	6.381	70.59	0.195	2.15	9.040 ^d	100.00

ND: 検出せず

a: マンデストロピン換算値

b: 干し草中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 8成分以上から成り、最大成分は4.43%TRR (0.400 ppm)

d: 小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表9 麦わらにおける代謝物分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	0.069	3.72 ^e	0.757	40.87 ^e	0.330	17.84 ^e	1.156	62.42 ^e
マンデストロピン	0.005	0.27	0.012	0.67	0.008	0.44	0.026 ^d	1.38
2-CH ₂ OH-S-2200	0.020	1.07	0.115	6.22	0.041	2.21	0.176	9.50
MCBX	0.001	0.06	0.008	0.42	0.003	0.18	0.012	0.66
5-CH ₂ OH-S-2200	0.007	0.37	0.024	1.30	0.008	0.42	0.039	2.08 ^e
5-COOH-S-2200	0.004	0.22	0.040	2.16	0.009	0.49	0.053	2.87
4-OH-S-2200	ND	ND	0.018	0.98	0.005	0.25	0.023	1.23
その他	0.032	1.72	0.540	29.11	0.256	13.84	0.828 ^e	44.67 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.696	37.58
合計	0.069	3.72	0.757	40.87	0.330	17.84	1.851 ^d	100.00

ND: 検出せず

a: マンデストロピン換算値

b: 麦わら中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 8成分以上から成り、最大成分は7.28%TRR (0.135 ppm)

d: 小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表 10 麦わらにおける代謝物分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	0.070	2.79	1.163 ^d	46.67	0.449	18.03	1.682	67.49
マンデストロピン	0.012	0.49	0.024	0.97	0.013	0.53	0.050 ^d	1.99
De-Xy-S-2200	0.012	0.48	0.200	8.04	0.081	3.26	0.294 ^d	11.78
2-CH ₂ OH-S-2200	0.009	0.37	0.111	4.46	0.040	1.59	0.160	6.42
MCBX	0.001	0.04	0.007	0.28	0.002	0.10	0.010	0.42
5-CH ₂ OH-S-2200	0.004	0.17	0.053	2.12	0.016	0.64	0.073	2.93
5-COOH-S-2200	0.005	0.20	0.092	3.70	0.017	0.68	0.114	4.58
4-OH-S-2200	0.003	0.11	0.031	1.24	0.004	0.15	0.038	1.51 ^e
その他	0.024	0.93	0.644	25.86	0.276	11.08	0.944 ^e	37.87 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.810	32.51
合計	0.070	2.79	1.163	46.67	0.449	18.03	2.493 ^d	100.00

a: マンデストロピン換算値

b: 麦わら中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c: 7 成分以上から成り、最大成分は 3.95%TRR (0.098 ppm)

d: 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

e: 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない

表 11 穀粒における代謝物分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	抽出液 ^a		合計	
	ppm ^b	%TRR ^c	ppm	%TRR
抽出画分	0.008	66.97	0.008	66.97
マンデストロピン	ND	ND	ND	ND
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND
その他	0.008	66.97	0.008 ^d	66.97 ^d
抽出残渣	-	-	0.004	33.03
合計	0.008	66.97	0.012	100.00

ND: 検出せず

a: アセトン/水抽出液およびアセトン/水/酸抽出液を混合して分析

b: マンデストロピン換算値

c: 穀粒中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

d: 3 成分以上から成り、最大成分は 25.61%TRR (0.003 ppm)

表 12 穀粒における代謝物分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体処理区)

	アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	0.048	53.29	0.017	19.38	0.065	72.67
マンデストロピン	ND	ND	ND	ND	ND	ND
De-Xy-S-2200	0.042	46.92	0.012	13.63	0.054	60.55
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	0.003	3.12	0.003	3.12
その他	0.006	6.37	0.002	2.63	0.008 ^c	9.00 ^c
抽出残渣	-	-	-	-	0.024	27.33
合計	0.048	53.29	0.017	19.38	0.089	100.00

ND : 検出せず

a : マンデストロピン換算値

b : 穀粒中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

c : 5 成分以上から成り、最大成分は 4.21%TRR (0.004 ppm)

推定代謝経路：マンデストロピンの小麦における主要代謝経路を図2に示した。

マンデストロピンの小麦における代謝経路は、ジメチルフェノキシ基の4位の水酸化もしくはジメチルフェノキシ基に結合した2つのメチル基の水酸化とこれらに続く糖抱合化、エーテル結合の開裂、メトキシ基の脱メチル化およびジメチルフェノキシ基の5位のメチル基酸化によるカルボキシ体(5-COOH-S-2200)の生成であり、一部は植物構成成分に取り込まれると考えられた。

図2 マンデストロピンの小麦における推定代謝経路

(3) マンデストロピンのなたねにおける代謝試験

(資料 II-3)

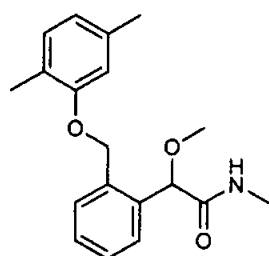
試験機関: Smithers Viscient

[GLP 対応]

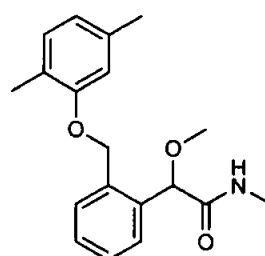
報告書作成年: 2011年

供試標識化合物: [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン
[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

構造式:



[フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン



[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン

*: 標識位置

化学名: (RS)-2-メキシ-N-メチル-2-(α-(2,5-キシリロキシ)-オトリル)アセトアミド

	[フェノキシ- ¹⁴ C] 標識体	[ベンジル- ¹⁴ C] 標識体
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物: なたね (品種: Phoenix Liberty Link) (屋外栽培)

方法:

処理液の調製: [¹⁴C] マンデストロピンおよび非標識マンデストロピンをアセトニトリルに溶解後、水および空製剤 (SC) を加えて混合し、25%SC 製剤を調製した。

処理方法: 播種 59 日後のなたねに処理液を 400 g ai/ha の割合^{a)} で、処理区 2 では 1 回、処理区 1 では 2 週間間隔で 2 回散布処理した。

採取時期：処理区 1 については 2 回目の処理 14 日後に青刈りを採取した。また、処理区 2 については処理 54 日後に、処理区 1 については 2 回目の処理 40 日後に成熟なたね種子を採取した。

分析方法：なたね試料の分析方法のスキームを図 1 に示す。マンデストロピンおよびその代謝物は該当ピークを単離後、標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定した。抱合体の同定は、該当ピークを単離後、セルラーゼおよび β -グルコシダーゼによる加水分解 (39°C で最大 2 日間インキュベート) に供し、得られたアグリコンと標品との HPLC コクロマトグラフィーにより行った。青刈り試料の抽出残渣については、1 M 塩酸 (40°C で一晩)、6 M 塩酸 (80°C で 4 時間)、1 M 水酸化ナトリウム (40°C で一晩) および 6 M 水酸化ナトリウム (80°C で一晩) による段階的加水分解を実施した。[フェノキシ- 14 C] 標識体処理の種子試料の抽出残渣については、アミラーゼ (30°C で 22 時間を 2 回)、プロテアーゼ (30°C で 22 時間)、1 M 塩酸 (40°C で一晩)、6 M 塩酸 (80°C で 4 時間)、1 M 水酸化ナトリウム (40°C で一晩) および 6 M 水酸化ナトリウム (80°C で一晩) による段階的加水分解を実施した。また、一部の試料については、キラル HPLC 分析を行うことにより、マンデストロピンの R : S 異性体比を測定した。

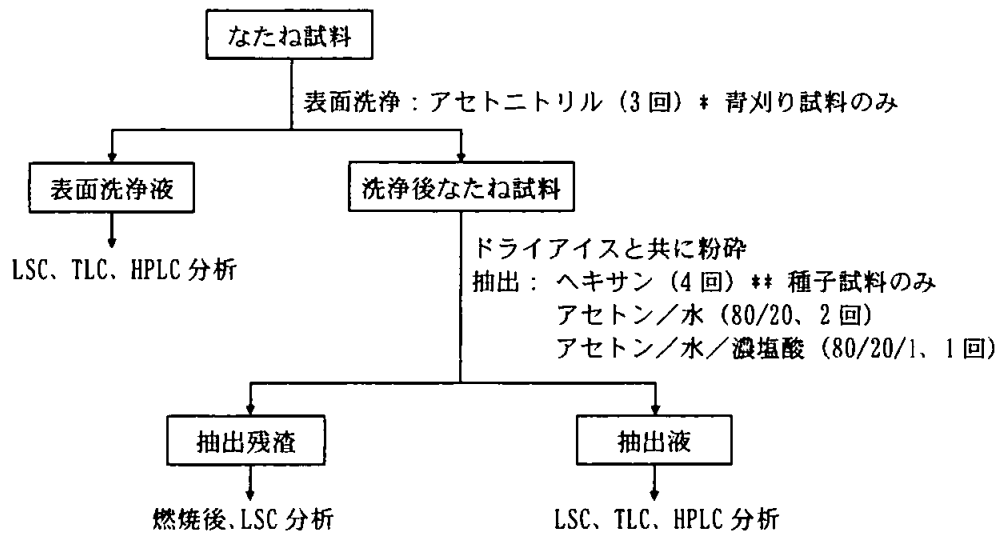


図 1：なたね試料 (青刈り、種子) の抽出および分析スキーム

試験結果：

¹⁴C 分布：なたね各試料における ¹⁴C 分布を表 1 および 2 に示す。

なたねにおける総残留放射能 (TRR) 濃度は、2 回処理の青刈りおよび種子でそれぞれ 3.438~3.993 ppm および 0.469~0.644 ppm であり、1 回処理の場合、種子で 0.051~0.110 ppm であった。

