

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

ラットにおける反復経口投与（混餌）毒性試験（24 週間）

毒性資料 No. 参考-3

試験機関：

報告書作成年：1968 年

試験目的：

検 体：

供試動物：Wistar 系ラット、体重：雄 74～107g、雌 65～100、1 群雌雄各 10 匹

投与期間：24 週間

投与方法：検体を 0、10、50、250 及び 1250ppm の濃度で飼料に混入し、24 週間にわたって随時摂食させた。なお、これらの濃度は 0、1、5、25 及び 125mg/kg/日の投与量に相当する。

観察・検査項目：

一般状態及び死亡率：投与期間中、一般状態と生死を毎日観察した。

雌雄各投与群において、検体投与による影響と考えられる外徴や行動の変化は認められなかった。また、全群において死亡例は見られなかった。

体重：投与開始から試験終了まで週 1 回すべての生存動物の体重を測定した。

次表にみられるように、雄の 10ppm 群で投与終了時に対照群に比し統計学的有意な低体重を示したが、用量に依存しておらず、投与との関連性はなかった。一方、雌では 1250ppm 群で投与期間中の体重増加量が統計学的有意に減少した。

表. 体重及び体重増加量

性 別	雄				雌			
	10	50	250	1250	10	50	250	1250
投与量(ppm)								
体重 24 週	↓91							
体重増加量 0～24 週								↓86

↓↑ : p<0.05、↓↑ : p<0.01 (Student t 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

摂餌量：投与期間中、3～4日毎に測定した。

雄で投与期間中の摂餌量で統計学的有意な減少がみられたが、用量に依存した変動ではなく投与に関連性しないものと考えられた。

表. 摂餌量

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	10	50	250	1250	10	50	250	1250
1～24週		↓91	↓92		↓93				

↓↑ : p<0.05、◆◆ : p<0.01 (Student t 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

血液学的検査：投与前、投与後4、8、12及び23週時に各群雌雄5匹ずつを対象として、以下の項目について測定した。

赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、網状赤血球数 (Retic)、白血球数 (WBC)、白血球百分率

統計学的に有意な変動を示した項目について次表に示した。

表. 血液学的検査結果

性別	投与量 (ppm)	雄				雌			
		10	50	250	1250	10	50	250	1250
RBC	8週								↓85
	12週								◆84
	23週		◆89	◆87	↓91		◆89	◆90	◆88
Hb	12週			◆89					
Ht	12週		↓84						
Retic	12週								↓53
WBC	8週				◆136				

↓↑ : p<0.05、◆◆ : p<0.01 (Student t 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

雌の1250ppm群で8及び12週時にRBCの減少が認められた。

23週時には雌雄の50ppm以上の投与群で統計学的有意なRBCの減少をみたが、用量に依存した変動ではないことから検体投与との関連は明らかではなかった。

その他の項目での変動は一過性であるか、用量に依存したものではないことから投与との関連はないと考えられた。

臓器重量：試験終了時の全生存動物を対象として、剖検後に以下の臓器について重量を測定した。また、対体重比を算出した

肝、腎、心、脾及び胸腺

統計学的有意な変動を示した項目について次表に示した。

表. 臓器重量

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		10	50	250	1250	10	50	250	1250
最終体重		(91)			(94)	(96)			(91)
肝臓	実重量	↓86				↓84			
	対体重比					↓88			
腎臓	実重量				↓88				

↓↑ : p<0.05、↓↑ : p<0.01 (Student t 検定)

()は参考値 (有意差なし)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

検体投与に関連した変動はいずれの臓器についても認められなかった。

統計学的有意な変動が散見されたが、いずれも対照群と比して低体重であったことによるものと考えられた。

肉眼的病理検査：試験終了時の全生存動物を対象として剖検を行った。

各投与群とも検体投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

病理組織学的検査：試験終了時の生存動物のうち対照群と 1250ppm 群の雌雄各 5 匹を対象とし、以下の組織について病理組織標本を作製し、検鏡した。

肝臓、腎臓、心臓、胸腺、リンパ節、骨髄、脾臓

検体投与の影響と考えられる所見は認められなかった。

以上の結果から、検体のラットに対する 24 週間にわたる混餌投与により、1250ppm で雌における体重増加抑制、赤血球数の減少がみられた。よって本試験での無毒性量は雄で 1250ppm (125mg/kg/日相当)、雌で 250ppm (25mg/kg/日相当) と考えられた。

IX. 動植物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験 種類	供試 動植物	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁																														
1	動物 代謝	ラット 雄 5、 雌 5 頭	<p>^{14}C-標識フェン メチアム</p> <p>単回経口投 与：20mg/kg 体重 実験期間：96 時間 尿、糞、呼気 排泄量。臓器 残留量。代謝 物同定。</p>	<p>尿が主な排泄経路であり、57- 74%が尿へ排泄された。CO₂は殆 ど認められなかった。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">排泄%</th> </tr> <tr> <th></th> <th colspan="2">♂</th> <th colspan="2">♀</th> </tr> <tr> <th></th> <th>尿</th> <th>糞</th> <th>CO₂</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>74</td> <td>74</td> <td>60</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td></td> <td>12</td> <td>13</td> <td>29</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td></td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND-0.04</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>標識では 96 時間後の 臓器で放射能が殆ど認められ ず、 標識では血 液、腎臓、肺などで認められた。 尿中の主な代謝物は で あった。糞中には 及びそ の他に少量代謝物が認められ た。 排泄、臓器分布、代謝に性差は 認められなかった。</p>	排泄%						♂		♀			尿	糞	CO ₂			74	74	60	57		12	13	29	30		ND	ND	ND-0.04		1989 年 GLP	代 -10
排泄%																																				
	♂		♀																																	
	尿	糞	CO ₂																																	
	74	74	60	57																																
	12	13	29	30																																
	ND	ND	ND-0.04																																	

資料 No.	試験 種類	供試 動植物	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁																
2	動物 代謝	ラット 各群 雄5、雌 5頭	¹⁴ C 標識フェンメ ディファム 単回経口投 与 : 20、 1000mg/kg 体 重 反復経口投 与 : 20mg/kg 体重 実験期間 : 90%が排泄さ れるまで (30 ~96 時間)	排泄 : 低用量では尿と糞でほぼ 等しい排泄量であった。 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>低単 回</th> <th>高単 回</th> <th>低反 復</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>尿</td> <td>48-54 %</td> <td>8-13%</td> <td>46-49 %</td> </tr> <tr> <td>糞</td> <td>40-42 %</td> <td>82-92 %</td> <td>40-44 %</td> </tr> <tr> <td>組織 臓器</td> <td>2%</td> <td>0.1-0 .6%</td> <td>1-3%</td> </tr> </tbody> </table> 放射能残留は胃腸管、カーカス で比較的多く、そのほかに肝臓、 腎臓、肺等でも放射能が認めら れた。 尿の主要代謝物は 標識 で、 標識で少量の が 認められた。低用量及び反復投 与において と考え られた。糞中の放射能はほとん どがフェンメディファムであつ た。反復投与、性による影響は 認められなかった。		低単 回	高単 回	低反 復	尿	48-54 %	8-13%	46-49 %	糞	40-42 %	82-92 %	40-44 %	組織 臓器	2%	0.1-0 .6%	1-3%	/1994 年 /GLP	代 -16
	低単 回	高単 回	低反 復																			
尿	48-54 %	8-13%	46-49 %																			
糞	40-42 %	82-92 %	40-44 %																			
組織 臓器	2%	0.1-0 .6%	1-3%																			

資料 No.	試験 種類	供試 動植物	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁
3	植物 代謝	てんさい	¹⁴ C 標識フェンメ ディファム 葉部表面処理 約 2.5μg a. i. /植物体	経時試験： メタノールによる 表面洗浄液中の放射エネルギーは 12 時 間後が 72.5% (処理放射エネルギーに 対する%、以下同じ) で最大と なり、以後減少して 60 日後には 2.0%であった。これに伴い、水 層の放射エネルギーが次第に増加して、 60 日後には 70.5%となった。ク ロロホルム層は 4 日後が最大で 49.6%であった。クロロホルム 層中には主にフェンメディファム が認められた。	/1983 年	代 -30
13	植物 代謝	てんさい	¹⁴ C 標識 フェンメディファム 1044.4g a. s. /ha で 1 回散布	親化合物フェンメディファムが 主要な残留物であり、生育期の 茎葉で 83.5%収穫期の茎葉で 23.7%であった。少量代謝物と して生育期の茎葉では が認められ、 収穫期の茎葉では が認められた。 収穫期の根部では親化合物及び 上記同定代謝物は認められな かった。	/2014 年 /GLP	代 -37- 1

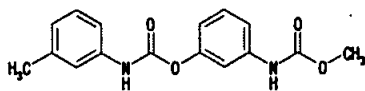
資料 No.	試験 種類	供試 動植物	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載 頁
14	植物 代謝	てんさい	¹⁴ C 標識フェンメディファム 1068.8g a. s. /ha で 1 回散布	親化合物フェンメディファムが 主要な残留物であり、生育期の 茎葉では 76.2%、収穫期の茎葉 で 41.6%、収穫期の根部で 4.6% であった。少量代謝物として生 育期の茎葉では が認められ、収 穫期の茎葉では が、収穫期の根 部では が認められた。 未同定代謝物として極性放射能 が収穫期茎葉で 10.2% (0.062 mg/kg)、収穫期根部で 32.1% (0.024 mg/kg) 認められた。こ の画分は糖と挙動が類似してお り、生体成分への取り込みの可 能性が示唆された。その他の未 同定代謝物は最大でも TRR の 1.4%未満であった。 は認められなかった。	/2014 年 /GLP	代 -37- 9

資料 No.	試験種類	供試動植物	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
4	植物代謝	いちご	¹⁴ C 標識 フェンメディファム 最大処理量である 941g ai/ha で、花序出現前のいちごへ散布処理。49 日後に果実を採取	いちご果実の TRR は 0.081 mg/kg であった。約 85%TRR が抽出され、フェンメディファムが 51%TRR (0.04 mg/kg)、 が 10.6% TRR (0.0086 mg/kg)、 が 1.9%TRR (0.0015 mg/kg) 認められた。	/2004 年 /GLP	代 -38
5	好気及び嫌気土壌代謝	ドイツ標準土壌 2.2	¹⁴ C 標識 フェンメディファム、 処理量： 2.2mg/kg 土壌、 好気/好気→嫌気/滅菌、22 ±2°C、最大容水量の 45%	好気土壌：フェンメディファムは処理 11 日後には 53.4%、32 日後には 20.2%に減少した。主要代謝物は (10.1%、20 日後) であり、その後急速に分解した。 嫌気土壌：嫌気条件においてもフェンメディファムは速やかに分解した。の分解は緩やかであった。 滅菌土壌：フェンメディファムの分解は非滅菌土壌と比較して有意に遅かった。が主代謝物であった。フェンメディファムの DT50 は好気 12.5 日、嫌気 11.8 日、滅菌 53.8 日であった。	/1991 年 /GLP	代 -40
6	加水	緩衝液 (pH4、5、7、9)	¹⁴ C 標識 フェンメディファム 処理濃度： 3mg/L 25 ±1°C	アルカリ性ほど速やかに分解し、DT50 は次の通りであった。 pH4：259 日、pH5：47 日、pH7：12 時間、pH9：7 分。分解物として MHPC[M1]が認められた。	/2003 年 /GLP	代 -48

資料 No.	試験種類	供試動植物	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁									
7	光 pH4 緩衝液	緩衝液 pH4	非標識フェンメディファム 処理濃度： 3.99 mg/L 22.9±1.5℃、 63.6 W / m ² (290 ~ 400nm)	pH4 緩衝液中 17.7 日 (東京春換算 144.7 日相当) 連続で光分解試験を実施したが、フェンメディファムの残存率は 99.2%で、分解しなかった。	/1992 年 /GLP	代 -52									
8	光 自然水	滅菌自然水 (池水) pH8.1	¹⁴ C 標識フェンメディファム 処理濃度： 1.14mg/L 410 W/m ² (290 ~800nm) 25±2℃ pH8.1	フェンメディファム及び主代謝物 MHPC の DT50 は次の通り。 <table border="1" data-bbox="726 811 1093 1054"> <tr> <td></td> <td>実験条件下</td> <td>東京、春</td> </tr> <tr> <td>フェンメディファム</td> <td>0.23 日</td> <td>1.36 日</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> は速やかに多数の極性物質に分解した。		実験条件下	東京、春	フェンメディファム	0.23 日	1.36 日				/2004 年 /GLP	代 -54
	実験条件下	東京、春													
フェンメディファム	0.23 日	1.36 日													
9	光 自然水		上記試験の極性物質の特性付け	高極性代謝物の同定はできなかった。	/2006 年 /GLP	代 -60									
10	土壌 吸着	4 種土壌	¹⁴ C 標識フェンメディファム 20±2℃ 土壌及び水相のフェンメディファム量を測定。	K ^{nds} F _{oc} : 1375, 918, 1617, 1534 Hoefchen am Hohenseh 土壌では分解を抑えるため、HgCl ₂ を添加して実施した。	/ 2010 年 /GLP	代 -62									