表面洗浄液中の放射能は、青刈りにおいて 34.2~36.7%TRR であった。抽出液中の放射能は、2 回処理の青刈りおよび種子でそれぞれ 54.9~58.3%TRR および 85.4~99.9%TRR であり、1 回処理の種子においては 81.5~90.7%TRR であった。抽出残渣中の放射能は、2 回処理の青刈りおよび種子でそれぞれ 7.5~8.4%TRR (0.259~0.335 ppm)、0.1~14.6%TRR (0.001~0.069 ppm) であり、1 回処理の種子で 9.3~18.6%TRR (0.009~0.010 ppm) であった。

[フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区のなたね種子の抽出残渣は、酵素、酸、および塩基を用いた段階的加水分解により、最終的に 1.2~1.8%TRR (0.001~0.006 ppm) となった (表 3)。

表 1：なたねにおける ¹⁴C 分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体処理区)

	処理区 1 (2 回処理)				処理区 2 (1 回処理)	
	青刈り		種子		種子	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR
表面洗浄液	1.467	36.74	NA	NA	NA	NA
抽出液	2.192 ^c	54.88 ^d	0.400	85.37	0.041	81.45
ヘキサン抽出液	NA	NA	0.127	27.15	<LOQ	<LOQ
アセトン/水抽出液	2.013	50.41	0.240	51.19	0.036	70.66
アセトン/水/酸抽出液	0.178	4.46	0.033	7.04	0.005	10.79
抽出残渣	0.335	8.38	0.069	14.63	0.009	18.55
合計	3.993 ^c	100.00	0.469	100.00	0.051	100.00

NA：分析せず。

<LOQ：定量限界未満。

a：マンデストロピン換算値。

b：なたね各試料中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)。

c：小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

d：小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表 2 : なたねにおける ^{14}C 分布 ([ベンジル- ^{14}C] 標識体処理区)

	処理区 1 (2 回処理)				処理区 2 (1 回処理)	
	青刈り		種子		種子	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR
表面洗浄液	1.175	34.16	NA	NA	NA	NA
抽出液	2.005	58.31	0.643	99.89 ^d	0.100 ^c	90.74 ^d
ヘキサン抽出液	NA	NA	0.142	22.06	<LOQ	<LOQ
アセトン/水抽出液	1.880	54.66	0.453	70.36	0.088	79.34
アセトン/水/酸抽出液	0.125	3.65	0.048	7.48	0.013	11.39
抽出残渣	0.259	7.53	0.001	0.11	0.010	9.26
合計	3.438 ^c	100.00	0.644	100.00	0.110	100.00

NA : 分析せず。

<LOQ : 定量限界未満。

a : マンデストロピン換算値。

b : なたね各試料中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)。

c : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

d : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表 3 : 種子抽出残渣の段階的加水分解の結果 ([フェノキシ- ^{14}C] 標識体)

	処理区 1 (2 回処理)			処理区 2 (1 回処理)		
	%PES ^a	ppm ^b	%TRR ^c	%PES	ppm	%TRR
アミラーゼ処理	20.59	0.014	3.01	34.69	0.003	6.20
プロテアーゼ処理	11.86	0.008	1.73	15.72	0.001	2.81
1 M 酸加水分解	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6 M 酸加水分解	8.41	0.006	1.23	ND	ND	ND
1 M 塩基加水分解	21.51	0.015	3.15	30.94	0.003	5.53
6 M 塩基加水分解	32.96	0.023	4.82	12.62	0.001	2.26
結合性残渣	8.39	0.006	1.23	10.10	0.001	1.81
合計	103.72	0.072	15.17	104.07	0.010 ^d	18.60 ^e

ND : 検出せず。

a : 種子抽出残渣 (PES) に対する割合 (%)。

b : マンデストロピン換算値。

c : 種子中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)。

d : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

代謝 : なたね各試料における代謝物の分析結果を表 4~9 に示す。

青刈りにおける未変化のマンデストロピンは 19.8~22.4%TRR (0.771~0.791)

ppm) であり、主要代謝物として 4-OH-S-2200 糖抱合体 (27.0~35.6%TRR, 0.929~1.420 ppm)、2-CH₂OH-S-2200 糖抱合体 (12.1~12.4%TRR, 0.427~0.484 ppm) が検出された。その他の代謝物として 2-CH₂OH-S-2200、5-CH₂OH-S-2200 糖抱合体および MCBX が検出されたが、いずれも 5.1%TRR 以下であった。

2 回処理した種子における主要残留物は未変化のマンデストロピン (25.1~30.7%TRR, 0.144~0.162 ppm) であった。主要代謝物は 4-OH-S-2200 糖抱合体 (11.1~14.5%TRR, 0.068~0.071 ppm) であり、その他の代謝物として 2-CH₂OH-S-2200 糖抱合体、5-CH₂OH-S-2200 糖抱合体および 5-COOH-S-2200 が検出されたが、いずれも 6.5%TRR 以下であった。一方、1 回処理した種子においては未変化のマンデストロピンは検出されず、代謝物として 2-CH₂OH-S-2200 糖抱合体、4-OH-S-2200 糖抱合体および 5-COOH-S-2200 が検出されたが、いずれも 8.7%TRR 以下であった。

また、キラル HPLC 分析の結果、試料中のマンデストロピンの R : S 異性体比は被験物質同様約 50 : 50 であり、アセトアミド基の 2 位におけるエピマー化は認められなかった。

表 4 : 青刈りにおける代謝物分布 ([フェノキシ-¹⁴C] 標識体、処理区 1 (2 回処理))

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	1.467 ^d	36.74	2.013 ^d	50.41 ^e	0.178	4.46	3.659 ^d	91.62 ^e
マンデストロピン	0.654	16.39	0.123	3.08	0.013	0.34	0.791 ^d	19.80 ^e
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	0.192	4.81	0.322	8.05	0.017	0.43	0.484 ^d	12.13 ^e
4-OH-S-2200 糖抱合体	0.381	9.55	0.944	23.65	0.050	1.26	1.420 ^d	35.62 ^e
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	0.062	1.54	0.136	3.40	0.007	0.17	0.204 ^d	5.12 ^e
2-CH ₂ OH-S-2200	0.006	0.16	ND	ND	ND	ND	0.006	0.16
MCBX	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0.171	4.29	0.489	12.25	0.091	2.26	0.751 ^e	18.80 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.335	8.38
合計	1.467	36.74	2.013	50.41	0.178	4.46	3.993 ^d	100.00

ND : 検出せず。

a : マンデストロピン換算値。

b : 青刈り中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)。

c : 複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表5：青刈りにおける代謝物分布（[ベンジル-¹⁴C]標識体、処理区1（2回処理））

	表面洗浄液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	1.175	34.16	1.880	54.66	0.125 ^d	3.65	3.180	92.47
マンデストロピン	0.597	17.35	0.165	4.79	0.010	0.28	0.771 ^d	22.42
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	0.114	3.31	0.297	8.63	0.017	0.49	0.427 ^d	12.43
4-OH-S-2200 糖抱合体	0.247	7.19	0.646	18.77	0.037	1.07	0.929 ^d	27.03
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	0.017	0.50	0.079	2.30	ND	ND	0.096	2.80
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	0.004	0.11	0.004	0.11
MCBX	ND	ND	0.006	0.16	ND	ND	0.006	0.16
その他	0.200	5.81	0.687	20.01	0.059	1.70	0.947 ^{cd}	27.52 ^c
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.259	7.53
合計	1.175	34.16	1.880	54.66	0.125	3.65	3.438 ^d	100.00

ND：検出せず。

a：マンデストロピン換算値。

b：青刈り中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）。

c：複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e：小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表6：種子における代謝物分布（[フェノキシ-¹⁴C]標識体、処理区1（2回処理））

	ヘキサン抽出液		アセトン/水 抽出液		アセトン/水/ 酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	0.127	27.15	0.240 ^d	51.18	0.033 ^d	7.04	0.401	85.37
マンデストロピン	0.127	27.15	0.017	3.53	ND	ND	0.144	30.68
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.027	5.76	0.003	0.74	0.031 ^d	6.50
4-OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.060	12.83	0.008	1.65	0.068	14.48
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.014	3.06	ND	ND	0.014	3.06
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200	ND	ND	0.016	3.41	ND	ND	0.016	3.41
その他	ND	ND	0.106	22.59	0.021	4.65	0.128 ^{cd}	27.24 ^{ce}
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.069	14.63
合計	0.127	27.15	0.240	51.18	0.033	7.04	0.469 ^d	100.00

ND：検出せず。

a：マンデストロピン換算値。

b：種子中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）。

c：複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e：小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表7：種子における代謝物分布（[フェノキシ-¹⁴C] 標識体、処理区2（1回処理））

抽出画分	ヘキササン抽出液		アセトン/水抽出液		アセトン/水/酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	NA	NA	0.036	70.66	0.005	10.79	0.041	81.45
マンデストロピン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.002	3.58	ND	ND	0.002	3.58
4-OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.004	7.98	ND	ND	0.004	7.98
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200	ND	ND	0.004	8.70	ND	ND	0.004	8.70
その他	ND	ND	0.026	50.40	0.005	10.79	0.031 ^c	61.19 ^c
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.009	18.55
合計	NA	NA	0.036	70.66	0.005	10.79	0.051 ^d	100.00

NA：分析せず。ND：検出せず。

a：マンデストロピン換算値。

b：種子中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）。

c：複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表8：種子における代謝物分布（[ベンジル-¹⁴C] 標識体、処理区1（2回処理））

抽出画分	ヘキササン抽出液		アセトン/水抽出液		アセトン/水/酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出画分	0.142	22.06	0.453	70.36 ^e	0.048 ^d	7.48	0.643	99.89 ^e
マンデストロピン	0.131	20.33	0.031	4.80	ND	ND	0.162	25.13
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.030	4.67	0.003	0.40	0.033	5.08 ^e
4-OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.065	10.17	0.006	0.87	0.071	11.05 ^e
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	0.023	3.62	ND	ND	0.023	3.62
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200	ND	ND	0.008	1.27	ND	ND	0.008	1.27
その他	0.011	1.73	0.295	45.81	0.040	6.21	0.346 ^c	53.75 ^c
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.001	0.11
合計	0.142	22.06	0.453	70.36	0.048	7.48	0.644	100.00

ND：検出せず。

a：マンデストロピン換算値。

b：種子中の総残留放射能（TRR）に対する割合（%）。

c：複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d：小数第4位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e：小数第3位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

表 9 : 種子における代謝物分布 ([ベンジル-¹⁴C] 標識体、処理区 2 (1 回処理))

	ヘキサン抽出液		アセトン/水抽出液		アセトン/水/酸抽出液		合計	
	ppm ^a	%TRR ^b	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
抽出成分	ND	ND	0.088	79.34	0.013	11.39	0.100 ^d	90.74 ^e
マンデストロピン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4-OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-CH ₂ OH-S-2200 糖抱合体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-CH ₂ OH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	ND	ND	0.087	79.34	0.013	11.39	0.100 ^c	90.74 ^e
抽出残渣	-	-	-	-	-	-	0.010	9.26
合計	ND	ND	0.088	79.34	0.013	11.39	0.110	100.00

ND : 検出せず。

a : マンデストロピン換算値。

b : 種子中の総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)。

c : 複数の高極性代謝物群および微量成分から成る。

d : 小数第 4 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

e : 小数第 3 位を四捨五入したため、各値の和と合計が一致しない。

推定代謝経路 : マンデストロピンのなたねにおける推定代謝経路を図 2 に示す。

マンデストロピンのなたねにおける代謝経路は、ジメチルフェノキシ基 4 位の水酸化、もしくはジメチルフェノキシ基に結合したメチル基の水酸化とこれらに続く糖抱合体化、メトキシ基の脱メチル化、およびジメチルフェノキシ基の 5 位のメチル基酸化によるカルボキシ体 (5-COOH-S-2200) の生成であり、一部は植物構成成分に取り込まれると考えられた。

図 2: マンデストロピンのなたねにおける推定代謝経路

3. 土壌中動態に関する試験

(1) マンデストロピン R 体の好氣的土壌中動態試験

(資料 III-1)

試験機関：Covance Laboratories Ltd

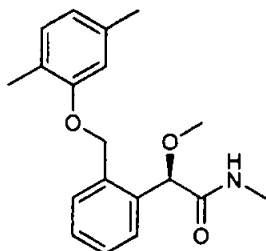
[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

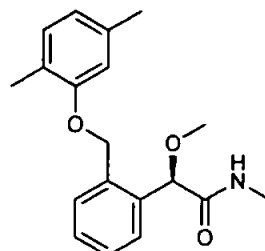
供試標識化合物： [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン R 体

[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン R 体

構造式：



[フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン R 体



[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン R 体

*：標識位置

化学名： (R)-2-メトキシ-N-メチル-2-[α-(2,5-キシリルオキシ)-o-トリル]アセトアミド

[フェノキシ-¹⁴C] 標識体

[ベンジル-¹⁴C] 標識体

標識位置

比放射能

放射化学的純度

供試土壌：次表記載の 4 種類の土壌を使用した。

土壌名	Speyer 5M	Speyer 2.2	SK920191	Chelmorton
採取場所	Mechtersheim, Rheinland-Pfalz, Germany	Hanhofen, Rheinland-Pfalz, Germany	South Witham, Lincolnshire, UK	Chelmorton, Derbyshire, UK
土性 ¹⁾	砂壤土	壤質砂土	埴壤土	シルト質壤土
砂 (%) ¹⁾	62	82	43	25
シルト (%) ¹⁾	28	12	27	55
粘土 (%) ¹⁾	11	6	30	20
有機炭素含量 (%)	1.3	2.1	3.8	3.4
陽イオン交換容量 (meq/100 g)	15.0	10.0	33.9	25.0
pH (水)	8.2	6.0	7.9	6.6
容水量 (pF 2) (%)	24.8	20.0	34.2	38.0

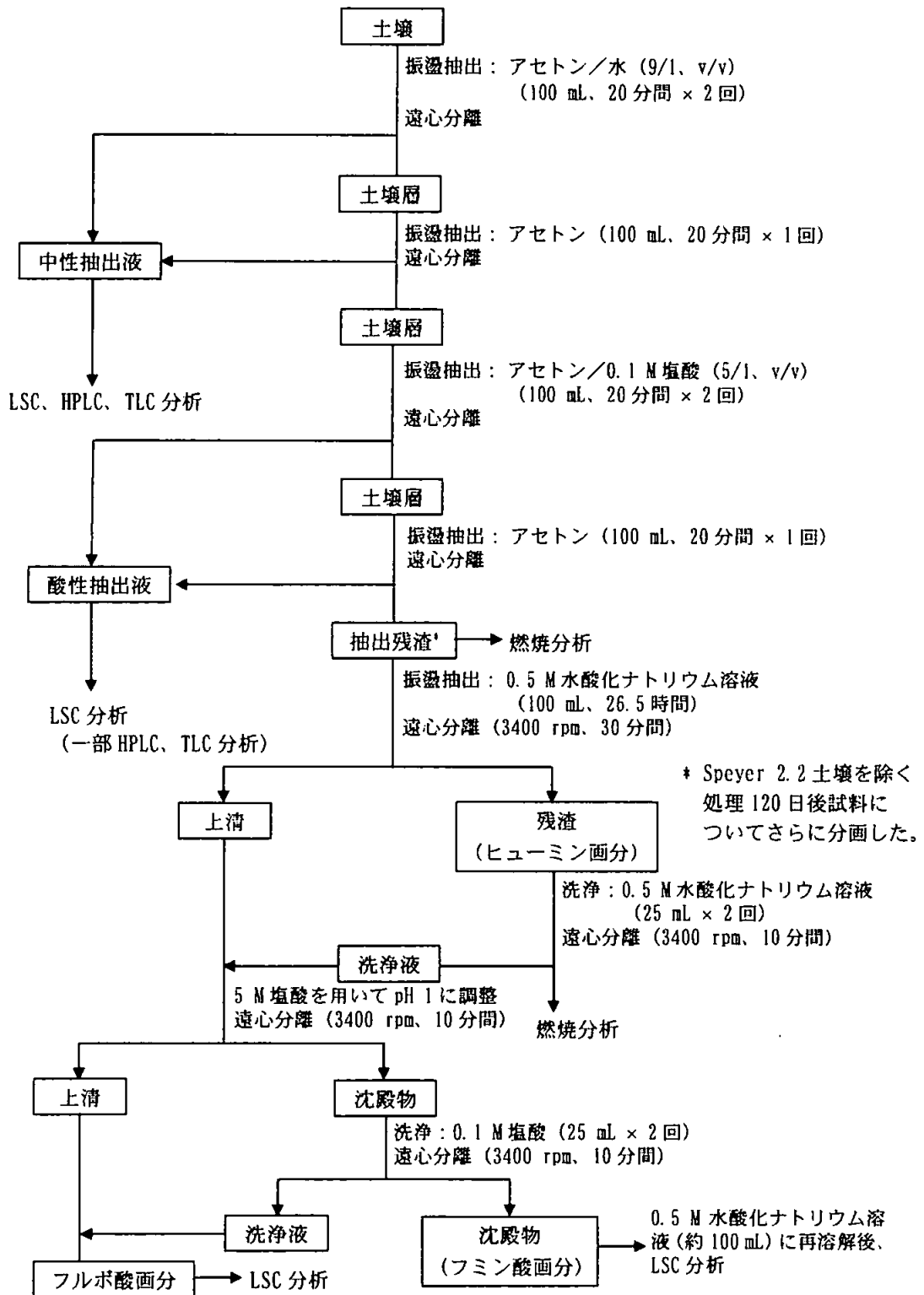
1) : USDA 分類に従う。

試験方法 : 2 mm の篩を通した供試土壌 (50 g 乾土重量相当の生土) を試験容器に入れ、pF 2 における容水量となるように水分含量を調整し、20±2℃の暗条件下で 15~28 日間ブレインキュベーションした。その後、処理量が乾土当り 0.8 µg/g となるように [¹⁴C] マンデストロピン R 体のアセトニトリル溶液 (Speyer 2.2 および Chelmorton 土壌用は非標識化合物で希釈) 90~100 µL を各供試土壌に添加・混合し、20±2℃の暗条件下でインキュベーションした。水分含量は 8~11 日毎に調整した。

処理直後、処理 7、14、30、59 (Speyer 2.2 および Chelmorton 土壌は 61 日) および 120 日後に採取した土壌試料を次頁のスキームに従って分析し、マンデストロピン R 体および代謝分解物を分析用標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。また、一部の抽出液については、キラル HPLC 分析を行い、マンデストロピン R 体の異性化の有無について確認した。なお、試験期間中は湿潤空気を連続的に通気し、揮発性化合物をエタンジオール、2% 液体パラフィン含有キシレンおよび 2 M 水酸化ナトリウム水溶液で捕集した。各トラップに捕集された ¹⁴C 量は LSC により定量した。処理 120 日後 (Speyer 2.2 土壌を除く) の水酸化ナトリウム水溶液は BaCl₂ 水溶液を添加することにより、¹⁴CO₂ 量を確認した。

さらに、処理 120 日後の土壌残渣 (Speyer 2.2 土壌を除く) はヒューミン、フミン酸およびフルボ酸に分画し結合性 ¹⁴C の化学的特徴付けを行った。

マンデストロピン R 体の分解半減期は、一次速度式 (SFO) を用いて算出した。



試験結果：マンデストロピン R 体を処理した土壌における放射能分布の経時変化を表 1~5 に示す。物質収支は各土壌採取時の 2 連の平均値において処理放射能の 94.0~102.3%であった。試験期間中に捕集された揮散性化合物はすべて $^{14}\text{CO}_2$ であり、処理 120 日後に処理量の 4.2~25.1%生成した。一方、土壌残渣は処理 120 日後に処理量の 6.7~33.2%であった。Speyer 2.2 土壌を除く各土壌の放射能量が最高値を示した土壌残渣についてアルカリ分画を実施した結果、フルボ酸、フミン酸およびヒューミンに各々処理量の 7.0~10.7%、5.6~6.2%および 6.2~21.9%が存在していた (表 6)。