資料 No.	試験種類	供試動植物	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁												
11.	生物濃縮性	ブルーギル	¹⁴ C 標識体を用いた。 10 日間暴露、 6 日間排泄	設定濃度 0.03mg/L 両標識体での平均 BCF _{ss} <table border="1"> <thead> <tr> <th>内臓</th> <th>筋肉</th> <th>カーカス</th> <th>魚体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1518</td> <td>14</td> <td>43</td> <td>165</td> </tr> </tbody> </table>	内臓	筋肉	カーカス	魚体	1518	14	43	165	/1988 年 /GLP	代 -66				
内臓	筋肉	カーカス	魚体															
1518	14	43	165															
12	生物濃縮性	ニジマス	¹⁴ C 標識体を用いた。 64 時間暴露、 128 時間排泄	設定濃度 0.02(低), 0.2(高)mg/L BCF _{ss} <table border="1"> <thead> <tr> <th>試験区</th> <th>可食</th> <th>非可食</th> <th>全魚体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>低濃度</td> <td>185</td> <td>394</td> <td>321</td> </tr> <tr> <td>高濃度</td> <td>78</td> <td>157</td> <td>121</td> </tr> </tbody> </table>	試験区	可食	非可食	全魚体	低濃度	185	394	321	高濃度	78	157	121	/1990 年 /GLP	代 -70
試験区	可食	非可食	全魚体															
低濃度	185	394	321															
高濃度	78	157	121															

<代謝分解物一覧表>

記号	由来	名称 (略称)	化学名	構造式
I	親化合物	フェンチピラム、 PMP、 AE B038584	3-メトキシカルボニルアミノ フェニル-N-(3'-メチルフェニ ル)カーバメート	

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

記号	由来	名称 (略称)	化学名	構造式

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

1. 動物体内運命に関する試験

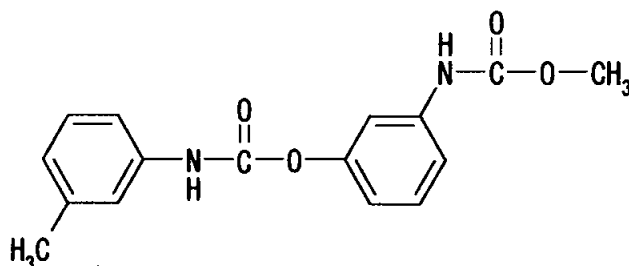
(1) ^{14}C -標識フェンメディファムを用いたラットにおける代謝試験 (資料: 代謝1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

供試標識化合物: ^{14}C 標識フェンメディファム



^{14}C 標識位置:

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

	標識	標識
比放射能		
放射化学的純度		

供試動物: Sprague Dawley (CD) ラット 雄 146-171g、雌 134-148g

【方法】

^{14}C 標識フェンメディファムと非標識フェンメディファムをポリエチレングリコール中に懸濁し、4mg/mL 濃度の投与液を調製し、体重 200g あたり 1 mL を単回経口投与した (20mg/kg 体重)。

試験群及び用量設定

投与回数 及び経路	用量 (mg/kg 体重)	標識位置	実験 期間	供試動物数
単回経口投与	20		96 時間 (4 日間)	各群 雄 5 匹、雌 5 匹

採取試料：尿及び糞は実験終了時まで24時間ごとに採取した。尿、糞の採取時にケージを洗浄し、洗浄液を採取した。呼気の二酸化炭素捕集液は24時間で採取した。肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、筋肉、生殖器、甲状腺、眼、副腎、骨、腎脂肪、下垂体、血液及び血漿、カーカス試料を4日後に採取した。

放射エネルギーの測定：尿、ケージ洗浄液、血漿、呼気の二酸化炭素捕集液は直接シンチレーション液に添加して、骨、血液は、燃焼後シンチレーション液に捕集して、下垂体、甲状腺、副腎、眼、筋肉、脂肪は溶解後、その他の組織及び糞は水中で均質化して溶解後、液体シンチレーション計測器を用いて放射エネルギーを測定した。

代謝物の測定：尿及び糞はpH5の0.2M酢酸緩衝液中で、*Helix pomatia*由来の消化液を添加して、37°Cで一晩インキュベーションし、C₁₈カラムで精製後あるいは直接、溶媒系の異なる2種のTLCまたはHPLCを用いて測定した。

【結果】

(1) 吸収及び排泄 (表1)

フェンメディファムを経口投与したラットにおける排泄は速やかで、投与24時間以内に大部分が排泄された。

標識において主排泄経路は尿で、投与96時間後までに、尿へ74.04% (雄) 及び73.57% (雌) が排泄された。糞中の放射エネルギーは12.3% (雄) 及び12.84% (雌) であった。呼気中の放射エネルギーは認められなかった。カーカスへは0.37% (雄)、0.81% (雌) が残存した。吸収量は尿への排泄率より最低約74%であると考えられた。

標識においても主排泄経路は尿で、投与96時間後までに59.75% (雄) 及び56.82% (雌) が排泄された。糞中の放射エネルギーは28.74% (雄)、30.19% (雌) であった。CO₂への排泄はごく少なく、0.02% (雄)、0.04% (雌) であった。カーカスの放射エネルギーは約4%であった。標識と比較すると尿への排泄量はやや少なく、糞への排泄量及びカーカスへの残留量はより多かった。

全群で総回収率は90%以上であった。排泄経路及び排泄量に性差は認められなかった。

表1 フェンメディファムを経口投与したラットにおける排泄割合（投与量に対する％）

		標識		標識	
		雄	雌	雄	雌
尿	24hr	72.3	71.27	55.3	51.25
	48hr	1.16	1.42	2.3	3.03
	72hr	0.35	0.64	1.3	1.59
	96hr	0.25	0.23	0.85	0.94
	計	74.04	73.57	59.75	56.82
糞	24hr	11.77	11.89	27.75	28.13
	48hr	0.42	0.74	0.67	1.56
	72hr	0.06	0.11	0.18	0.3
	96hr	0.05	0.1	0.14	0.21
	計	12.3	12.84	28.74	30.19
ケージ洗浄液	24hr	3.96	3.82	2.4	2.6
	96hr	0.19	0.37	0.31	0.34
	計	4.14	4.19	2.7	2.94
CO ₂	24hr (1)*	ND	ND	0.02	0.04
	24hr (2)*	ND	ND	ND	ND
カーカス		0.37	0.81	3.59	4.07
合計		90.87	91.41	94.81	94.07

*CO₂ 捕集管を直列に2個接続して捕集（申請者注）

(2) 分布（表2）

標識における96時間後の各臓器の残留量は低く、カーカス（雄 0.07mg/kg、雌 0.17mg/kg）を除いて、その他の臓器・組織では検出限界未満であった。

標識の臓器における残留も全体的に低かったが、血漿（雄 2.92mg/kg、雌 3.36mg/kg）、血液（雄 2.88mg/kg、雌 2.64mg/kg）、その他の臓器の残留量は腎臓（雌 1.25mg/kg）、肺（雄 1.06mg/kg、雌 1.24mg/kg）、卵巣（1.15mg/kg）、甲状腺（雄 1.07mg/kg、雌 1.48mg/kg）等であった。

性別の違いによる明らかな分布の違いは認められなかった。

表2 ラットにおける各臓器・組織への放射能分布・残留量 (mg/kg) ; 投与 96 時間後

	標識		標識	
	雄	雌	雄	雌
副腎	ND	ND	0.75	0.64
血液	ND	ND	2.88	2.64
骨	ND	ND	0.58	0.52
脳	ND	ND	0.12	0.12
カーカス	0.07	0.17	0.73	0.84
眼	ND	ND	0.35	0.31
心臓	ND	ND	0.75	0.87
腎臓	ND	ND	0.89	1.25
肝臓	ND	ND	0.43	0.48
肺	ND	ND	1.06	1.24
筋肉	ND	ND	0.42	0.46
卵巣	-	ND	-	1.15
下垂体	ND	ND	0.65	0.73
血漿	ND	ND	2.92	3.36
腎脂肪	ND	ND	0.48	0.52
脾臓	ND	ND	0.47	0.58
精巣	ND	-	0.44	-
甲状腺	ND	ND	1.07	1.48

(3) 代謝物 (表3)

標識:

酵素分解後の尿試料の HPLC 測定において、主代謝物として が認められ、尿中放射能量の であった。その他には が認められた。

糞抽出試料の酵素分解後の TLC 分析において、 が主代謝物として認められた。HPLC による定量は放射能量が少なく不可能であった。

標識：

酵素分解した尿を HPLC を用いて分析したところ、主要代謝物として

が認められた。その他に 10%未満

の代謝物として

が認められた。

酵素分解後の糞抽出物を HPLC を用いて測定したが、供雑物が多くかつ放射エネルギーが低い
ため定量は出来なかった。クロマトグラムから が主な代謝物として
確認され、少量ながらその他の化合物も認められた。

以上のことから、フェンメディファム [I] のラットにおける推定代謝経路を図 1 に示した。
分子中央のカーバメート結合が酸化/加水分解し、 が生成する。
は比較的安定で、抱合体となり尿及び糞の両方から速やかに排泄される。少量の
は更に代謝され、 が生成する。 は 3 種の異なった経路を経て速やかに代謝され、芳香環の水酸化により
、アミノ基のアセチル化により が生成する。
、メチル基の酸化により
更に または へと代謝され
主に尿から排泄される。一部は更に へと代謝され、排泄される。

表 3 ラット尿の酵素分解後における代謝物 (標識) (%TRR)

雄	96.7	2.6	1.6
雌	95.2	3.2	1.6

表 4 ラット尿の酵素分解後における代謝物 (標識) (%TRR)

							未同定
雄 ^a	11.7	38.9	25.2	6.6	3.7	2.0	12.1
雌	8.7	36.5	26.3	7.4	5.1	1.4	17.5

注： 報告書には各動物ごとの値が記載されているが、抄録中には平均値として記載した。

a： 雄の平均値及び範囲の算出から動物番号 3AH1 の動物を除いた。申請者計算。

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

図 フェンメディファムのラットにおける推定代謝経路

代-15

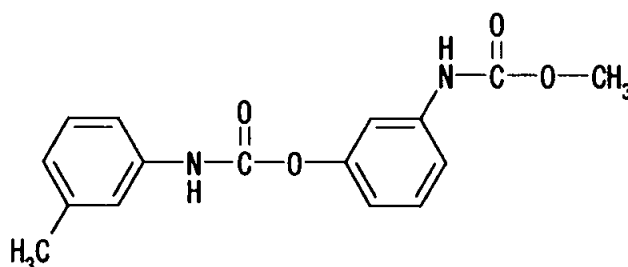
(2) ^{14}C -標識フェンメディファムを用いたラットにおける代謝試験 (資料：代謝2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

供試標識化合物： ^{14}C 標識フェンメディファム



^{14}C 標識位置：

化学名：3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能		
放射化学的純度		

供試動物：Sprague Dawley (CD) ラット 6-10 週令 180-240g

【方法】

ラット雄雌各 5 頭へ低用量 (20mg/kg 体重) または高用量 (1000mg/kg 体重) の単回経口投与、または低用量反復経口投与 (14 日間非標識+15 日目標識) を行い、投与量の 90% が排泄されるまで実験を行った。

表 1 試験群の設定

	投与回数 及び経路	用量 (mg/kg 体重)	標識位置	実験 期間	供試 動物数
1 群	単回経口投与	20		30 時間	各群 雄 5 匹 雌 5 匹
2 群		1000		96 時間	
3 群				96 時間	
4 群	反復経口投与 ¹⁾	20		30 時間	
5 群				96 時間	

1)： 14 日間非標識フェンメディファム、15 日目標識フェンメディファム、毎日 1 回投与

投与薬液： 所定量の比放射能濃度となるよう標識フェンメディファムと非標識フェンメディファムを混合し、ラット体重 200g あたり低用量ではフェンメディファム 0.5g、高用量では 2g を 1%トラガカントゴム溶液に懸濁して投与薬液を調製した。

採取試料及び分析：

各群とも尿、糞、血液、肝臓、腎臓、脾臓、脳、肺、甲状腺、眼、副腎、下垂体、生殖腺（精巣又は子宮）、心臓、胃腸管、筋肉、腎脂肪、骨、皮膚、カーカス、ケージ洗浄液の試料を採取した。

表 2 採取試料及び時間

採取試料	採取時間	群
尿	0-6、6-24、24-30 時間	20mg/kg 単回及び反復
	0-6、6-24、24 時間以降は実験終了まで 24 時間間隔	1000mg/kg 単回
糞	実験終了まで 24 時間間隔	全群
組織・臓器、ケージ洗浄液	実験終了時	全群

放射能量の測定：

カーカス、皮膚、腎臓、筋肉、脂肪、脳、肺、精巣、卵巣、心臓、子宮、副腎、甲状腺、眼は可溶化後、肝臓、脾臓、胃腸管、骨、全血、糞の抽出残渣は燃焼後、血漿、糞のアセトン抽出液、尿は水を用いて定容後に液体シンチレーションカウンタを用いて放射能量を検出した。

代謝物の測定：

尿及び糞抽出液について HPLC 及び 2 種の TLC を用いて代謝物の分析を行った。尿については更に β -グルクロニダーゼを用いた分解後に TLC 及び HPLC を用いて分析した。TLC 上の放射能量はオートラジオグラム又はリニアアナライザーを用いて、HPLC では放射能検出器を用いて放射能量を測定した。

酵素分解：

尿の一部を pH 5 に調整後、 β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ (Helix pomatia 由来) を添加して、37°C で 24 時間インキュベーションした。

その他サルファターゼ及び 2M 塩酸加水分解還流 1 時間を行い、代謝物の確認を行った。

表3 尿試料への酵素処理

供試酵素	投与群	標識位置	測定
β グルクロニダーゼ/サルファターゼ	全群		HPLC、TLC 2種
	全頭		
サルファターゼ	1000mg/kg、20mg/kg反復、各雄1頭、雌1頭		TLC 2種
2M 塩酸加水分解		(HPLC)	

【結果】

1. 吸収及び排泄

各群における経時的な排泄量、実験終了時のケージ洗浄液、組織への放射能残留量を表4に示した。

(1) 低用量 (20mg/kg 体重) 単回経口投与

実験終了時 (30 時間後) までに尿で 48.0% (雄) または 54.9% (雌) の放射能が認められ、糞では 39.8% (雄) または 42.4% (雌) が認められた。組織からは 2.1% (雄)、2.4% (雌) の放射能が認められ、尿及び組織残留量の合計から吸収率は雄雌それぞれ 50.1%、57.3% と考えられた。投与量の 92.1 または 101.3% を回収した。

(2) 高用量 (1000mg/kg 体重) 単回経口投与

標識では尿で 13.1% (雄) または 10.2% (雌)、糞では 81.7% (雄) または 85.6% (雌) が認められた。標識では尿 11.5% (雄)、8.2% (雌)、糞 88.2% (雄)、91.8% (雌) であった。48 時間以内に大部分の放射能が排泄された。組織からは 0.1~0.6% の放射能が認められ、吸収率は尿及び組織残留量の合計から 8.8%~13.2% であると考えられる。投与量に対する回収率は 95.3~100.7% であった。

(3) 低用量 (20mg/kg 体重) 反復経口投与

標識では尿 47.5% (雄)、49.1% (雌)、糞 40.8% (雄)、40.1% (雌) が認められた。標識では尿 45.7% (雄)、47.0% (雌)、糞 44.4% (雄)、41.2% (雌) が認められた。排泄量は単回低用量と類似していた。組織では 1.3% (雄)、3.4% (雌)、2.5% (雄)、3.4% (雌) が認められ、両標識とも雌の残留量が比較してわずかに多かった。吸収率は 48.2%~52.5% と考えられた。92.5~94.7% を回収した。

表4 ラット尿、糞、組織における放射能残留量 (投与量に対する%)

	20mg/kg 単回経口投与		1000mg/kg 単回経口投与				20mg/kg 反復経口投与			
	1群		2群		3群		4群		5群	
	標識		標識		標識		標識		標識	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿 0-6 hr	13.4	26.2	3.1	2.3	2.6	0.9	25.5	26.5	19.4	19.5
6-24 hr	33.3	38.2	7.4	6.0	6.9	4.4	21.2	20.5	22.7	22.1
24hr-実験終了まで ^A	1.3	1.0	2.6	1.9	2.1	2.8	0.8	2.0	3.6	5.4
小計	48.0	54.9	13.1	10.2	11.5	8.2	47.5	49.1	45.7	47.0
ケージ洗浄液	2.2	1.6	0.4	0.3	0.3	0.1	2.8	2.1	0.9	1.2
糞 0-24 hr	38.4	40.6	52.1	55.0	79.5	63.4	40.2	38.5	42.1	31.7
24 - (30) 48 hr ^B	1.4	1.8	19.4	29.8	8.5	27.5	0.6	1.5	2.0	8.9
48-96 hr	-	-	0.2	0.9	0.2	0.9	-	-	0.2	0.5
小計	39.8	42.4	81.7	85.6	88.2	91.8	40.8	40.1	44.4	41.2
組織	2.1	2.4	0.1	0.1	0.5	0.6	1.3	3.4	2.5	3.4
計	92.1	101.3	95.3	96.2	100.6	100.7	92.5	94.7	93.5	92.8

A: 実験終了は1群、4群では30hr、2群、3群、5群では96hr。

B: 糞1群は24-30hr。

2. 組織・臓器における放射能残留量及び分布

実験終了時における各組織・臓器への残留量を投与量に対する% (表5) 及び残留濃度 $\mu\text{g/g}$ (表6) で示した。放射能残留量が比較的多かったのは胃腸管、カーカスであり、そのほかに肝臓、腎臓、肺等でも放射能が認められた。

(1) 低用量単回投与： 実験終了時 (投与 30 時間後) における最も高い残留濃度は胃腸管 (雄 1.72% 4.575 $\mu\text{g/g}$ 、雌 1.791% 5.207 $\mu\text{g/g}$) であった。その他の主な残留濃度は肝臓 (雄 0.021% 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.022% 0.127 $\mu\text{g/g}$)、腎臓 (雄 0.006% 0.126 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.006% 0.14 $\mu\text{g/g}$)、肺 (雄 0.005% 0.199 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.003% 0.108 $\mu\text{g/g}$) であった。

(2) 高用量単回投与： 実験終了時 (投与 96 時間後) における主な残留濃度は、標識では肝臓 (雄 0.009% 1.621 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.005% 1.415 $\mu\text{g/g}$)、腎臓 (雄 0.001% 1.264 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.001% 1.02 $\mu\text{g/g}$)、肺 (雄 0.001% 1.214 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.001% 0.76 $\mu\text{g/g}$) であった。

標識では全ての組織・臓器で残留が認められ、特に血漿 (雄 23.616 $\mu\text{g/g}$ 、雌 41.02 $\mu\text{g/g}$)、全血 (雄 16.332 $\mu\text{g/g}$ 、雌 32.455 $\mu\text{g/g}$) の濃度が他の組織より高かった。そのほかの主な濃度は肺 (雄 0.006% 10.127 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.01% 15.756 $\mu\text{g/g}$)、皮膚 (雄 9.648 $\mu\text{g/g}$ 、雌 12.585 $\mu\text{g/g}$)、甲状腺 (雄 <0.001% 8.514 $\mu\text{g/g}$ 、雌 <0.001% 13.958 $\mu\text{g/g}$) であった。

標識の濃度が 標識における残留濃度より高く、
標識においては雄よりも雌の組織における残留量が高かった。

(3) 低用量反復投与： 標識の実験終了時 (最終投与 30 時間後) における残留濃度は肝臓 (雄 0.016% 0.076 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.028% 0.179 $\mu\text{g/g}$)、腎臓 (雄 0.004% 0.089 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.009% 0.234 $\mu\text{g/g}$)、肺 (雄 0.003% 0.098 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.003% 0.116 $\mu\text{g/g}$)、胃腸管 (雄 0.744% 2.002 $\mu\text{g/g}$ 、雌 2.756% 8.533 $\mu\text{g/g}$)、カーカス (雄 0.541% 0.131 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.729% 0.184 $\mu\text{g/g}$) であった。

標識の実験終了時 (最終投与 96 時間後) における主な残留濃度は血漿 (雄 2.803 $\mu\text{g/g}$ 、雌 4.353 $\mu\text{g/g}$)、全血 (雄 1.995 $\mu\text{g/g}$ 、雌 3.225 $\mu\text{g/g}$) が他の組織より高く、そのほかに肺 (雄 0.029% 1.144 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.043% 1.737 $\mu\text{g/g}$)、甲状腺 (雄 <0.001% 1.069 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.001% 1.864 $\mu\text{g/g}$)、下垂体 (雄 <0.001% 0.979 $\mu\text{g/g}$ 、雌 <0.001% 1.553 $\mu\text{g/g}$)、皮膚 (雄 0.979 $\mu\text{g/g}$ 、雌 1.143 $\mu\text{g/g}$)、心臓 (雄 0.016% 0.792 $\mu\text{g/g}$ 、雌 0.021% 1.192 $\mu\text{g/g}$) であった。 標識の残留濃度が高かった。

表5 ラットの各組織・臓器における放射能残留量（投与量に対する%）

	1群		2群		3群		4群		5群	
	20mg/kg 単回投与 30時間後		1000mg/kg 単回投与 96時間後		1000mg/kg 単回投与 96時間後		20mg/kg 反復投与 30時間後		20mg/kg 反復投与 96時間後	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
肝臓	0.021	0.022	0.009	0.005	0.021	0.025	0.016	0.028	0.101	0.115
腎臓	0.006	0.006	0.001	0.001	0.007	0.01	0.004	0.009	0.029	0.053
脾臓	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.01
脳	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.004	0.008
肺	0.005	0.003	0.001	0.001	0.006	0.01	0.003	0.003	0.029	0.043
甲状腺	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
眼	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.003
副腎	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
下垂体	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
卵巣	-	<0.001	-	<0.001	-	0.001	-	<0.001	-	0.003
精巣	0.001	-	<0.001	-	0.004	-	<0.001	-	0.021	-
心臓	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.004	<0.001	0.001	0.016	0.021
胃腸管	1.72	1.791	0.006	0.005	0.024	0.033	0.744	2.756	0.101	0.167
カーカス	0.369	0.625	0.065	0.060	0.512	0.586	0.541	0.729	2.065	2.899

表6 ラットの各組織・臓器における放射能残留濃度 (µg/g)

	20mg/kg 単回 30 時間後		1000mg/kg 単回 96 時間後		1000mg/kg 単回 96 時間後		20mg/kg 反復 30 時間後		20mg/kg 反復 96 時間後	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
肝臓	0.100	0.127	1.621	1.415	3.331	5.078	0.076	0.179	0.404	0.559
腎臓	0.126	0.140	1.264	1.020	6.334	11.519	0.089	0.234	0.655	1.268
筋肉	<0.008	0.009	0.111	0.097	3.129	3.730	<0.011	0.012	0.272	0.388
脂肪	0.009	0.008	0.114	0.095	1.518	2.722	<0.012	0.015	0.153	0.285
脾臓	0.010	0.013	0.168	0.204	4.113	6.219	0.011	0.020	0.465	0.821
脳	<0.008	<0.008	<0.085	<0.085	1.033	1.277	<0.011	<0.012	0.089	0.160
肺	0.199	0.108	1.214	0.760	10.127	15.756	0.098	0.116	1.144	1.737
甲状腺	<0.223	<0.224	<3.239	<3.442	8.514	13.958	<0.448	<0.515	1.069	1.864
眼	<0.006	0.007	0.066	0.058	1.873	4.252	<0.008	0.010	0.324	0.406
副腎	0.065	0.070	0.675	0.582	5.784	8.632	<0.074	0.095	0.574	0.879
下垂体	<0.369	<0.378	<5.065	<3.193	8.005	11.508	<0.619	<0.425	0.979	1.553
子宮	-	0.022	-	0.202	-	13.617	-	0.036	-	1.336
精巣	0.008	-	0.092	-	2.975	-	<0.011	-	0.350	-
骨	0.012	0.014	0.154	0.126	1.645	2.235	0.039	0.964	0.267	0.262
心臓	0.012	0.013	0.230	0.175	7.256	9.561	<0.011	0.018	0.792	1.192
皮膚	0.045	0.119	0.483	0.668	9.648	12.585	0.062	0.067	0.979	1.143
胃腸管	4.575	5.207	0.666	0.715	2.223	3.307	2.002	8.533	0.233	0.380
全血	0.026	0.029	0.555	0.355	16.332	32.455	0.022	0.044	1.995	3.225
血漿	0.030	0.032	0.382	0.286	23.616	41.020	0.022	0.056	2.803	4.353
カーカス	0.094	0.156	0.730	0.780	5.02	6.722	0.131	0.184	0.479	0.683

3. 尿中の代謝物

(1) 標識における尿中代謝物 (表 7 及び表 8) :

尿を HPLC 及び TLC 2 種を用いて分析した。原尿の主要代謝物画分は極性物質画分 2 種であり、1 種は 等を含む画分が低用量で 16.9~25.3%、高用量で 6.3~14.6%、反復投与で 21.7~49.4%であった。もう 1 種は を含む極性物質画分が認められ、低用量で 6.6~23.8%、高用量で 6.3~14.6%、反復投与で 3.2~11.5%であった。その他に が低用量で 1.4~6.9%、高用量で 0.2~0.9%、反復投与で 1.1~3.7%認められた。未変化のフェンメディファム [I] は認められなかった。代謝物のパターンは低用量、高用量、低用量反復の 3 種の投与量で類似していた。

β グルクロニダーゼを用いて尿試料を加水分解すると、2 種の極性画分が減少し、が増加した。この抱合体の性状を確認するためサルファターゼを用いて尿を処理すると、 β グルクロニダーゼ処理後ほど大きくはないが が増加した。この 2 種の酵素による増加比率から、低用量及び反復投与において の抱合体の約 40%が硫酸抱合体として存在し、残り 60%がグルクロン酸抱合体であると考えられた。高用量では抱合体の大部分が硫酸抱合体として存在した。

以上のことから、[^{-14}C]フェンメディファムを投与した動物の主要尿代謝物は のグルクロン酸抱合体 及び硫酸抱合体 で、投与量の約 30~40%であった。

(2) 標識における尿中代謝物 (表 9 及び表 10) :

標識の尿では 5 種の代謝物が認められた。 が高用量で 0.1~2.7%、低用量反復で 3.6~11.0%、 が高用量で 0.4~1.8%、低用量反復で 2.8~7.5%、 が高用量で 0.2~0.9%、低用量反復で 0.8~3.3%、 が高用量で 0.2~0.6%、低用量反復で約 1.0%、 が高用量で 0.5~1.1%、低用量反復で 0.7~2.1%認められた。2.7%を超える成分はなかった。 β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ処理よっては代謝物組成に変化は認められなかった。2M 塩酸を用いて加水分解すると極性放射能の比率が減少し、より極性の少ない成分、が増加した。 β -グルクロニダーゼ/サルファターゼでは分解しない抱合体の可能性が考えられた。