マンデストロピン R 体の消失半減期は、Speyer 5M 土壌、Speyer 2.2 土壌、SK920191 土壌および Chelmorton 土壌において、それぞれ 66.5 日、227.1 日、50.6 日および 102.1 日であった (表 7)。処理 120 日後におけるマンデストロピン R 体の残留量は、処理量の 22.5~63.8%であった。なお、キラル HPLC 分析の結果、試料中にマンデストロピン S 体は検出されず、異性化が起こらないことが示された。

主要代謝分解物として 5-COOH-S-2200 が最大 16.9% (Speyer 5M および SK920191 土壌、ベンジル標識体、処理 59 日後) 検出され、その他の代謝分解物として 2-COOH-S-2200 が最大 8.6% (SK920191 土壌、ベンジル標識体、処理 59 日後)、DX-CA-S-2200 が最大 3.3% (Speyer 2.2 土壌、ベンジル標識体、処理 120 日後) 検出された。また、その他の代謝分解物として MCBX が検出されたが、処理量の 0.6%以下であった。

マンデストロピン R 体の好氣的土壌中における推定代謝分解経路を図 1 に示す。マンデストロピン R 体は好氣的土壌中でフェノキシ基の 2 または 5 位のメチル基の酸化、メトキシ基の脱メチル化およびフェニルエーテル結合の開裂とそれに続く酸化であった。生成した分解物はさらに代謝分解を受け、土壌に強固に結合するか、または最終的に二酸化炭素にまで無機化されることが考えられた。

表1 ベンジル標識体を処理した Speyer 5M 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	59	120
土壌		100.4	101.4	99.9	95.5	86.2	71.1
中性抽出液		99.5	96.1	93.2	83.2	65.6	36.3
酸性抽出液		0.7 ^a	2.8 ^a	3.0 ^a	5.2	2.1 ^a	5.6
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン R 体		98.9	89.1	81.7	71.0	39.4	24.6
マンデストロピン S 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	3.6	6.4	10.9	16.9	11.6
2-COOH-S-2200		ND	2.1	3.3	4.7	5.7	3.6
MCBX		ND	ND	ND	0.6	0.5	0.2
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	ND	ND	0.6	0.3
その他 ^c		ND	ND	0.3	0.8	1.3	1.5
バックグラウンド ^d		0.6	1.3	1.4	0.4	1.2	0.1
土壌残渣		0.2	2.6	3.8	7.2	18.5	29.2
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	0.9	1.7	3.7	9.0	25.1
物質収支		100.4	102.3	101.6	99.2	95.1	96.2

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

a : 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b : 代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では DX-CA-S-2200 のみ検出された。

c : 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 0.8%。

d : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表2 フェノキシ標識体を処理した Speyer 5M 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	59	120
土壌		100.1	100.3	97.2	95.4	90.8	75.9
中性抽出液		99.1	93.9	89.9	83.4	71.2	47.8
酸性抽出液		0.8 ^a	3.2 ^a	3.0 ^a	5.2	7.0	6.9
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン R 体		98.1	86.4	77.4	72.8	58.4	35.3
マンデストロピン S 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	3.9	6.9	9.4	12.7	12.5
2-COOH-S-2200		ND	2.0	3.7	4.9	5.4	4.9
MCBX		ND	ND	0.1	ND	0.2	0.3
その他 ^b		ND	0.2	0.5	ND	0.8	0.9
バックグラウンド ^c		1.0	1.4	1.1	1.5	0.6	0.5
土壌残渣		0.2	3.2	4.4	6.8	12.6	21.3
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	0.6	1.5	2.9	6.7	19.6
物質収支		100.1	100.9	98.7	98.3	97.5	95.5

NA: 分析せず。

ND: 検出せず (< 0.1%)。

a: 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b: 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 0.8%。

c: HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表3 ベンジル標識体を処理した Speyer 2.2 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	7	14	30	61	120
土壌		97.9	94.5	93.2	93.8	91.5	90.3
中性抽出液		97.0	88.9	85.6	84.5	78.6	73.0
酸性抽出液		0.9 ^a	3.5 ^a	4.6	5.9	8.5	10.7
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン R 体		95.2	83.2	80.3	80.0	69.6	63.8
マンデストロピン S 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	3.3	5.6	6.1	5.7	4.9
2-COOH-S-2200		ND	0.9	1.5	1.8	2.1	2.8
MCBX		ND	ND	0.2	ND	0.3	0.6
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	0.5	0.8	3.5	5.0
その他 ^c		ND	0.4	1.1	1.2	4.9	5.5
バックグラウンド ^d		1.8	1.1	1.0	0.6	0.9	1.1
土壌残渣		0.1	2.1	3.1	3.4	4.5	6.7
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	1.3	2.3	2.8	2.6	4.2
物質収支		97.9	95.8	95.5	96.6	94.1	94.5

NA：分析せず。

ND：検出せず (< 0.1%)。

a：酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b：代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では、DX-CA-S-2200 (最大 3.3%)、およびその他の未同定代謝物が検出された。De-Xy-S-2200 は検出されなかった。

c：未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 2.8%。

d：HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表4 ベンジル標識体を処理したSK920191土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	7	14	30	59	120
土壌		99.9	100.0	97.5	93.6	90.1	73.2
中性抽出液		98.5	90.9	86.3	71.2	60.9	32.9
酸性抽出液		1.2 ^a	4.7	4.5	9.1	9.2	7.1
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン R 体		96.7	80.7	70.6	56.1	41.2	22.5
マンデストロピン S 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	9.4	12.7	15.9	16.9	11.5
2-COOH-S-2200		ND	4.3	6.2	7.2	8.6	3.3
MCBX		ND	ND	0.1	0.4	ND	0.2
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	ND	0.1	ND	ND
その他 ^c		ND	0.2	0.2	0.2	ND	2.1
バックグラウンド ^d		1.7	1.0	0.9	0.4	3.4	0.2
土壌残渣		0.3	4.4	6.8	13.3	20.1	33.2
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	1.1	1.8	4.9	7.1	23.2
物質収支		99.9	101.0	99.3	98.5	97.2	96.3

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

a : 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b : 代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では、放射エネルギーが低いため、De-Xy-S-2200 および DX-CA-S-2200 は検出されなかった。

c : 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 1.9%。

d : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表5 ベンジル標識体を処理した Chelmorton 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	61	120
土壌		95.0	92.0	88.9	84.8	82.7	79.7
中性抽出液		93.4	79.9	72.8	62.4	56.7	47.1
酸性抽出液		1.4 ^a	5.3	5.7	8.0	9.7	13.6
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン R 体		92.1	76.1	67.9	59.2	50.3	43.1
マンデストロピン S 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	4.8	5.3	6.3	7.0	7.3
2-COOH-S-2200		ND	3.2	3.1	3.6	4.6	4.8
MCBX		ND	ND	0.4	ND	0.6	0.4
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	0.2	0.1	0.3	2.2	3.1
その他 ^c		ND	0.5	1.0	ND	1.5	1.6
バックグラウンド ^d		1.3	0.5	0.6	0.9	0.2	0.5
土壌残渣		0.2	6.8	10.4	14.5	16.3	19.0
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	3.2	5.7	9.6	11.1	14.4
物質収支		95.0	95.2	94.6	94.3	93.8	94.0

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

a : 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b : 代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では DX-CA-S-2200 のみ検出された。

c : 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 0.8%。

d : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表6 処理120日後における土壌残渣の分画（処理量に対する割合%）

	Speyer 5M		SK920191	Chelmorton
	[ベンジル- ¹⁴ C]	[フェノキシ- ¹⁴ C]	[ベンジル- ¹⁴ C]	[ベンジル- ¹⁴ C]
フルボ酸	10.7	7.0	8.6	7.6
フミン酸	6.2	5.6	5.6	5.6
ヒューミン	13.1	10.0	21.9	6.2

表7 マンデストロピンR体の消失半減期

土壌	標識体	半減期（日）	R ²
Speyer 5M	[ベンジル- ¹⁴ C]	53.4	0.9807
	[フェノキシ- ¹⁴ C]	84.1	0.9659
	両標識体	66.5	0.9474
Speyer 2.2	[ベンジル- ¹⁴ C]	227.1	0.8278
SK920191	[ベンジル- ¹⁴ C]	50.6	0.9697
Chelmorton	[ベンジル- ¹⁴ C]	102.1	0.8335

図1 マンデストロピンR体の好氣的土壤中における推定代謝分解経路

(2) マンデストロピン S 体の好氣的土壤中動態試験

(資料 III-2)

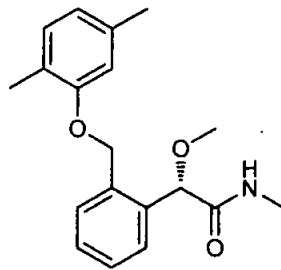
試験機関：Covance Laboratories Ltd

[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

供試標識化合物： [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン S 体

構造式：



*：標識位置

化学名： (S)-2-メキシ-N-メチル-2-[α-(2,5-キシロキシ)-o-トリル]アセトアミド

標識位置：

放射化学的純度：

比放射能：

供試土壌：次表記載の4種類の土壌を使用した。

土壌名	Speyer 5M	Speyer 2.2	SK920191	Chelmorton
採取場所	Mechtersheim, Rheinland-Pfalz, Germany	Hanhofen, Rheinland-Pfalz, Germany	South Witham, Lincolnshire, UK	Chelmorton, Derbyshire, UK
土性 ¹⁾	砂壤土	壤質砂土	埴壤土	シルト質壤土
砂 (%) ¹⁾	62	82	43	25
シルト (%) ¹⁾	28	12	27	55
粘土 (%) ¹⁾	11	6	30	20
有機炭素含量 (%)	1.3	2.1	3.8	3.4
陽イオン交換容量 (meq/100 g)	15.0	10.0	33.9	25.0
pH (水)	8.2	6.0	7.9	6.6
容水量 (pF 2) (%)	24.8	20.0	34.2	38.0