4. 糞中の代謝物

標識における糞抽出液中の主要残留物は未変化のフェンメディファム [I] であった。低用量単回の雄で 25.7~45.0%、雌で 32.6~41.6%が認められ、高用量で 66.3~83.5%、低用量反復で 14.0~49.8%認められた。その他に が低用量単回の雄で約 1%、高用量で 0.4~3.0%、低用量反復では約 2%未満認められた。

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

標識における糞抽出物中も、主要残留物としてフェンメディファム[I]が認められ、高用量で74.6～85.6%、低用量反復で10.6%～28.6%であった。残りの放射能成分は少量で、2～1%未満であった。

糞中の放射能はほぼ吸収されなかった親化合物であることが確認された。

表 7 標識におけるラット尿代謝物、原尿及びβグルコニダーゼ処理後（投与量に対する%）

	20mg/kg 体重 単回投与				1000mg/kg 体重 単回投与				20mg/kg 体重 反復投与			
	原尿		β-グルコニダーゼ 処理後		原尿		β-グルコニダーゼ 処理後		原尿		β-グルコニダーゼ 処理後	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	1.4-6.9		25.8-46.7		0.2-0.9		1.4-3.2		1.1-5.0		19.5-47.7	
	(3.8)	(2.3)	(33.0)	(38.1)	(0.4)	(0.4)	(2.0)	(2.1)	(2.8)	(2.5)	(27.6)	(30.4)
									(11.5)	(ND)		
	16.9-25.3 ^a		2.0-9.9		0.5-3.1		0.7-3.2		21.7-49.4		4.5-11.8	
	(22.7) ^a	(20.9) ^a	(4.3)	(4.8)	(1.5)	(1.9)	(2.1)	(1.1)	(26.9)	(31.5)	(8.5)	(7.1)
	6.6-23.8 ^a		2.7-6.1				0.1-0.4		3.2-11.5 ^a		1.6-4.9	
	(10.0) ^a	(18.1) ^a	(4.9)	(3.8)			(0.2)	(0.2)	(5.5) ^a	(7.4)	(4.2)	(3.7)
Rt2-4 (システム2)	(10.3)	(9.9)	(2.0)	(1.6)					(3.7)	(5.4)		
Rt3-5 (システム1)					(10.5)	(7.1)						
その他	(2.3)	(2.4)	(4.9)	(6.5)	(0.8)	(0.5)	(0.4)	(0.3)	(18.7)	(7.7)	(4.0)	(5.4)
合計	48.1	54.7	48.1	54.9	13.1	10.2	13.2	10.1	47.6	49.0	47.5	49.0

注： 上段は両性での最小値-最大値の範囲、下段は（）内に申請者が計算した性別平均値を示した。

a: クロマト上で分画できていない個体の数値は平均値及び最小-最大値に含めていない。

表 8 標識におけるラット尿のサルファターゼ処理後の代謝物分布（投与量に対する%）

	20mg/kg 体重 単回投与		1000mg/kg 体重 単回投与		20mg/kg 体重 反復投与	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	13.9	11.2	2.2	2.1	14.0	10.8
原点	32.9	42.6	10.4	7.6	32.5	36.8
その他	1.2	1.1	0.6	0.5	1.0	1.4
合計	48.1	54.9	13.1	10.2	47.5	49.1

表 9 標識におけるラット尿代謝物、原尿及びグルクロニダーゼ分解後（投与量に対する％）

	1000mg/kg 体重 単回投与				20mg/kg 体重 反復投与			
	原尿		β-グルクロニダーゼ 処理後		原尿		β-グルクロニダーゼ 処理後	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	0.5-1.1		0.3-0.9		0.7-2.1		1.0-4.0	
	(0.9)	(0.8)	(0.6)	(0.6)	(1.5)	(1.5)	(2.2)	(2.7)
	0.2-0.9		0.4-1.1		0.8-3.5		1.2-2.8	
	(0.6)	(0.4)	(0.6)	(0.6)	(1.7)	(2.4)	(2.2)	(1.9)
	0.1-2.7		0.9-2.7		3.6-11.0		3.8-13.4	
	(2.0)	(0.9)	(2.2)	(1.3)	(6.0)	(8.3)	(7.8)	(8.5)
	0.2-0.6		0.4-1.0		0.8-1.3		1.8-2.8	
	(0.5)	(0.3)	(0.7)	(0.7)	(1.0)	(0.3)	(2.1)	(2.4)
	0.4-1.8		0.4-1.1		2.8-7.5		3.5-5.0	
	(1.3)	(1.0)	(0.9)	(0.6)	(4.6)	(6.1)	(4.3)	(4.3)
極性物質	(5.5)	(4.1)	(5.3)	(3.2)	(24.5)	(21.3)	(21.2)	(19.9)
その他	(0.7)	(0.7)	(0.9)	(0.7)	(7.1)	(7.2)		
合計	11.5	8.2	11.5	8.2	45.7	47.0	45.7	46.9

報告書中には各代謝物の値について、個別動物についての値のみが記載されているが、この表には（）内に平均値も記載した。申請者計算。

報告書：Table LII, LV, LXXI, LXXIV

表 10 ラット尿代謝物 (標識) : 原尿、サルファターゼ処理後、酸分解後による代謝物の比較 (投与量に対する%)

	Rt	1000mg/kg 体重 単回投与						20mg/kg 体重 反復投与					
		雄 No. 21			雌 No. 26			雄 No. 44			雌 No. 46		
		原尿	サルファターゼ ^a	酸分解 ^b	原尿	サルファターゼ ^a	酸分解 ^b	原尿	サルファターゼ ^a	酸分解 ^b	原尿	サルファターゼ ^a	酸分解 ^b
-	33-37	NR	NR	1.1	NR	NR	0.6	NR	NR	1.9	NR	NR	NR
	30-33	NR	NR	2.4	NR	NR	1.5	NR	NR	6.1	NR	NR	9.3
	28-30	0.5	0.4	1.5	NR	0.5	1.6	2.0	1.6	9.1	1.3	1.7	6.5
	26-28	0.4	0.5	0.8	0.5	0.6		2.2	2.7		2.2	1.5	
	24-26	0.4	0.3	0.4	0.8	0.4	0.6	2.2	1.5	1.9	1.5	1.5	6.5
	14-17	2.6	2.5	0.2	1.5	1.4	NR	6.6	5.3	2.0	8.0	7.9	NR
	10-12	0.6	0.5	2.4	0.5	0.4	1.1	1.0	NR	NR	2.1	2.3	5.9
	5-7	1.2		1.3	0.6	0.6	0.9	5.4	1.2	9.6	3.6	2.9	4.4
極性物質	3-5	5.6	6.6	0.7	3.4	3.2	0.6	20.9	25.6	6.5	20.4	21.2	3.1
その他		0.8	1.3	1.2	1.0	1.0	1.3	1.9	4.3	5.3	2.8	2.8	6.4
合計		12.1	12.1	12.0	8.3	8.2	8.2	42.2	42.2	42.4	41.9	41.8	42.1

a サルファターゼ処理 37°C 1時間

b 2M 塩酸 1時間

表 11 ラット糞代謝物 (標識) (投与量に対する%)

	20mg/kg 体重 単回		1000mg/kg 体重 単回		20mg/kg 体重 反復	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
フェンメデイファム [I]	25.7-45.0		66.3-83.5		14.0-49.8	
	31.9	36.8	73.7	80.2	34.7	33.2
	0.2-0.9		ND-3.0		0.3-1.4a	
	0.6	0.3	0.7	1.9	0.7	0.8
	ND-1.1		ND-0.6		ND-0.4a	
その他	3.5	2.7	2.3	2.4	2.1	2.8
合計	36.2	40.0	76.8	83.7	37.8	37.5
抽出残渣	3.6	2.4	4.8	2.0	3.0	2.6

a: 分離していない雌 40 番を除いた。

表 12 ラット糞代謝物 (標識) (投与量に対する%)

	1000mg/kg 体重 単回投与		20mg/kg 体重 反復投与	
	雄	雌	雄	雌
フェンメデイファム [I]	74.6-85.6		10.6-28.6	
	77.2	82.5	18.3	19.5
	0.2-0.3		ND	
	0.2	0.3	ND	ND
	0.2-1.1			
	0.4	0.8	1.0a	0.8
	0.9	1.6	4.2b	3.8
その他	2.8	1.89	4.2	4.7
合計	81.0	86.7	29.7	28.9
抽出残渣	7.2	5.0	14.7	11.6

a: 42 番のみの値

b: 41、42 番での平均値

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

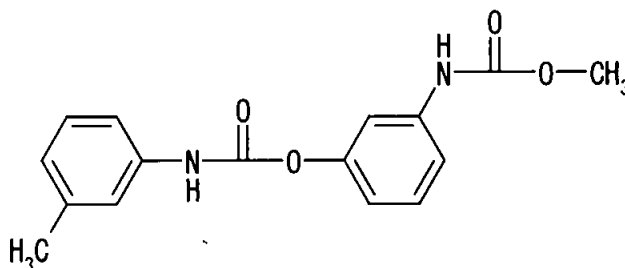
2. 植物代謝に関する試験

(1) ^{14}C -標識フェンメディファムを用いたてんさいにおける代謝 (資料: 代謝 3)

試験機関:

報告書作成年: 1983 年

供試標識化合物: ^{14}C 標識 フェンメディファム



^{14}C 標識位置: 標識 (報告書では と表記)、又は
標識 (報告書では と表記)。主に 標識を用いて試験を実施
し、 標識は確認用として用いた。

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能		
放射化学的純度		

供試植物: てんさい (Beta vulgaris L.)

てんさいを培養土で栽培し、約 2 週間後に培養液を含んだフラスコへ移植した。下記条件で環境を制御した気象チャンバー内で栽培した。

- ・ 温度 $19 \pm 2^\circ\text{C}$
- ・ 相対湿度 60~90%
- ・ 明時間 13~15 時間
- ・ 光強度 葉の表面で 2×10^4 ルックス

当試験はフェンメディファムのてんさいにおける植物代謝物の単離、同定を主な目的として実施された。①葉面へ塗布処理し経時的に試料採取して、代謝物の推移を確認し、②多量の植物の杯軸へ注入処理し、代謝物の単離と同定を行った。

【方法】

① 経時試験：葉表面へ塗布処理し、経時的に試料を採取測定

- 処理法： 製剤化した ^{14}C -標識フェンメディファムに水を加えてエマルジョンとし、マイクロピペットを用いて葉部表面に処理した。
- 処理量： 約 $2.5\mu\text{g a. i. /植物体}$
- 植物： 4 葉期のてんさい
- 処理放射能量： $1.75 \times 10^3 \text{ Bq/植物体}$ (12 時間～4 日及び 60 日後採取試料)
 $1.70 \times 10^3 \text{ Bq/植物体}$ (7 日～30 日後採取試料)
- 試料の採取： 12、24、48 時間、4、7、15、30、60 日後

抽出：

葉の表面をメタノールを用いて洗浄し、細切後、メタノール/クロロホルム 2 : 1 を用いて磨砕抽出した。ろ過後、残留物をクロロホルム/水 1 : 1 を用いて抽出した。抽出液は混合して振とう後、クロロホルム相と水/メタノール相とに分離した。15、30、60 日後試料では、抽出残渣をメタノールを用いてソックスレー抽出した。

分析：

クロロホルム相及びメタノール洗浄液は濃縮後に TLC 分析し、フェンメディファム [I] 及び 標準品とコクロマトグラフした。放射能領域はかきとって LSC 測定した。水相はアンバーライト XAD2 を用いて精製した後、TLC 分析した。

② 被験物質を杯軸へ注入し、代謝物の単離と同定を行った。

多量の植物体を用いて、代謝物の十分量を単離し、スペクトル測定により同定を行った。

処理量及び処理方法：

フェニル標識フェンメディファムを非標識フェンメディファムで希釈し比放射能 $3.47 \times 10^5 \text{ Bq/mg}$ として調製し、この 2.2g をシクロヘキサン 22mL に溶解した。この溶液 $10\mu\text{L}$ (フェンメディファムとして 1mg) を 8 週令のてんさいの胚軸へ各々注入した。

試料の採取：

処理 8 週間後及び 10 週間後に試料を採取した。処理 8 週間後に薬害症状を見せた葉を採取し (15.5kg : バッチ 1)、処理 10 週間後に植物体全体を採取した [葉部 (47.1kg) と根部 (70kg : バッチ 2)]。

抽出・単離：

葉部試料をアセトン抽出し濃縮後の水層をクロロホルム相（有機相）と水/メタノール相（水相）に分配した。水/メタノール相は濃縮後に1-ブタノールと分配した。各層をカラムクロマト（セファテックス A-25）で分画し、各ピークごとに C18 カラム、セファテックス LH-20、TLC (Si) 及び HPLC (C8、C18) 等を用いた精製を行い、単離された各代謝物 1A~4 を NMR、MS、IR を用いて同定した。

【結果】

① 経時試験

葉部抽出画分及び代謝物の消長（表 1～表 3）。葉部表面処理を受けたてんさいの各抽出画分における放射エネルギーの分布を表 1 に示した。葉の表面洗浄液の放射エネルギーは経時的に減少し、48 時間後には 38.3%、7 日後には 13.4%、60 日後には 2% となった。クロロホルム抽出相の放射エネルギーは 4 日後まで増加して 49.6% で最大となり、その後減少に転じて、60 日後には 0.3% であった。水/メタノール相の放射エネルギーは経時的に増加し、最初の 7 日後までは急激に増加して 54.1% となり、60 日後には 70.5% となった。ソックスレー抽出による放射エネルギーは 30 日後まで約 2% であったが、60 日後では 17.5% に増加した。根部の放射エネルギーは試験期間を通して検出限界未満であった。

表 1 葉面処理したてんさいの各抽出画分等の放射能消長（処理放射エネルギーに対する%）

処理後 日数	葉部						根部	植物体 合計
	メタノ ール洗 浄	主抽出		ソック スレー 抽出*	未抽出 (燃焼)	合計	燃焼*	
		有機相 (クロホルム 相)	水相 (水/メタ ノール相)					
12 時間	72.5	25.0	6.2	n. a.	2.1	105.8	<d. l.	105.8
24 時間	57.2	29.2	8.4	n. a.	3.7	98.5	<d. l.	98.5
48 時間	38.3	42.4	14.8	n. a.	6.0	101.5	<d. l.	101.5
4 日	23.8	49.6	25.5	n. a.	6.7	105.6	<d. l.	105.6
7 日	13.4	33.2	54.1	n. a.	2.2	102.9	<d. l.	102.9
15 日	6.6	24.0	60.3	2.5	3.2	96.7	<d. l.	96.7
30 日	4.1	15.5	60.2	2.2	5.7	87.7	<d. l.	87.7**
60 日	2.0	0.3	70.5	17.5	10.6	100.9	n. a.	100.9

* <d. l. 検出限界未満； n. a. 分析せず

** 抽出中の放射エネルギーの損失が疑われる：凍結乾燥した茎葉の燃焼による放射エネルギーは 102.0% であった。

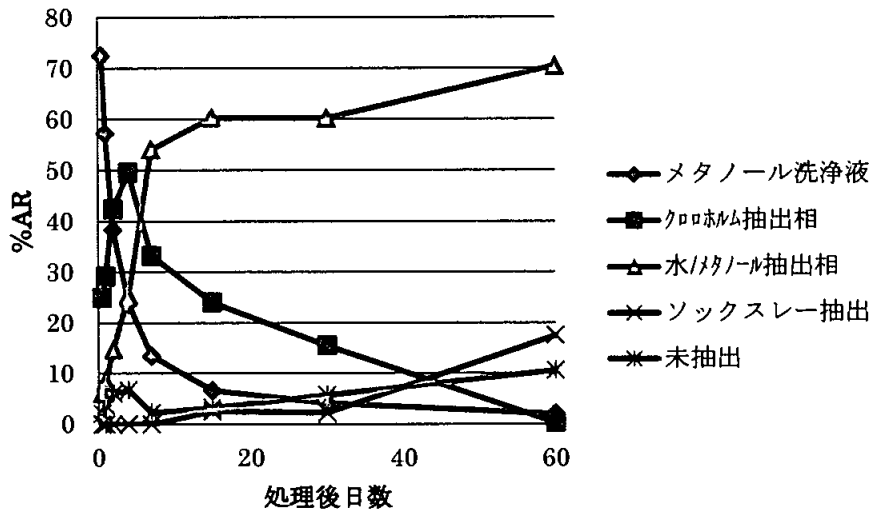


図1 葉面処理したてんさいの葉部各抽出画分等の放射能消長（処理放射エネルギーに対する%）

有機相（クロロホルム抽出相）及び水相（水/メタノール相）の TLC 分析による各代謝物の割合をそれぞれ、表 2 及び表 3 に示した。有機相中の放射能は 30 日後においても 84% がフェンメディファム [I] であった。代謝物 は有機相中の 3% 以下（処理放射能に対して 0.5% 以下）であった。水相には合計で 9 個の画分が認められ、画分 VIII はフェンメディファム [I] 標準品と、画分 VII は 標準品と、それぞれ一致した。画分 V は 標識では認められず、 の更なる代謝物であると考えられた。

表 4 に有機相及び水相合計での代謝物の割合を示した。処理 30 日後において、フェンメディファム [I] 及び の合計が処理放射能の 42.2% で最も多く残留していた。次いで の合計で、35.1% であった。

表2 てんさい葉部有機抽出相 (クロロホルム抽出相) の代謝物 (標識)
(処理放射エネルギーに対する%)

	12 時間	24 時間	48 時間	4 日	7 日	15 日	30 日
原点	0.3	0.3	0.8	1.3	1.0	1.0	1.6
未知物質	ND	ND	ND	0.5	0.3	0.5	0.5
	0.4	0.4	0.2	0.4	ND	0.2	0.5
フェンテオフィラム [I]	24	28	41	47	32	22	13

表3 てんさい葉部抽出水相 (水/メタノール抽出相) の代謝物 (標識)
(処理放射エネルギーに対する%)

画分	24 時間	48 時間	4 日	7 日	15 日	30 日
原点					4	
I		5	2			
II	2	3	5	29	31	30
III			1			
IV	2	2	5	16	22	21
V	2	2	4	1	1	2
VI	0.5	1	3	2	0.6	2
VII	1	0.5	2	2	0.6	2
VIII フェンテオフィラム [I]	1	1	4	5	1	2

- 1) 60 日後試料は粘性が高く、TLC 分析を行わなかった。
2) メチルフェニル標識では画分 V が認められなかった。

表4 てんさい葉部の代謝物 (有機相+水相) (処理放射エネルギーに対する%)

	24 時間	48 時間	4 日	7 日	15 日	30 日
フェンテオフィラム [I]	-	-	-	49.2	23.9	18.7
	1.8	1.8	5.2	15.7	22.3	21.1
	0.5	1.1	2.7	1.6	0.6	2.4
	-	-	-	66.5	46.8	42.2
	-	-	-	1.7	6.6	3.2
	2.2	2.8	5.1	28.7	30.8	30.1
	2.0	2.2	3.7	1.1	1.2	1.8
小計	-	-	-	31.5	38.6	35.1
その他*	5.5	12.8	12.2	6.1	10.5	10.4

*: 燃焼+ソックスレー+原点 (TLC) +その他の代謝物 (TLC)

② 代謝物の単離と同定

てんさい葉部抽出の有機相からフェンメディファムが単離・同定され、水相から以下の4種の代謝物が単離・同定された。

代謝物1AはFT-NMR及びIR測定により、下記構造式のと同定された。経時試験における画分IIと同一であることが確認された。

代謝物2は下記構造式のと同定された (FT-NMR、IR及びFAB-MS測定)。経時試験における画分IVと同一であると確認された。

代謝物3は下記構造式を持つ、と同定された (FD-MS、FT-NMR及びIR測定)。経時試験における画分Vと同一であった。

代謝物4は下記構造式を持つ、であると同定された (FD-MS、FT-NMR及びIR測定)。経時試験における画分VIと同一であることが確認された。

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

フェンメディファムのでんさいにおける推定代謝経路を次頁に示した。

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

図2 フェンメディファムのおてんさいにおける推定代謝経路

(2) ^{-14}C 標識フェンメディファムを用いたてんさいにおける代謝 (資料: 代謝 13)

試験機関:

報告書作成年: 2014 年 (GLP)

供試標識化合物: ^{-14}C 標識フェンメディファム

* : ^{14}C 標識位置

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能:

放射化学的純度:

【方法】

温室内で栽培した 4 葉期のてんさい (品種: Kristallina) に対して、 ^{-14}C 標識フェンメディファム乳剤を水で希釈し、1044.4g a. s./ha で 1 回散布処理した。

処理 19 日後に生育期試料として茎葉部を採取し、処理 137 日後に収穫期試料として茎葉部及び根部を採取した。採取した試料は 2 種の異なる抽出法 (①溶媒抽出、②工業的製糖法による抽出・精製) を用いて抽出した。溶媒抽出では、試料をギ酸を添加して酸性としたアセトニトリル/水 (8/2) を用いて 3 回磨砕抽出し、HPLC-放射能検出器による定量及び HPLC-MS/MS による代謝物の同定を行った。抽出残渣はマイクロウェーブ抽出を用いて更に抽出し特性化を行った (図 1)。

工業的な製糖方法に従った抽出・精製・製糖では各画分の代謝物、放射能を求め、溶媒抽出との比較を行った。更にこの方法の抽出残渣はセルラーゼ処理、2N 塩酸/ジオキサン処理後に酢酸エチルと分配し、残留物の特性化を行った (図 2)。

【結果】

採取した試料の総残留量は、処理 19 日後の茎葉で約 20 mg/kg、137 日後の収穫期の茎葉で 0.121 mg/kg、根部で 0.105 mg/kg であった (表 1)。

表 1 てんさい試料中の総残留放射能量- 標識

試料	処理後日数	総残留量 (TRR) (mg/kg)
てんさい茎葉、生育期試料	19 日	19.840
てんさい茎葉、収穫期試料	137 日	0.121
てんさい根部、収穫期試料	137 日	0.105

溶媒抽出による抽出率は、生育期の茎葉で約 97%、収穫期の茎葉で約 64%、収穫期の根部で約 27%であった。収穫期試料 (茎葉及び根部) の抽出残渣は更にマイクロウェーブ抽出を行い、茎葉で約 9% (0.011 mg/kg) が、根部で約 8% (0.008 mg/kg) が抽出された。最終的な抽出残渣は生育期茎葉で 2.7% (0.534 mg/kg)、収穫期茎葉で 27.3% (0.033 mg/kg)、根部で 65.1% (0.068 mg/kg) であった (表 2)。

親化合物フェンメディファムが主要な残留物であり、生育期の茎葉では 83.5% (約 16mg/kg)、収穫期の茎葉で 23.7% (0.029 mg/kg) であった。少量代謝物として生育期の茎葉では

が認められ、収穫期の茎葉では
が認められた。収穫期の根部では親化合物及び上記同定代謝物は認められなかった。

未同定代謝物として極性放射能が収穫期茎葉で 14.3% (0.017 mg/kg)、収穫期根部で 25.7% (0.027 mg/kg) 認められた (表 3)。この画分はアセチル化後の分配により特性化したのが、アセチル化した糖と挙動が類似しており、生体成分への取り込みの可能性が示唆された。その他の未同定代謝物は最大でも TRR の 4.9%以下であった。

根部の残留物を更に特性化するため実施した工業的製糖法による抽出では、TRR の 34%が粗抽出液中に認められ、溶媒抽出による放射能量と類似していた。粗抽出液から結晶化した砂糖には TRR の 12.8% (0.013 mg/kg) が含まれており、フェンメディファムは二酸化炭素にまで分解し、生体成分へ同化されると考えられた。カーボネーション残渣中に 8.8% (0.009 mg/kg)、砂糖を結晶化した後の上澄み中に 12.0% (0.012 mg/kg) が認められた。抽出残渣をセルラーゼ処理して可溶化した液中には 13.5% (0.013 mg/kg) が認められ、酢酸エチルと分配すると大部分 (12.9%) は水層中に分配された。セルラーゼ処理後の残渣

は 2N 塩酸/ジオキサンで、53.0% (0.053 mg/kg) が可溶化され、水相に 49.2%が、有機相に 3.8%が分配された (表 4)。この事は、セルロース及びその他の構造物質 (例えばリグニン) への結合あるいは同化を示していると考えられる。

溶媒抽出の量と工業的製糖法の粗抽出液の放射エネルギーは類似しており、粗抽出液の大部分は糖として特性化され、溶媒抽出の極性物質の一部として特性化された。極性物質のその他の部分は抽出中に遊離したフェンメディファムが分解した極性物質であろうと推定される。両抽出法の残渣は約 65%であったが、全て可溶化し、極性物質として特性化された。