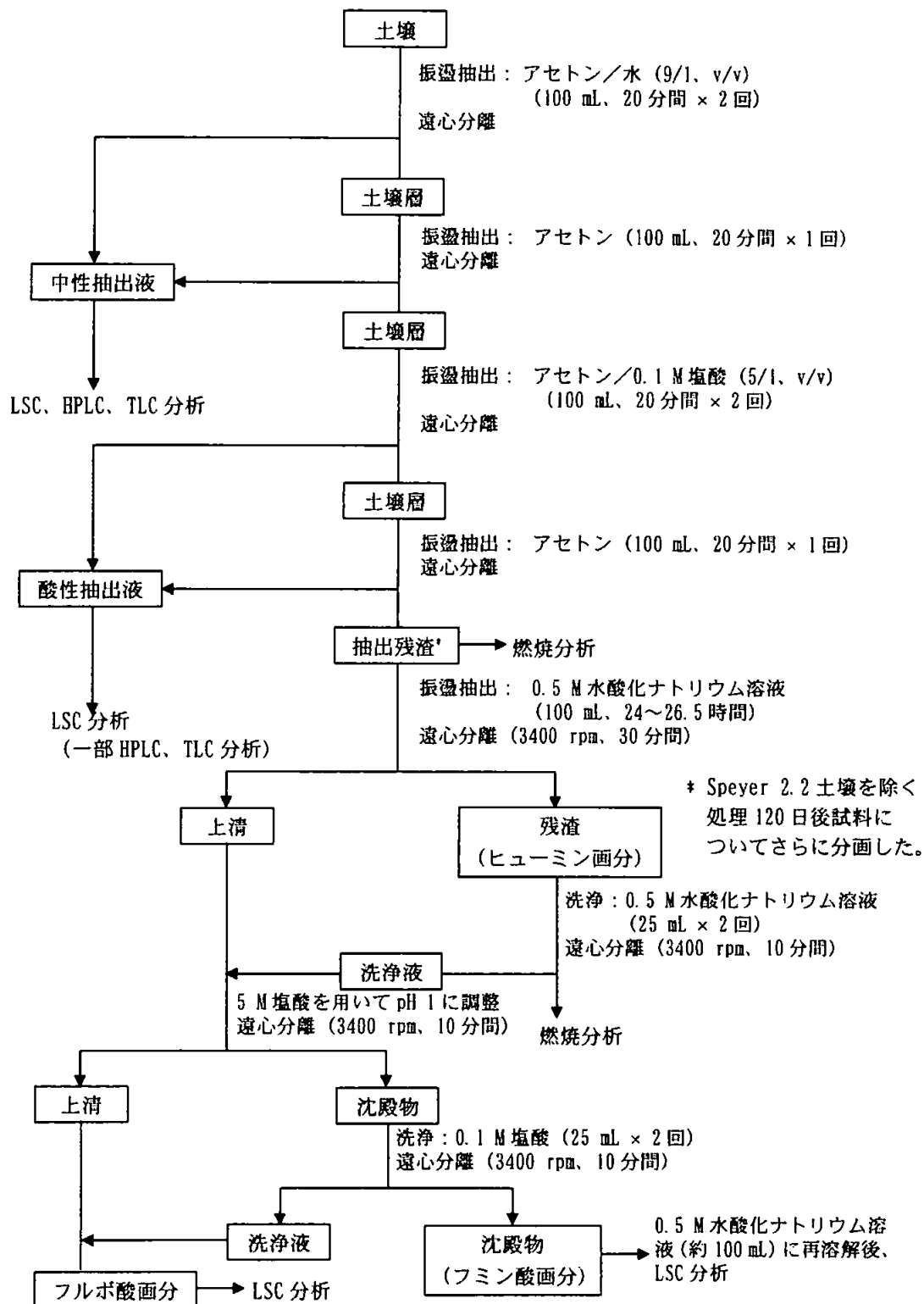
1) : USDA 分類に従う。

試験方法 : 2 mm の篩を通した供試土壌 (50 g 乾土重量相当の生土) を試験容器に入れ、pF 2 における容水量となるように水分含量を調整し、20±2℃の暗条件下で 15 ~ 28 日間ブレインキュベーションした。その後、処理量が乾土当り 0.8 µg/g となるように [¹⁴C] マンデストロピン S 体のアセトニトリル溶液 88 あるいは 120 µL を各供試土壌に添加・混合し、20±2℃の暗条件下でインキュベーションした。水分含量は 8~9 日毎に調整した。

処理直後、処理 7、14、29、60 (Speyer 2.2 および Chelmorton 土壌は 30 および 61 日) および 120 日後に採取した土壌試料を次頁のスキームに従って分析し、マンデストロピン S 体および代謝分解物を分析用標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。また、一部の抽出液については、キラル HPLC 分析を行い、マンデストロピン S 体の異性化の有無について確認した。なお、試験期間中は湿润空気を連続的に通気し、揮発性化合物をエタンジオール、2%液体パラフィン含有キシレンおよび 2 M 水酸化ナトリウム水溶液で捕集した。各トラップに捕集された ¹⁴C 量は LSC により定量した。処理 120 日後 (Speyer 2.2 土壌を除く) の水酸化ナトリウム水溶液は BaCl₂ 水溶液を添加することにより、¹⁴CO₂ 量を確認した。

さらに、処理 120 日後の土壌残渣 (Speyer 2.2 土壌を除く) はヒューミン、フミン酸およびフルボ酸に分画し結合性 ¹⁴C の化学的特徴付けを行った。

マンデストロピン S 体の分解半減期は、一次速度式 (SFO) を用いて算出した。



試験結果：マンデストロピン S 体を処理した土壌における放射能分布の経時変化を表 1~4 に示す。物質収支は各土壌採取時の 2 連の平均値において処理放射能の 95.1~99.5%の範囲であった。試験期間中に捕集された揮散性化合物はすべて $^{14}\text{CO}_2$ であり、処理 120 日後に処理放射能の 4.4~19.9%生成した。一方、土壌残渣は処理 120 日後に処理放射能の 6.4~27.3%であった。Speyer 2.2 土壌を除く各土壌の放射能量が最高値を示した土壌残渣についてアルカリ分画を実施した結果、フルボ酸、フミン酸およびヒューミンに各々処理量の 6.8~10.1%、3.5~6.2% および 6.9~17.3%が存在していた (表 5)。

マンデストロピン S 体の消失半減期は、Speyer 5M 土壌、Speyer 2.2 土壌、SK920191 土壌および Chelmonton 土壌において、それぞれ 85.4 日、322.6 日、92.0 日および 120.0 日であった (表 6)。処理 120 日後におけるマンデストロピン S 体の残留量は、処理量の 34.7~71.7%であった。なお、キラル HPLC 分析の結果、試料中にマンデストロピン R 体は検出されず、異性化が起こらないことが示された。

主要代謝分解物として 5-COOH-S-2200 が最大 10.5% (Speyer 5M 土壌、処理 60 日後) 検出され、その他の代謝分解物として 2-COOH-S-2200 が最大 4.8%

(Chelmonton 土壌、処理 120 日後)、DX-CA-S-2200 が最大 4.1% (Chelmonton 土壌、処理 120 日後) 検出された。また、その他の代謝分解物として MCBX が検出されたが、処理量の 0.5%以下であった。

マンデストロピン S 体の好氣的土壌中における推定代謝分解経路を図 1 に示す。マンデストロピン S 体は好氣的土壌中でフェノキシ基の 2 または 5 位のメチル基の酸化、メトキシ基の脱メチル化およびフェニルエーテル結合の開裂とそれに続く酸化であった。生成した分解物はさらに代謝分解を受け、土壌に強固に結合するか、または最終的に二酸化炭素にまで無機化されることが考えられた。

表1 Speyer 5M 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	29	60	120
土壌		98.9	95.3	96.9	94.6	88.2	75.7
中性抽出液		98.0	89.5	89.4	84.2	68.3	46.3
酸性抽出液		0.8 ^a	2.9 ^a	3.6 ^a	4.4 ^a	5.6	4.0 ^a
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン S 体		96.5	84.7	80.8	74.5	58.2	34.7
マンデストロピン R 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	2.8	4.4	5.0	10.5	7.0
2-COOH-S-2200		ND	1.2	1.8	2.4	3.4	2.2
MCBX		ND	ND	ND	ND	0.3	0.3
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	ND	0.4	ND	0.3
その他 ^c		ND	0.5	0.6	0.7	0.7	1.2
バックグラウンド ^d		1.5	0.3	1.8	1.2	0.6	0.6
土壌残渣		0.2	2.9	3.9	6.0	14.4	25.4
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	0.9	1.7	2.4	9.3	19.9
物質収支		98.9	96.2	98.5	96.9	97.5	95.6

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

a : 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b : 代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では DX-CA-S-2200 のみ検出された。

c : 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 0.7%。

d : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表 2 Speyer 2.2 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	61	120
土壌		98.7	96.5	95.6	96.9	94.7	92.7
中性抽出液		97.6	91.4	89.1	87.7	82.2	75.8
酸性抽出液		1.2 ^a	3.1 ^a	4.0 ^a	5.6	8.0	10.5
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン S 体		96.4	87.6	83.9	86.0	77.7	71.7
マンデストロピン R 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	2.0	2.8	3.8	3.3	3.5
2-COOH-S-2200		ND	0.5	0.9	1.3	2.1	2.8
MCBX		ND	0.1	ND	ND	0.5	0.4
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	ND	0.8	2.9	4.0
その他 ^c		ND	ND	0.6	0.6	2.7	2.9
バックグラウンド ^d		1.2	1.3	1.0	0.7	0.9	1.0
土壌残渣		ND	2.0	2.5	3.6	4.6	6.4
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	1.1	1.7	2.7	3.4	4.4
物質収支		98.7	97.6	97.3	99.5	98.1	97.0

NA：分析せず。

ND：検出せず (< 0.1%)。

a：酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b：代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では DX-CA-S-2200 のみ検出された。

c：未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 1.8%。

d：HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表3 SK920191 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	7	14	29	60	120
土壌		98.1	96.7	96.2	92.7	87.1	77.0
中性抽出液		96.6	89.1	85.2	77.5	62.3	45.5
酸性抽出液		1.2 ^a	3.6 ^a	4.5	4.7	5.8	4.2 ^a
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピンS体		94.0	83.3	80.1	70.3	55.0	39.4
マンデストロピンR体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	3.2	6.5	8.6	10.2	4.7
2-COOH-S-2200		ND	0.8	1.6	1.5	1.5	0.7
MCBX		ND	0.3	0.2	0.3	ND	0.1
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他 ^b		ND	0.5	0.4	0.6	0.4	0.2
バックグラウンド ^c		2.5	1.0	1.1	0.9	1.0	0.4
土壌残渣		0.3	4.1	6.5	10.6	19.0	27.3
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	1.1	1.7	3.8	9.0	18.1
物質収支		98.1	97.7	97.9	96.5	96.1	95.1