以下の代謝経路が確認された。

- 親化合物が分解、無機化して、極性物質が生成し、大部分は糖などの生体物質に同化される。

推定代謝経路を図 1 に示した。

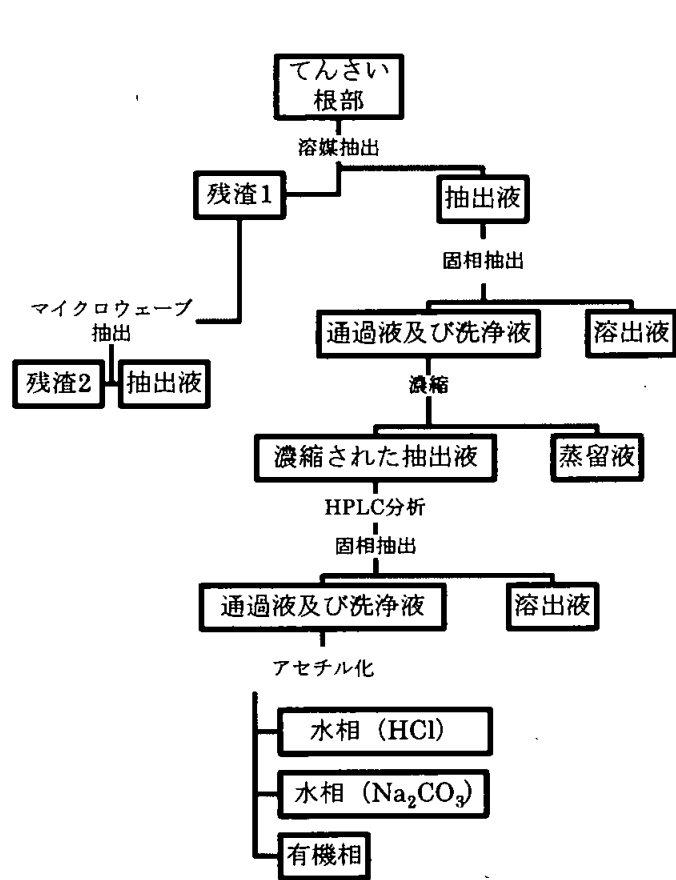


図1 溶媒抽出

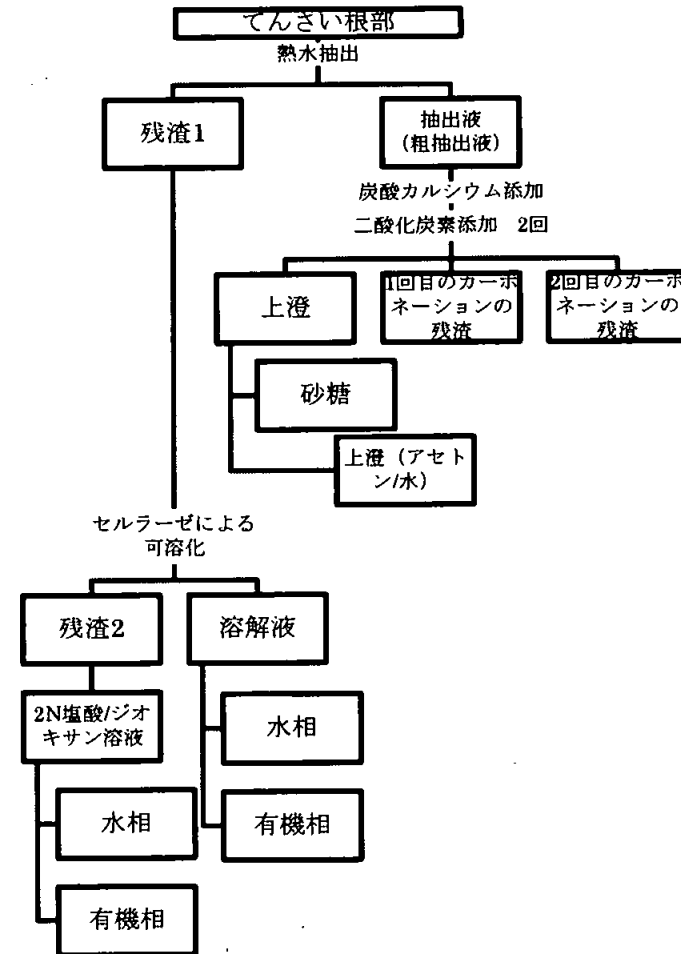


図2 工業的製糖法を模した抽出

表2 てんさいの各抽出画分における残留量-

-¹⁴C 標識フェンメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (溶媒抽出)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (溶媒抽出)		てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出)		てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)	
	TRR=19.840 mg/kg		TRR=0.121 mg/kg		TRR=0.105 mg/kg		TRR=0.100 mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
抽出液	97.3	19.307	63.7	0.077	27.0	0.028	---	---
工業的製糖手法による粗抽出液	---	---	---	---	---	---	33.5	0.033
-希薄抽出液							24.8	0.025
-砂糖 (沈殿)							12.8	0.013
-上澄み							12.0	0.012
-カーボネーション後の残渣							8.8	0.009
過酷抽出 (マイクロウェーブ抽出)	---	---	9.0	0.011	7.9	0.008	---	---
セルラーゼ処理液							13.5	0.013
-水相							12.9	0.013
-有機相							0.6	0.001
2N 塩酸/ジオキサン処理							53.0	0.053
-水相							49.2	0.049
-有機相							3.8	0.004
抽出 計	97.3	19.307	72.7	0.088	34.9	0.037	100.0	0.100
抽出残渣	2.7	0.534	27.3	0.033	65.1	0.068	n. d.	n. d.
総計	100.0	19.840	100.0	0.121	100.0	0.105	100.0	0.100

表3 てんさいにおける代謝物の分布-溶媒抽出-

-¹⁴C 標識フェンメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (処理 19 日後)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (処理 137 日後)		てんさい根部 収穫期試料 (処理 137 日後)	
	TRR=19.840 mg/kg		TRR=0.121 mg/kg		TRR=0.105 mg/kg	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
抽出液						
フェンメディファム	83.5	16.558	23.7	0.029		
同定代謝物 計	94.7	18.793	28.8	0.035		
極性放射能			14.3	0.017	25.7	0.027
未同定 1			4.4	0.005		
未同定 2			3.5	0.004		
未同定 3	0.4	0.070	2.9	0.004		
未同定 4	0.4	0.072	3.5	0.004	1.2	0.001
未同定 5	0.2	0.032				
未同定 6	0.1	0.025				
未同定 7	0.5	0.109	4.9	0.006		
未同定 9	0.5	0.096				
未同定 10	0.2	0.033				
未同定 11	0.2	0.047				
特性化した代謝物 計	2.4	0.485	33.6	0.041	27.0	0.028
過酷抽出 (マイクロウェーブ抽出)	---	---	9.0	0.011	7.9	0.008
分析せず	0.1	0.029	10.3	0.012	7.9	0.008
抽出計	97.3	19.307	72.7	0.088	34.9	0.037
抽出残渣	2.7	0.534	27.3	0.033	65.1	0.068
総計	100.0	19.840	100.0	0.121	100.0	0.105

表 4 代謝物分析における溶媒抽出と工業的製糖法による抽出との比較

てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)	TRR=0.105 mg/kg		てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)	TRR=0.100 mg/kg	
	%	mg/kg		%	mg/kg
溶媒抽出	27.0	0.028	粗抽出液	33.5	0.033
-未同定 4	1.2	0.001	-カーボネーション後の残渣	8.8	0.009
			-希薄抽出液	24.8	0.025
			-上澄み	12.0	0.012
-極性放射能	25.7	0.027	-砂糖	12.8	0.013
過酷抽出 マイクロウェーブ抽出	7.9	0.008			
抽出計	34.9	0.037			
抽出残渣	65.1	0.068	残渣	66.5	0.066
総計	100.0	0.105			
			過酷抽出		
			-セルラーゼ処理	13.5	0.013
			水相 (極性)	12.9	0.013
			有機相 (非極性)	0.6	0.001
			-2N 塩酸/ジオキサン処理	53.0	0.053
			水相 (極性)	49.2	0.049
			有機相 (非極性)	3.8	0.004
			抽出計	100.0	0.100
			抽出残渣	n. d.	n. d.
			総計	100.0	0.100

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

図3 $-^{14}\text{C}$ 標識フェンメディファムのおける推定代謝経路

(3) ^{-14}C 標識フェンメディファムを用いたてんさいにおける代謝 (資料: 代謝 14)

試験機関:

報告書作成年: 2014 年 (GLP)

供試標識化合物: ^{-14}C 標識フェンメディファム

* : ^{14}C 標識位置

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能:

放射化学的純度:

【方法】

温室内で栽培した 4 葉期のてんさい (品種: Kristallina) に対して、 ^{-14}C 標識フェンメディファム乳剤を水で希釈し、1068.8g a. s. /ha で 1 回散布処理した。

処理 19 日後に生育期試料として茎葉部を採取し、処理 137 日後に収穫期試料として茎葉部及び根部を採取した。採取した試料は 2 種の異なる抽出法 (①溶媒抽出、②工業的製糖法による抽出・精製) を用いて抽出した。溶媒抽出では、採取した試料をギ酸を添加して酸性としたアセトニトリル/水 (8/2) を用いて 3 回磨砕抽出し、HPLC-放射能検出器による定量及び HPLC-MS/MS による代謝物の同定を行った。抽出残渣はマイクロウェーブ抽出を用いて更に抽出し特性化を行った。

工業的な製糖方法に従った抽出・精製・製糖では各画分の代謝物、放射能を求め、溶媒抽出との比較を行った。更にこの方法の抽出残渣はセルラーゼ処理、2N 塩酸/ジオキサン処理後に酢酸エチルと分配し、残留物の特性化を行った。

【結果】

採取した試料の総残留量は、処理 19 日後の茎葉で約 30 mg/kg、137 日後の収穫期の茎葉で 0.122 mg/kg、根部で 0.075 mg/kg であった (表 1)。

表 1 てんさい試料中の総残留放射能量

試料	処理後日数	総残留量 (TRR) (mg/kg)
てんさい茎葉、生育期試料	19 日	30.163
てんさい茎葉、収穫期試料	137 日	0.122
てんさい根部、収穫期試料	137 日	0.075

溶媒抽出による抽出率は、生育期の茎葉で約 94%、収穫期の茎葉で約 64%、収穫期の根部で約 39% であった。収穫期試料 (茎葉及び根部) の抽出残渣は更にマイクロウェーブ抽出を行い、茎葉で約 11% (0.014 mg/kg) が、根部で約 13% (0.010 mg/kg) が抽出された。最終的な抽出残渣は生育期茎葉で 6.1% (1.834 mg/kg)、収穫期茎葉で 24.8% (0.030 mg/kg)、根部で 48.3% (0.036 mg/kg) であった (表 2)。

親化合物フェンメディファムが主要な残留物であり、生育期の茎葉では 76.2% (約 23mg/kg)、収穫期の茎葉で 41.6% (0.051 mg/kg)、収穫期の根部で 4.6% (0.003 mg/kg) であった。少量代謝物として生育期の茎葉では

が認められた (表 3)。

未同定代謝物として極性放射能が収穫期茎葉で 10.2% (0.012 mg/kg)、収穫期根部で 32.1% (0.024 mg/kg) 認められた。この画分はアセチル化後の分配により特性化したのが、アセチル化した糖と挙動が類似しており、生体成分への取り込みの可能性が示唆された。その他の未同定代謝物は最大でも TRR の 1.4% 未満であった。は認められなかった (表 3)。

工業的製糖法による抽出では、TRR の 42% が粗抽出液中に認められ、溶媒抽出による放射能量と類似していた。粗抽出液から結晶化した砂糖には TRR の 26.6% (0.020 mg/kg) が含まれており、フェンメディファムは二酸化炭素にまで分解し、生体成分へ同化されと考えられた。カーボネーション残渣中に 9.5% (0.007 mg/kg)、砂糖を結晶化した後の上澄み中に 5.9% (0.004 mg/kg) が認められた。抽出残渣をセルラーゼ処理して可溶化した液中には 14.6% (0.011 mg/kg) が認められ、酢酸エチルと分配すると 13.8% は水層中に分配さ

れた。セルラーゼ処理後の残渣は2N 塩酸/ジオキサソで、完全に可溶化され、水相に 38.8% が、有機相に 4.6%が分配された (表 4)。この事は、セルロース及びその他の構造物質 (例えばリグニン) への結合あるいは同化を示していると考えられる。

溶媒抽出の量と工業的製糖法の粗抽出液の放射エネルギーは類似しており、溶媒抽出の極性物質の量と工業的製糖法の砂糖の量も類似していた。したがって溶媒抽出の極性物質はほぼ全量が糖であると考えられる。

以下の代謝経路が確認された。

- 親化合物が分解、無機化して、極性物質が生成し、大部分は糖などの生体物質に同化される。

推定代謝経路を図 1 に示した。

表2 てんさいの各抽出画分における残留量-

-¹⁴C 標識フェンメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (溶媒抽出法)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出法)		てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)	
	TRR=30.163 mg/kg		TRR=0.122 mg/kg		TRR=0.075mg/kg		TRR=0.075mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
抽出液	93.9	28.329	63.9	0.078	38.7	0.029	---	---
工業的製糖手法による粗抽出液							42.0	0.031
-希薄抽出液							32.5	0.024
-砂糖(沈殿)							26.6	0.020
-上澄み							5.9	0.004
-カーボネーション残渣							9.5	0.007
過酷抽出 (マイクロウェーブ抽出)	---	---	11.3	0.014	13.0	0.010	---	---
セルラーゼ処理液	---	---	---	---	---	---	14.6	0.011
-水相							13.8	0.010
-有機相							9.7	0.001
2N 塩酸/ジオキサン処理	---	---	---	---	---	---	43.4	0.032
-水相							38.8	0.029
-有機相							4.6	0.003
抽出 計	93.9	28.329	75.2	0.092	51.7	0.039	100.0	0.075
抽出残渣	6.1	1.834	24.8	0.030	48.3	0.036	n. d.	n. d.
総計	100.0	30.163	100.0	0.122	100.0	0.075	100.0	0.075