NA：分析せず。

ND：検出せず (< 0.1%)。

a：酸性抽出液はHPLC分析せず。

b：未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は0.6%。

c：HPLC分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表4 Chelmorton 土壌における放射能分布および代謝分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	7	14	30	61	120
土壌		97.9	94.4	91.1	88.8	86.0	84.6
中性抽出液		96.3	82.0	73.5	67.0	58.5	54.0
酸性抽出液		1.5 ^a	5.1	6.2	7.4	10.0	12.3
(中性+酸性抽出液)							
マンデストロピン S 体		95.8	78.8	70.6	64.1	54.8	49.0
マンデストロピン R 体		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	3.3	4.5	5.4	5.9	6.0
2-COOH-S-2200		ND	3.7	2.8	3.0	3.8	4.8
MCBX		ND	ND	ND	0.3	0.4	0.4
De-Xy-S-2200/DX-CA-S-2200 ^b		ND	ND	0.2	0.5	2.1	4.1
その他 ^c		ND	ND	0.9	0.6	1.2	1.0
バックグラウンド ^d		0.4	1.3	0.8	0.3	0.3	0.9
土壌残渣		0.1	7.4	11.5	14.5	17.6	18.4
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	2.8	5.8	8.6	11.3	12.2
物質収支		97.9	97.2	96.9	97.3	97.3	96.8

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

a : 酸性抽出液は HPLC 分析せず。

b : 代表的な土壌抽出液を用いた追加のクロマトグラフィー分析では DX-CA-S-2200 のみ検出された。

c : 未同定代謝分解物の合計。各成分の最大量は 0.5%。

d : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表5 処理120日後における土壌残渣の分画（処理量に対する割合%）

	Speyer 5M	SK920191	Chelmorton
フルボ酸	10.1	7.3	6.8
フミン酸	6.2	3.5	4.8
ヒューミン	11.2	17.3	6.9

表6 マンデストロピンS体の消失半減期

土壌	半減期（日）	R ²
Speyer 5M	85.4	0.9702
Speyer 2.2	322.6	0.8256
SK920191	92.0	0.9773
Chelmorton	120.0	0.7927

図1 マンデストロピンS体の好氣的土壌中における推定代謝分解経路

(3) マンデストロピン代謝物 5-COOH-S-2200 の好氣的土壤中動態試験 (資料 III-3)

試験機関 : Covance Laboratories Ltd

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2010 年

供試標識化合物 : [ベンジル-¹⁴C] 5-COOH-S-2200

構造式 :

化学名 :

標識位置 :

放射化学的純度 :

比放射能 :

供試土壌 : 次表記載の 3 種類の土壌を使用した。

土壌名	SK104691	SK920191	Speyer 5M
採取場所	Chelmorton, Derbyshire, UK	South Witham, Lincolnshire, UK	Mechtersheim, Rheinland-Pfalz, Germany
土性 ¹⁾	シルト質壤土	埴壤土	砂壤土
砂 (%) ¹⁾	26	38	62
シルト (%) ¹⁾	55	27	28
粘土 (%) ¹⁾	19	35	11
有機炭素含量 (%)	3.2	4.1	1.2
陽イオン交換容量 (meq/100 g)	20.8	30.6	15.0
pH (水)	6.5	7.6	8.3
容水量 (pF 2) (%)	39.0	31.5	19.6

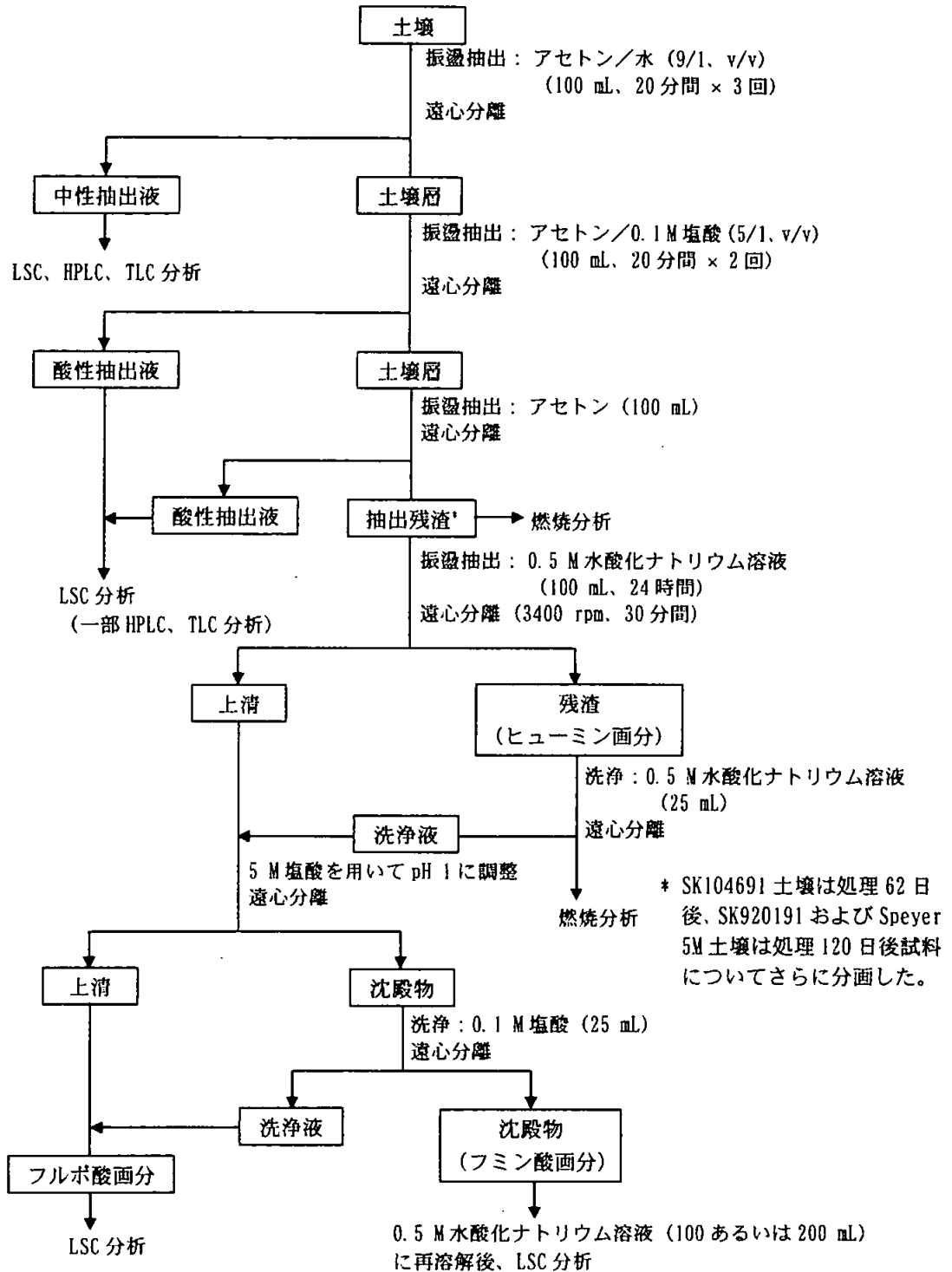
1) : USDA 分類に従う。

試験方法 : 2 mm の篩を通した供試土壌 (50 g 乾土重量相当の生土) を試験容器に入れ、pF 2 における容水量となるように水分含量を調整し、20±2℃の暗条件下で 15 日間プレインキュベーションした。その後、処理量が乾土当り 0.88 µg/g となるように [¹⁴C] 5-COOH-S-2200 のメタノール溶液 86 µL を各供試土壌に添加・混合し、20±2℃の暗条件下でインキュベーションした。水分含量は 8 日毎に調整した。

処理直後、処理 7、14、30、62 および 120 日後に採取した土壌試料を次頁のスキームに従って分析し、5-COOH-S-2200 および代謝分解物を分析用標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。なお、試験期間中は湿潤空気を連続的に通気し、揮発性化合物をエタンジオール、2%液体パラフィン含有キシレンおよび 2 M 水酸化ナトリウム水溶液で捕集した。各トラップに捕集された ¹⁴C 量は LSC により定量した。処理 120 日後の水酸化ナトリウム水溶液に BaCl₂ 水溶液を添加することにより、¹⁴CO₂ 量を確認した。

さらに、各土壌において最も高い濃度の放射能を含む土壌残渣についてはヒューミン、フミン酸およびフルボ酸に分画し、結合性 ¹⁴C の化学的特徴付けを行った。

5-COOH-S-2200 の分解半減期は、一次速度式 (SFO) を用いて算出した。



試験結果： ^{14}C 5-COOH-S-2200 を処理した土壌における放射能分布の経時変化を表 1~3 に示す。物質収支は各土壌採取時の 2 連の平均値において処理量の 95.4~104.4%であった。試験期間中に捕集された揮散性化合物はすべて $^{14}\text{CO}_2$ であり、処理 120 日後に処理量の 38.0~52.2%生成した。一方、土壌残渣は処理 120 日後に処理量の 36.6~48.4%であった。各土壌において放射能量が最高値を示した土壌残渣についてアルカリ分画を実施した結果、結合放射能はフルボ酸、フミン酸およびヒューミンに各々処理量の 8.2~10.5%、11.1~21.8%および 8.1~25.7%存在していた (表 4)。

5-COOH-S-2200 の消失半減期は、SK104691 土壌、SK920191 土壌および Speyer 5M 土壌において、それぞれ 21.9 日、30.3 日および 41.0 日であった (表 5)。処理 120 日後における 5-COOH-S-2200 の残留量は、処理量の 8.2~16.4%であった。代謝物としては、SK104691 において処理 7 日後に DX-CA-S-2200 が処理量の 0.3% 検出されたが、処理 14 日以降は検出されなかった。