表3 てんさいにおける代謝物の分布-溶媒抽出法-

¹⁴C 標識フェンメディファム

	てんさい茎葉部 生育期試料 (処理 19 日後)		てんさい茎葉部 収穫期試料 (処理 137 日後)		てんさい根部 収穫期試料 (処理 137 日後)	
	TRR=30.163 mg/kg		TRR=0.122 mg/kg		TRR=0.075mg/kg	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
溶媒抽出						
フェンメディファム	76.2	22.999	41.6	0.051	4.6	0.003
同定代謝物 計	92.2	27.829	51.2	0.062	6.6	0.005
極性放射能 未同定 7	---	---	10.2	0.012	32.1	0.024
未同定 8	0.5	0.137	1.4	0.002	---	---
未同定 9	0.5	0.136	---	---	---	---
未同定 10	0.4	0.131	1.2	0.001	---	---
特性化した代謝物 計	1.4	0.404	12.8	0.016	32.1	0.024
過酷抽出 (マイクロウェーブ抽出)	---	---	11.3	0.014	13.0	0.010
分析せず	0.3	0.096	11.3	0.014	13.0	0.010
抽出計	93.9	28.329	75.2	0.092	51.7	0.039
抽出後残渣 (PES)	6.1	1.834	24.8	0.030	48.3	0.036
総計	100.0	30.163	100.0	0.121	100.0	0.075

表4 代謝物分析における溶媒抽出と工業的製糖法による抽出との比較

てんさい根部 収穫期試料 (溶媒抽出)			てんさい根部 収穫期試料 (工業的製糖法)		
	TRR=0.075 mg/kg			TRR=0.075 mg/kg	
	%	mg/kg		%	mg/kg
溶媒抽出	38.7	0.029	粗抽出液	42.0	0.031
フェンメディファム	4.6	0.003			
同定代謝物 計	6.6	0.005			
極性放射能	32.1	0.024	-カーボネーション残渣 -希薄抽出液 -上澄み -沈殿した砂糖	9.5 32.5 5.9 26.6	0.007 0.024 0.004 0.020
特性化された放射能	32.1	0.024	砂糖として特性化	26.6	0.020
過酷抽出					
マイクロウェーブ抽出	13.0	0.010	-セルラーゼ処理 水相 (極性) 有機相 (非極性)	14.6 13.8 0.7	0.011 0.010 0.001
			-2N 塩酸/ジオキサン処理 水相 (極性) 有機相 (非極性)	43.4 38.8 4.6	0.032 0.029 0.003
抽出計	51.7	0.039	抽出計	100.0	0.075
抽出後残渣	48.3	0.036	抽出後残渣	n. d.	n. d.
総計	100.0	0.075	総計	100.0	0.075

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

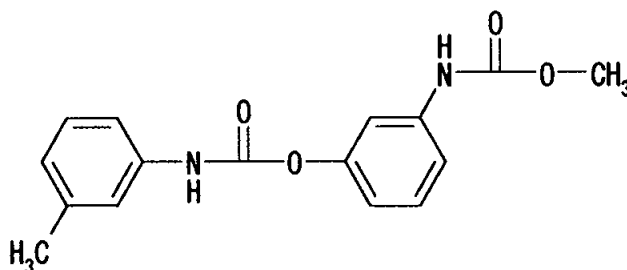
図1 ^{-14}C 標識フェンメディファムのおてんさいにおける推定代謝経路

(4) ^{14}C -標識フェンメディファムを用いたいちごにおける代謝 (資料: 代謝 4)

試験機関:

報告書作成年: 2004 年、GLP

供試標識化合物: ^{14}C 標識 フェンメディファム



^{14}C 標識位置:

化学名: 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能

放射化学的純度

供試植物: いちご (品種: Elsanta Supa Viga)

砂壤土を充填した円柱状のプラスチック容器 (直径 80cm、深さ 60cm) 9 個を野外に設置し、各容器にいちごを 4 株ずつ栽培した。3 容器を通常処理量とし、1 容器は過剰処理量とした。残り 5 容器を無処理とした。過剰処理量は必要な場合のみ利用した。

【方法】

^{14}C 標識フェンメディファムを非標識フェンメディファムで希釈し、アセトニトリルに溶解し、製剤白試料に添加して処理製剤を調製した。調製した製剤は水で希釈し、年間最大処理量相当である 941g ai/ha で、花序出現前のいちごへ散布処理した。

処理 49 日後にわずかに赤くなった果実 (741.7g) 及び葉 (210.1g) を採取した。採取した試料はドライアイスとともに磨砕した。磨砕した試料の一部をアセトニトリル/水 (80/20) を用いて 3 回磨砕抽出し、抽出残渣は燃焼し LSC 測定した。アセトニトリル/水抽出液は濃縮した後、ジクロロメタンと 3 回分配した。ジクロロメタン (DCM) 相、水相ともに LSC 測定及び HPLC 測定を行った。同定代謝物については HPLC (放射能測定) 及び HPLC-MS/MS 分析を行い確認した。葉試料及び過剰処理量試料は代謝物同定の補助のみに用いた。

【結果】

処理 49 日後のいちご果実における総放射能残留量は 0.081 mg/kgであった。そのうちの 85.2% (0.069 mg/kg) がアセトニトリル/水により抽出され、14.8% (0.012 mg/kg) が未抽出であった (表 1)。

表 1 いちご果実の総残留量 (TRR) 及び抽出量 (通常処理量)

TRR mg/kg	総抽出量		未抽出残渣	
	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR
0.081	0.069	85.2	0.012	14.8

抽出放射能の内、59.6%TRR (0.048 mg/kg) がジクロロメタン相へ分配され、25.6%TRR (0.021 mg/kg) が水相へ分配された。

表 2 各抽出画分における放射能分布 (通常処理量)

	%TRR	mg/kg
ジクロロメタン相	59.6	0.048
水相	25.6	0.021
抽出計	85.2	0.069
(未抽出残渣)	14.8	0.012
合計	100.0	0.081

抽出画分の内、ジクロロメタン (DCM) 相にはフェンメディファムが 51.1%TRR (0.0413 mg/kg) 認められ、他に ; HPLC でクロマトグラフィーされた) 及び未同定代謝物が 4.8%TRR (0.0039 mg/kg) 認められた。水相中には認められた。総残留放射能のうち、61.7%が同定された。その他に 10.6%TRR (0.0085 mg/kg) 及び 3.2%TRR (0.0026 mg/kg) の 2 種の未同定代謝物が認められた。未同定物質は水相の高極性の物質 10.6%TRR (0.0085 mg/kg) を除くと、その他の未同定物質は 5% (0.004 mg/kg) 未満であった。

表 3 いちご果実各抽出相の HPLC 分析結果 (通常処理量)

	DCM 相		水相		合計	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
フェンメディファム	51.1	0.0413			51.1	0.0413
DCM 未同定 2	4.8	0.0039			4.8	0.0039
水相未同定 1			10.6	0.0085	10.6	0.0085
水相未同定 3			3.2	0.0026	3.2	0.0026
その他の化合物	1.8	0.0014	1.2	0.0010	3.0	0.0024
計	59.6	0.048	25.6	0.021	85.2	0.069

: とクロマトグラフィーされた

3. 土壤中動態試験

フェンメディファムの好気及び嫌気土壤中動態試験 (資料No: 代謝 5)

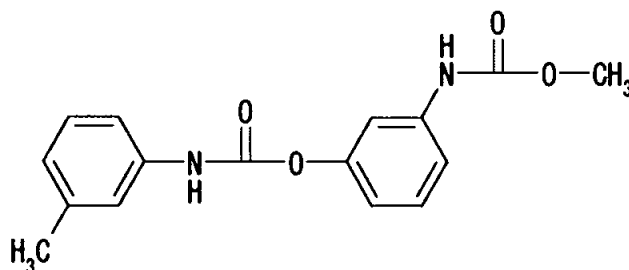
試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

供試標識化合物: ¹⁴C 標識フェンメディファム

構造式



化学名: 3-メチルカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能: 、放射化学的純度:

供試土壌: ドイツ標準土壌 2.2

供試土壌の組成等は下表に示すとおりである。供試土壌は 2 mm の篩にかけ、供試化合物施用の 3 日前に土壌水分を 1/3bar における容水量の 70% あるいは最大容水量の 45% に調節した。

有機炭素含有量 (%)	2.45
カチオン交換容量 (mval/100 g)	13.0
粘土 (<2 μm [%])	6.4
シルト (2~20 μm [%])	6.0
細砂 (20~200 μm [%])	34.2
粗砂 (>200 μm [%])	53.4
土性 (USDA)	壤質砂土
嵩比重 (g/cm ³)	1.14
pH (H ₂ O)	7.3
pH (CaCl ₂)	7.1
最大容水量 (1/3 bar)	21.3g/100g 乾燥重量

【方法】

フェンメディファムの最大圃場施用量 1.65kg/ha を担保する処理量として 2.2mg/kg 土壌を設定した。処理溶液は、¹⁴C 標識フェンメディファム 5.44 mg をメタノール 25mL に溶解して調製した。

好気条件土壌区、嫌気条件土壌区及び滅菌土壌区の 3 試験区を設けた。滅菌土壌区の土壌は、24 時間間隔で計 3 回、それぞれ 20 分間オートクレーブを用いて滅菌した。

3 試験区とも、試験フラスコ中の土壌試料 (100g 乾燥重量) に処理溶液 1.0ml をガラスピペットにて滴下した後、混合し (試験フラスコ当たりの ¹⁴C フェンメディファム処理量 : 0.22mg)、22±2℃ の温度条件で試験した。嫌気条件土壌区は、薬剤処理後 20 日間は好気条件土壌区と同様にインキュベーションし、薬剤処理 20 日目に窒素で脱気した脱イオン水を湛水し嫌氣的インキュベーションを開始した。滅菌土壌区は、嫌気条件土壌区と同様の手順でインキュベーションした。

各試験フラスコには、放射性揮発性物質の捕集を目的とした水酸化カリウムトラップを取り付けた。

3 試験区 (好気条件土壌区、嫌気条件土壌区及び滅菌土壌区) における土壌試料及び水層試料の採取日を、次表に示した。

薬剤処理後 日数	好気条件 土壌区 (土壌試料)	湛水後 日数	嫌気条件土壌区 (土壌及び水層試 料)	滅菌土壌区 (土壌及び水 層試料)
処理日 (0 日)	○	-20 日	×	×
11 日	○	- 9 日	×	×
20 日*	○	0 日*	×	○
27 日	×	7 日	○	×
32 日	○	12 日	×	×
50 日	×	30 日	○	○
60 日	○	40 日	×	×
81 日	×	61 日	○	○
117 日	×	97 日	○	×

* : フェンメディファム処理 20 日後に嫌気及び滅菌条件土壌区に湛水処理を行った。

○ : 試料採取、× : 試料を採取せず。

試料の分析：

放射性揮発性物質捕集液：捕集液中の放射能を液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。捕集液中に捕集された揮発性放射性物質は、塩化バリウム溶液処理により二酸化炭素であること確認した。

土壌試料：各試験区の土壌試料を 2 分割し、一方についてはアセトニトリル抽出処理を行い、他方についてはアセトニトリル/水混液によるソックスレー抽出を行った。抽出液は、LSC により液中の放射能量を測定し、放射能 TLC 及び放射能 HPLC による放射性成分分析に供した。抽出後の土壌残渣は乾燥後に燃焼させ、LSC により放射能量を測定した。

水層試料：嫌気条件土壌区の湛水土壌試料は、遠心分離により水層と土壌層に分画した。LSC により液中の放射能を測定し、放射能 TLC 及び放射能 HPLC による放射性成分分析に供した。

結合残渣の特徴付け：ソックスレー抽出した土壌残渣について、0.1M 水酸化ナトリウムによる抽出を行い、さらに遠心分離して固形残渣について脱イオン水で抽出処理を行い、脱イオン水洗液を水酸化ナトリウム抽出液に合わせた。抽出処理後の土壌残渣（フミン画分）は乾燥させ、燃焼させて放射能を測定した。NaOH 抽出液を約 pH1 に調整し、上澄液（フルボ酸画分）と沈殿物（フミン画分）に分割し、LSC にて放射能を測定した。

土壌微生物バイオマスの測定：3 試験区（好気条件土壌区、嫌気条件土壌区及び滅菌土壌区）の微生物バイオマスを測定した。

【結果】

各試験区（好気条件土壌、嫌気条件土壌及び滅菌土壌）における放射能回収率を表 1～3 に示した。好気条件土壌（表 1）、嫌気条件土壌（表 2）及び滅菌土壌（表 3）では、得られた放射能回収率は処理放射能に対して 92% 以上であった。

3 試験区において、最も高い二酸化炭素の発生が認められたのは好気条件土壌であり、薬剤処理後 60 日では処理放射能に対して 14.4% 認められた。一方、滅菌土壌での二酸化炭素生成量は無視しうるものであった。

好気条件土壌及び嫌気条件土壌では結合残渣が経時的に増加し、試験終了時点において処理放射能に対して、それぞれ 69.7%（好気条件土壌、薬剤処理後 60 日）及び 86.3%（嫌気条件土壌、薬剤処理後 117 日）認められた。滅菌土壌での結合残渣は非滅菌土壌（好気条件土壌及び嫌気条件土壌）と比較して有意に低かった（最大 10.3%）。

滅菌土壌において認められた二酸化炭素及び結合残渣の低生成量は、供試土壌の微生物活性によるものと考えられた。

表 1：好気条件土壌 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値)

試験条件	薬剤処理後日数	土壌層				放射能回収率(合計)
		アセトニトリル抽出液	ソックスレー抽出液	CO ₂ (累積値)	結合残渣	
好気条件 (非湛水)	処理日(0日)	82.9	18.7	—	0.6	102.3
	11日	49.6	10.2	2.3	34.3	96.3
	20日	34.5	13.9	3.3	46.6	98.2
	32日	19.1	8.8	4.5	63.4	95.7
	60日	6.4	6.3	14.4	69.7	96.8