5-COOH-S-2200 の好氣的土壌中における想定代謝分解経路を図 1 に示す。5-COOH-S-2200 は好氣的土壌中でフェニルエーテル結合が開裂し、その後土壌に強固に結合するか、または最終的に二酸化炭素にまで無機化されると考えられた。

表1 SK104691 土壌における放射能分布および分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	62	120
土壌		103.7	97.8	91.3	75.1	57.2	45.8
中性抽出液		87.9	58.1	46.8	25.4	10.6	4.4
酸性抽出液		12.7	19.3	16.9	11.0	5.6	3.8
(中性+酸性抽出液)							
5-COOH-S-2200		99.0	75.8	62.9	36.1	15.6	8.2
De-Xy-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
DX-CA-S-2200		ND	0.3	ND	ND	ND	ND
その他		ND	ND	ND	ND	0.2	ND
バックグラウンド*		1.6	1.2	0.7	0.3	0.4	ND
土壌残渣		3.1	20.5	27.7	38.7	41.0	37.6
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	3.4	9.0	20.5	38.8	52.2
物質収支		103.7	101.1	100.3	95.6	95.9	98.0

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

* : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表2 SK920191 土壌における放射能分布および分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	62	120
土壌		103.1	97.0	92.2	80.6	74.8	60.6
中性抽出液		86.0	63.8	53.6	31.5	25.8	8.6
酸性抽出液		15.0	16.6	14.4	9.7	7.3	3.6
(中性+酸性抽出液)							
5-COOH-S-2200		98.5	79.6	65.1	39.5	30.9	11.9
De-Xy-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
DX-CA-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他		1.3	ND	1.9	1.4	1.5	0.1
バックグラウンド*		1.1	0.7	1.0	0.3	0.6	0.2
土壌残渣		2.1	16.7	24.3	39.5	41.8	48.4
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	2.1	7.1	18.1	22.9	38.0
物質収支		103.1	99.1	99.3	98.7	97.6	98.6

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

* : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表3 Speyer 5M 土壌における放射能分布および分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	7	14	30	62	120
土壌		104.4	99.3	95.5	87.3	73.4	54.9
中性抽出液		99.2	85.3	76.3	58.8	37.0	15.4
酸性抽出液		4.8	7.4	6.8	6.3	5.0	3.0
(中性+酸性抽出液)							
5-COOH-S-2200		102.7	91.9	77.4	60.4	36.2	16.4
De-Xy-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
DX-CA-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他		ND	ND	4.7	4.1	4.7	1.7
バックグラウンド*		1.3	0.8	1.0	0.6	1.1	0.2
土壌残渣		0.4	6.6	12.4	22.3	31.4	36.6
揮発性化合物 (CO ₂)		NA	1.5	4.7	12.2	24.6	40.6
物質収支		104.4	100.8	100.2	99.5	98.0	95.4

NA : 分析せず。

ND : 検出せず (< 0.1%)。

* : HPLC 分析において主要なピークのない分離不能な放射能画分。

表4 土壌残渣の分画 (処理量に対する割合%)

土壌	SK104691	SK920191	Speyer 5M
経過日数	62	120	120
フルボ酸	9.3	8.2	10.5
フミン酸	21.8	13.1	11.1
ヒューミン	8.1	25.7	17.2

表5 5-COOH-S-2200 の消失半減期

土壌	半減期 (日)	R ²
SK104691	21.9	0.994
SK920191	30.3	0.968
Speyer 5M	41.0	0.993

図1 5-COOH-S-2200の好氣的土壤中における推定代謝分解経路

(4) マンデストロピンの嫌氣的土壤中動態試験

(資料 III-4)

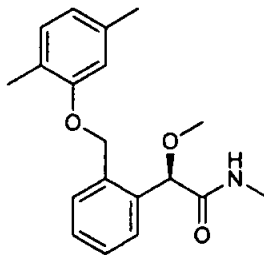
試験機関: Valent Technical Center

[GLP 対応]

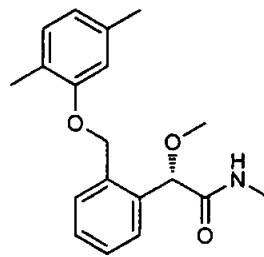
報告書作成年: 2012 年

供試標識化合物: [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン R 体
 [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン S 体
 [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン R 体

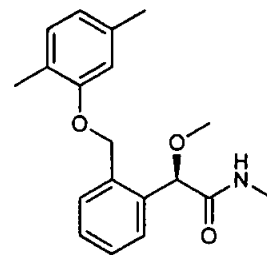
構造式:



[ベンジル-¹⁴C]
マンデストロピン R 体



[ベンジル-¹⁴C]
マンデストロピン S 体



[フェノキシ-¹⁴C]
マンデストロピン R 体

*: 標識位置

化学名: 2-メチル-N-メチル-2-[α-(2,5-キシロキシ)-o-トリル]アセチアミド*

	[ベンジル- ¹⁴ C]	[ベンジル- ¹⁴ C]	[フェノキシ- ¹⁴ C]
	マンデストロピン R 体	マンデストロピン S 体	マンデストロピン R 体
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

供試土壌: 兵庫県加西市の農場の土壌を使用した。

項目	分析値	項目	分析値
砂 (%) ¹⁾	61	有機物含量 (%)	3.4
シルト (%) ¹⁾	23	pH (H ₂ O)	6.0
粘土 (%) ¹⁾	16	陽イオン交換容量 (meq/100 g)	9.8
土性 ¹⁾	砂壤土	容水量 (1/3 bar) (%)	19.0

1) USDA 分類に従う。

試験方法：2 mm の篩を通した供試土壌（170 g 湿土（149 g 乾土相当））および水（80 mL）をサイドアームトラップ付きのバイオメーターフラスコに入れ、窒素気流を約 1 時間注入させた後、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ の暗条件下で 20~21 日間ブレインキュベーションした。なお、開始時のフラスコ内は土壌の高さが約 4~5 cm、表層水の高さが 1~2 cm であった。また、サイドアームトラップに 1 M NaOH 溶液（25 mL）を入れた。ブレインキュベーション後、乾土当り 1.4 ppm となるように [^{14}C] マンデストロピン R 体あるいは [^{14}C] マンデストロピン S 体のアセトニトリル溶液 250 μL をバイオメーターフラスコ上部のシリンジバルブから嫌氣的に添加した。土壌／水系に分布するようにバイオメーターフラスコを緩やかに巡回させた後、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ の暗条件下でインキュベーションした。

処理直後（0 日後）、処理 14、29、63、90 および 181 日後に試料を 2 連で採取した。

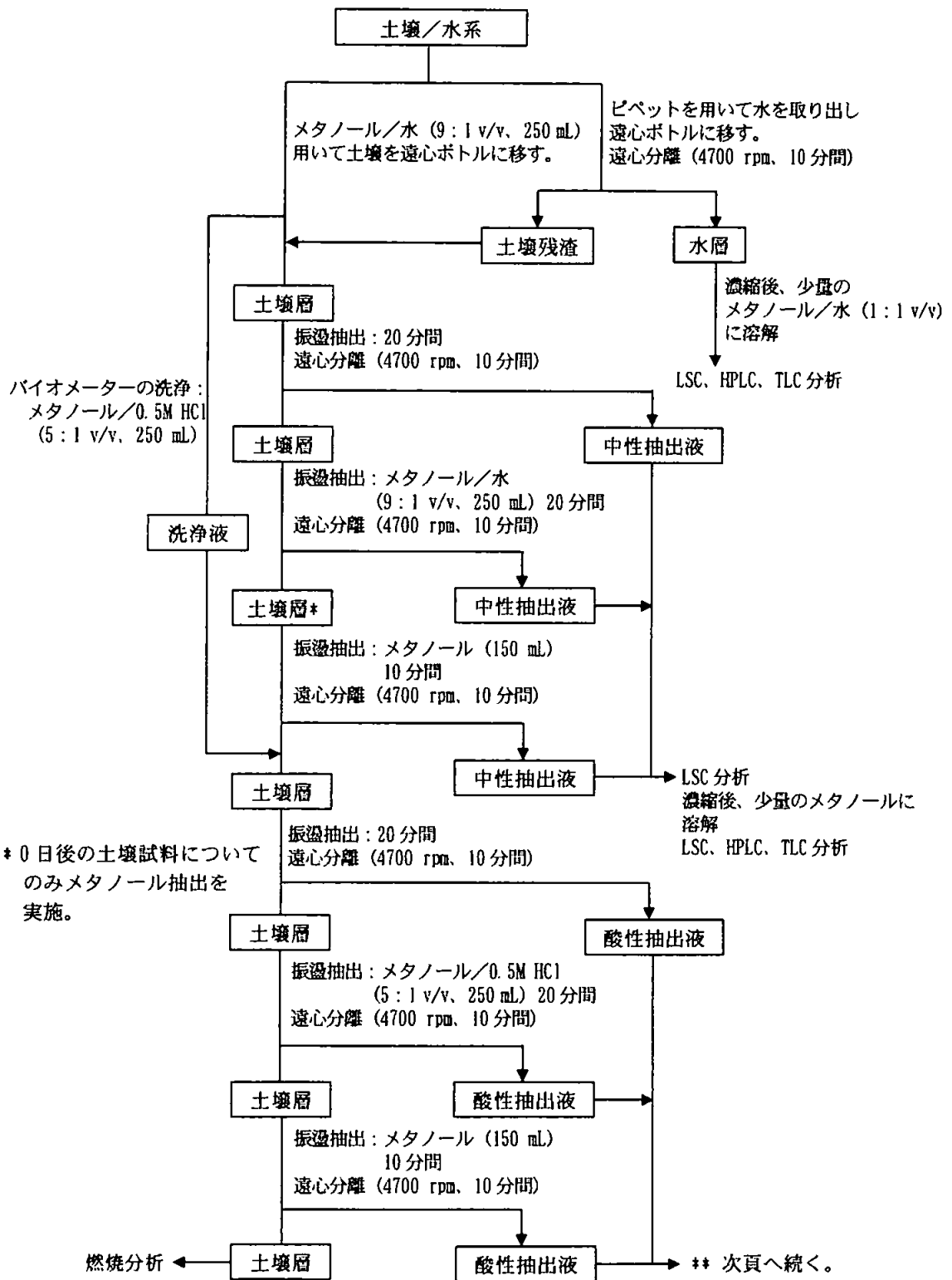
土壌／水系；次頁のスキームに従って分析し、マンデストロピンおよび代謝分解物を分析用標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。また、処理 181 日後の試料については、キラル HPLC 分析を行い、マンデストロピンあるいは主要代謝分解物の異性化の有無について確認した。

NaOH トラップ（ $^{14}\text{CO}_2$ の定量）；サイドアームトラップの NaOH 溶液の容量を測定し、LSC により放射能を測定した。

ヘッドスペースガス（ $^{14}\text{CH}_4$ の定量）；バイオメーターフラスコのサンプリングバルブからシリンジを用いてヘッドスペースガス試料を抜き取り、直接燃焼分析に供し、放射能量を測定した。

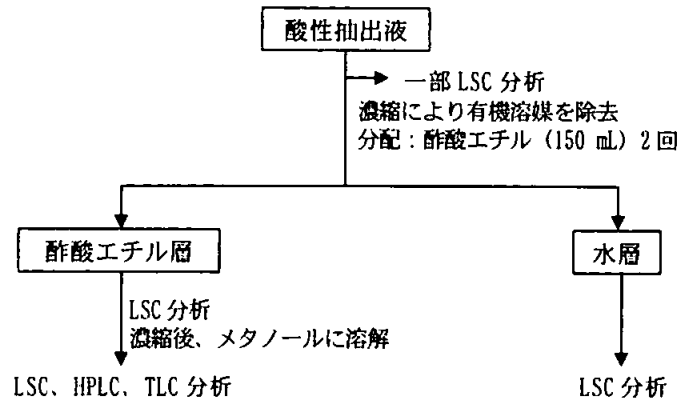
また、試料採取時にバイオメーターフラスコ内（土壌／水系）の物理的パラメーター（溶存酸素量、酸化還元電位、pH（水および土壌））を測定し、嫌気性の確認をした。

マンデストロピンの土壌／水系における分解半減期は、一次速度式 (SFO) を用いて算出した。



* 0日後の土壌試料についてのみメタノール抽出を実施。

** 前頁からの続き。



試験結果:

試験システムの嫌気性; バイオメーターフラスコ内 (土壌/水系) における物理的パラメーター (水 pH, 土壌 pH, 溶存酸素濃度および酸化還元電位) を、試料採取時に測定した。各試験における各パラメーターの平均値を下表に示す。これらの測定結果により、試験システムは試験期間を通して嫌気性が維持されたことが示された。

パラメーター	[ベンジル- ¹⁴ C]	[ベンジル- ¹⁴ C]	[フェノキシ- ¹⁴ C]
	マンデストロピン R 体	マンデストロピン S 体	マンデストロピン R 体
pH (水)	7.77	7.90	7.83
pH (土壌)	6.93	6.86	6.85
溶存酸素濃度 (ppm)	0.05	0.05	0.07
酸化還元電位 (mV)	-189	-184	-184

¹⁴C 分布; [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン R 体、[ベンジル-¹⁴C] マンデストロピン S 体および [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピン R 体を処理した土壌/水系における放射能分布の経時変化を、それぞれ表 1, 2 および 3 に示す。物質収支は各土壌採取時の 2 連の平均値において処理量の 99.4~102.5%であった。試験期間中に発生した揮発性物質 (¹⁴CO₂ および ¹⁴CH₄) は処理量の 0.9%以下であった。水中における放射能量は処理直後が最も高く (処理量の 59.1~70.8%)、その後減少し、処理 181 日後には処理量の 1.2~1.4%となった。一方、土壌中の放射能量は処理直後に処理量の 29.5~41.8%であり、処理 63 あるいは 90 日後に 99.0~99.6%となり、181 日後には 97.2~98.5%となった。土壌の中性および酸性抽出により、処理直後は処理量の 28.4~40.2%、181 日後には処理量の 93.9~95.8%が抽出された。土壌残渣は試験期間中を通して処理量の 3.3%以下であった。

分解： 処理 181 日後の水および土壌抽出液を合わせたマンデストロピン残留量は、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン R 体、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン S 体および[フェノキシ-¹⁴C]マンデストロピン R 体を処理した試料で、それぞれ処理量の 94.4%、79.1%および 96.4%であった。[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン S 体処理試料における主要代謝物は MCBX (S 体) であり、処理 181 日後に最大で処理量の 17.0%検出 (大部分は土壌中に分布) された。その他の代謝分解物は、いずれも処理量の 1.3%以下であった。[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン R 体および[フェノキシ-¹⁴C]マンデストロピン R 体処理試料においては、処理量の 2%を超す代謝分解物は認められなかった。

以上の結果より、マンデストロピン S 体はマンデストロピン R 体より分解が速いことが示唆され、半減期は、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン R 体で 14 年、[フェノキシ-¹⁴C]マンデストロピン R 体で 17 年、[ベンジル-¹⁴C]マンデストロピン S 体で 1.5 年程度と推定された。

なお、R 体から S 体あるいは S 体から R 体への異性化が嫌氣的条件下で起こらない事が示された。

マンデストロピンの嫌氣的土壌中における想定代謝分解経路を図 1 に示す。マンデストロピンは嫌氣的土壌中で主として、メトキシ基の脱メチル化により代謝されると考えられた。

表1 [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピンR体を処理した土壌/水系における放射能分布および分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	14	29	63	90	181
水層		59.1	8.1	3.9	2.8	2.4	1.4
マンデストロピン		57.5	7.5	3.6	2.7	2.2	1.2
De-Xy-S-2200		0.9	0.3	0.2	0.1	0.1	ND
2-COOH-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		0.1	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX		ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他		0.6	0.3	0.1	ND	0.1	0.1
土壌層							
中性抽出液		40.2	71.8	72.9	70.1	68.5	63.5
酸性抽出液		NA	17.9	22.3	24.7	27.4	30.4
土壌抽出液合計 (中性+酸性)		40.2	89.7	95.2	94.8	96.0	93.9
マンデストロピン		39.8	88.2	92.8	92.4	93.3	93.2
De-Xy-S-2200		ND	0.6	0.2	0.7	0.4	ND
その他		0.4	0.9	1.8	1.1	1.5	ND
土壌残渣		1.6	1.9	2.4	2.7	3.0	3.3
揮発性物質							
¹⁴ CO ₂		NA	0.1	0.2	0.2	0.3	0.6
¹⁴ CH ₄		NA	ND	ND	ND	0.1	0.3
バイオメーター洗浄液		0.1	0.3	ND	0.2	0.2	0.1
物質収支		101.0	100.2	101.6	100.8	101.8	99.4

値は2連の平均値。

NA: 分析せず。 ND: <0.1%。

表2 [ベンジル-¹⁴C] マンデストロピンS体を処理した土壌/水系における放射能分布および分解物の経時変化

	処理量に対する割合 (%)						
	経過日数	0	14	29	63	90	181
水層		70.3	8.9	4.5	2.4	2.2	1.2
マンデストロピン		69.4	8.2	4.0	2.1	1.7	0.9
De-Xy-S-2200		0.6	0.2	0.1	ND	ND	ND
2-COOH-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCBX		ND	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4
その他		0.3	0.2	0.2	ND	ND	ND
土壌層							
中性抽出液		28.9	71.9	73.8	70.5	66.8	63.1
酸性抽出液		NA	18.6	21.1	26.6	30.2	32.5
土壌抽出液合計 (中性+酸性)		28.9	90.6	94.9	97.2	97.0	95.7
マンデストロピン		28.8	88.3	90.1	87.1	83.8	78.2
MCBX		ND	1.4	3.1	9.0	13.0	16.6
その他		0.1	0.9	1.3	0.1	0.2	ND
土壌残渣		1.3	1.7	2.2	2.4	2.4	2.8
揮発性物質							
¹⁴ CO ₂		NA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
¹⁴ CH ₄		NA	ND	ND	ND	ND	0.1
バイオメーター洗浄液		0.2	0.1	0.1	0.1	ND	0.2
物質収支		100.8	101.5	101.9	102.1	101.7	100.1

値は2連の平均値。

NA: 分析せず。 ND: <0.1%。

表3 [フェノキシ-¹⁴C] マンデストロピンR体を処理した土壌/水系における放射能分布および分解物の経時変化

	経過日数	処理量に対する割合 (%)					
		0	14	29	63	90	181
水層		70.8	8.8	4.2	2.3	1.8	1.4
マンデストロピン		70.6	8.6	4.1	2.3	1.8	1.4
2-COOH-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	0.1	0.1	ND	ND	ND
MCBX		ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他		0.3	0.1	0.1	ND	ND	ND
土壌層							
中性抽出液		28.4	72.8	74.8	71.9	68.4	65.3
酸性抽出液		NA	17.7	21.2	25.1	28.5	30.6
土壌抽出液合計 (中性+酸性)		28.4	90.5	96.0	97.0	96.9	95.8
マンデストロピン		28.4	89.5	93.1	95.1	95.4	95.0
2-COOH-S-2200		ND	ND	ND	ND	ND	ND
5-COOH-S-2200		ND	0.1	0.1	0.2	ND	ND
MCBX		ND	ND	0.1	0.1	ND	ND
その他		0.1	0.5	1.9	0.7	0.2	ND
土壌残渣		1.1	1.5	2.1	2.1	2.1	2.7
揮発性物質							
¹⁴ CO ₂		NA	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1
¹⁴ CH ₄		NA	ND	ND	ND	ND	ND
バイオメーター洗浄液		0.7	0.3	ND	0.1	0.2	0.1
物質収支		101.1	101.2	102.5	101.6	101.0	100.1

値は2連の平均値。

NA: 分析せず。 ND: <0.1%。

図1 マンデストロピンの嫌氣的土壤中における推定代謝分解経路