表 2：嫌気条件土壌 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値)

試験条件	湛水後日数	薬剤処理後日数	水層	土壌層				放射能回収率(合計)
				アセトニトリル抽出液	ソックスレー抽出液	CO ₂ (累積値)	結合残渣	
好気条件 (非湛水)	-20日	処理日(0日)	—	82.9	18.7	—	0.6	102.3
	-9日	11日	—	49.6	10.2	2.3	34.3	96.3
	0日	20日	—	34.5	13.9	3.3	46.6	98.2
嫌気条件 (湛水)	7日	27日	1.0	20.4	9.6	5.7	56.3	92.8
	15日	35日	1.1	19.5	9.9	2.8	60.9	94.1
	30日*	50日	1.1	11.2	10.4	3.9	69.5	96.0
	61日	81日	1.5	9.2	7.7	4.2	80.3	102.0
	97日	117日	0.6	5.6	7.4	3.2	86.3	103.0

*：試験第30日(反復数1)と試験第33日(反復数1)の平均値。

表 3：滅菌土壌 (表中の数値は処理放射能に対する%、反復数n=1)

試験条件	湛水後日数	薬剤処理後日数	水層	土壌層				放射能回収率(合計)
				アセトニトリル抽出液	ソックスレー抽出液	CO ₂ (累積値)	結合残渣	
滅菌条件 (湛水)	0日	20日	—	86.1	15.6	—	1.6	103.3
	30日	50日	11.0	71.5	13.1	0.0	6.2	101.8
	61日	81日	13.5	56.3	13.9	0.1	10.3	94.1
	97日	117日	14.8	65.4	14.4	0.0	8.6	103.0

好気条件土壌、嫌気条件土壌及び滅菌土壌における抽出性放射性成分の推移を、それぞれ表 4～表 6 に示した。

好気条件土壌（表 4）では、フェンメディファムは速やかに分解し、処理後 11 日には処理放射能に対して 53.4%、処理後 60 日には 9.0% となった。

処理放射能に対して 10% 以上生成した代謝物として が認められた。

は薬剤処理後 20 日に最大 10.1% 認められ、その後急速に分解した。好気条件土壌における微量代謝物として、処理当日を除く試験期間中に

が処理放射能に対して 1.6

～3.7% の範囲で認められた。また、

が薬剤処理後 20

日のみに処理放射能に対して 0.5% 認められた。

被験物質を処理後 20 日間にわたって好気（非湛水）条件とし、20 日目（湛水 0 日）に湛水して 97 日間嫌気条件とした嫌気条件土壌（表 5）では、好気条件土壌（表 4）と同様にフェンメディファムは速やかに分解した。また好気条件土壌で主要代謝物と認められた は、嫌気条件下である処理後 35 日及び 81

日において処理放射能に対して 7.1% 及び 6.3% であり、嫌気条件土壌における の分解速度は好気条件土壌（処理後 32 日及び 60 日：処理放射能に対して 3.7% 及び 1.5%）と比較して緩やかであった。

滅菌土壌（表 6）におけるフェンメディファムの分解は、非滅菌土壌（好条件土壌及び嫌気条件土壌）と比較して有意に遅かった。滅菌土壌で認められた分解物は であった。

表 4：好気条件土壌－抽出性放射性成分の推移

試験条件	薬剤処理後日数	フェンメディファム				抽出性放射性成分(合計)
好気条件(非湛水)	処理日(0日)	97.6				101.6
	11日	53.4				59.8
	20日	32.7				48.4
	32日	20.2				27.9
	60日	9.0				12.7

(表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値)

表 5：嫌気条件土壌－抽出性放射性成分の推移

(表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値)

試験条件	湛水後日数	薬剤処理後日数	フェンメディファム				抽出性放射性成分(合計)
好気条件 (非湛水)	-20日	処理日(0日)	97.6				101.6
	-9日	11日	53.4				59.8
	0日	20日	32.7				48.4
嫌気条件 (湛水)	7日	27日	17.0				30.9
	15日	35日	16.9				30.4
	30日*	50日	9.3				22.6
	61日	81日	6.7				17.8
	97日	117日	5.8				13.6

*：試験第30日(反復数1)と試験第33日(反復数1)の平均値。

表 6：滅菌土壌－抽出性放射性成分の推移

試験条件	湛水後日数	薬剤処理後日数	フェンメディファム				抽出性放射性成分(合計)
滅菌条件 (湛水)	0日	20日	81.9				101.7
	30日	50日	44.6				95.6
	61日	81日	26.8				83.7
	97日	117日	35.7				94.6

(表中の数値は処理放射能に対する%、反復数n=1)

結合残渣の特徴付け：好気条件土壌（処理後 20 日）及び嫌気条件土壌（処理後 117 日）の土壌を用いて結合残渣の特徴付けを行った結果、表 7 のとおりであった。

表 7：結合残渣の特徴付け

試験条件	湛水後日数	薬剤処理後日数	結合残渣(合計)	NaOH 抽出液に分配された放射能				NaOH 抽出後の土壌
				フミン酸画分	フミン画分	フルボ酸画分	合計	
好気土壌	0 日	20 日	27.9	21.0	2.7	4.3	27.9	15.4
嫌気土壌	97 日	117 日	44.4	36.1	4.3	5.6	44.4	26.7

(表中の数値は処理放射能に対する%、n=2 の平均値)

微生物バイオマスの測定結果：供試土壌の微生物バイオマス測定結果を下表に示した。処理当日において、滅菌土壌に有意な微生物バイオマス活性は認められなかった。

薬剤処理後日数	試験条件	微生物バイオマス (mg microbial C/kg 土壌乾燥重量)
処理当日	好気条件土壌 (無処理)	700
	滅菌土壌 (無処理)	27
処理後 71 日	嫌気条件土壌 (無処理)	316
	嫌気条件土壌 (処理区)	602
処理後 82 日	好気条件土壌 (無処理)	528
	好気条件土壌 (処理区)	607

本試験条件下でのフェンメディファムの代謝分解速度を下表に示した。

	好気条件土壌		嫌気条件土壌 *		滅菌土壌	
	DT50	DT90	DT50	DT90	DT50	DT90
フェンメディファム	12.5 日	55.8 日	11.8 日	48.2 日	53.8 日	178.8 日

*: 被験物質を処理後 20 日間は好气的条件下でインキュベーションし、その後湛水条件 (嫌气的条件) 下において 97 時間インキュベーションした。

代謝分解経路：フェンメディファムの土壌中における想定分解経路は、次のとおり考えられた。

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

図1 フェンメディファムの好気、嫌気土壌における推定代謝経路

2. 水中分解動態に関する試験

(1) 加水分解動態試験

(資料：代謝6)

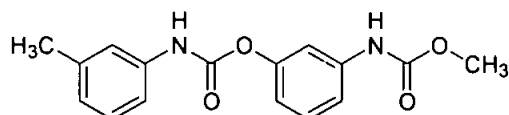
試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2003年

供試化合物：

¹⁴C 標識フェンメディファム



*：標識位置

比放射能： 、放射化学的純度：

非標識フェンメディファム (純度：)

化学名：3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

供試緩衝液：

pH 4 及び 5：クエン酸一水和物 (4.2g) を Milli-Q 水に溶解後、1L に定容。0.02M。

pH 7：イミダゾール (1.36g) を Milli-Q 水に溶解後、1L に定容。0.02M。

pH 9：ホウ酸ナトリウム (7.63g) を Milli-Q 水に溶解後、1L に定容。0.02M

試験温度：25±1℃

試験濃度：3 mg/L

試験系の滅菌：試験に先立ち、緩衝液、試験容器/器具等を真空蒸気滅菌装置により滅菌処理した。試験系の滅菌性は、滅菌したトリプシン大豆ブロスの Milli-Q 水溶液を試験系で培養した結果、試験を通じて保たれていた。

試験方法：試験系の容器として、約 30mL 容のガラス製枝付きインピンジャーを使用した。試験系には二酸化炭素を除去した加湿無菌空気を通気し、揮発性物質捕集のためにエチレングリコール及び 2M 水酸化カリウム溶液の直列した各トラップを取り付けた。

分析試料 (試験緩衝液及び各捕集溶液) の採取時点は、次のとおりであった。各採取時点において、分析試料 (試験緩衝液及び各捕集溶液) をそれぞれ 2 反復採取した。

試料採取時点

pH 4 及び 5：処理直後 (0 時間)、処理後 24、48、96、168、336、504、672 及び 720 時間

pH 7：処理直後 (0 時間)、処理後 0.5、2、4、8、16、24、48 及び 72 時間

pH 9：処理直後 (0 時間)、処理後 1、2、4、8、12、18、24 及び 30 分

分析方法：採取した分析試料は、液体シンチレーションカウンター (LSC) によって放射能を定量した。また試験水は、[¹⁴C]-高速液体クロマトグラフィー (HPLC-[¹⁴C]) 及び高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析 (HPLC-MS/MS) で分析し、放射性成分の定量及び同定を行った。

試験結果：

各緩衝液における放射能回収率(物質収支)を、表 1(pH4、5、7)～表 2(pH 9)に示した。エチレングリコール捕集液及び水酸化カリウム捕集液中に揮発性物質は認められなかった。処理した放射能は試験緩衝液から回収され、各 pH 緩衝液及び各採取時点における放射能回収率は 90～110%の範囲にあった。

表 1：pH4, 5, 7 緩衝液における放射能回収率 (処理放射能に対する%)

経過時間 (時間)	pH4 緩衝液		pH5 緩衝液	
	試験水	揮発性物質捕集液	試験水	揮発性物質捕集液
処理直後	98.7	0.0	97.1	0.0
24 (1日後)	98.6	0.0	98.2	0.0
48 (2日後)	99.0	0.0	98.8	0.0
96 (4日後)	99.5	0.0	100.1	0.0
168 (7日後)	99.8	0.0	99.6	0.0
336 (14日後)	99.8	0.0	102.8	0.0
504 (21日後)	104.8	0.0	107.8	0.0
672 (28日後)	101.3	0.0	100.9	0.0
720 (30日後)	102.6	0.0	100.2	0.0
平均値	100.4	0.0	100.6	0.0

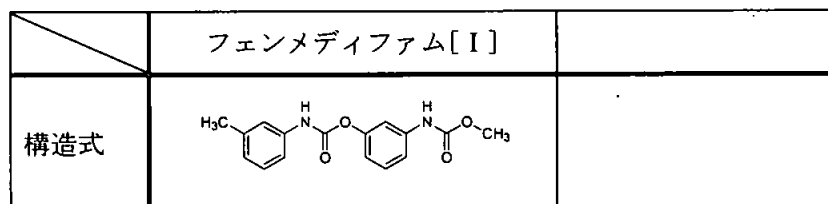
表 2：pH7 緩衝液における放射能回収率 (処理放射能に対する%)

経過時間 (時間)	pH7 緩衝液	
	試験水	揮発性物質捕集液
処理直後	97.9	0.0
0.5	102.4	0.0
2	100.7	0.0
4	102.8	0.0
8	102.1	0.0
16	102.9	0.0
24	104.7	0.0
48	105.0	0.0
72	107.1	0.0
平均値	102.8	0.0

表 3：pH9 緩衝液における放射能回収率 (処理放射能に対する%)

経過時間 (分)	pH9 緩衝液	
	試験水	揮発性物質捕集液
処理直後	97.9	0.0
1	97.6	0.0
2	101.2	0.0
4	101.1	0.0
8	104.1	0.0
12	100.7	0.0
18	104.5	0.0
24	100.8	0.0
30	101.7	0.0
平均値	101.1	0.0

HPLC-¹⁴Cによる分析の結果、試験緩衝液中にフェンメディファム及び他に1種類が認められた。HPLC-MS/MSによる検討の結果、親化合物フェンメディファムと分解物の構造が同定された。



放射性成分の量的推移を表3(pH4、5、7)～表4(pH9)に示す。

各pHにおいて経時的にフェンメディファムが減少する一方、
フェンメディファムから
への加水分解は、pH依存性が認められた。即ち酸性領域(pH4及び5)においてフェンメディファムの加水分解は緩慢であり、塩基性領域になるにつれて加水分解が急速になった。

表4：pH4、5、7緩衝液における放射性成分の量的推移
(表中の数値は、処理放射能に対する%)

経過時間 (時間)	pH4 緩衝液		pH5 緩衝液	
	フェンメディファム		フェンメディファム	
処理直後	100.0		100.0	
24 (1日後)	100.0		97.8	
48 (2日後)	100.0		96.3	
96 (4日後)	99.0		92.1	
168 (7日後)	98.2		87.0	
336 (14日後)	97.0		79.7	
504 (21日後)	94.0		74.1	
672 (28日後)	92.5		65.8	
720 (30日後)	93.3		62.5	

表5：pH7緩衝液における放射性成分の量的推移(処理放射能に対する%)

経過時間 (時間)	pH7 緩衝液	
	フェンメディファム	
処理直後	93.0	
0.5	96.4	
2	85.4	
4	72.5	
8	56.2	
16	39.5	
24	24.6	
48	7.5	
72	1.3	

表6：pH9緩衝液における放射性成分の量的推移(処理放射能に対する%)

経過時間 (分)	pH9 緩衝液	
	フェンメディファム	
処理直後	100.0	
1	87.1	
2	76.1	
4	58.1	
8	34.3	
12	19.6	
18	12.9	
24	9.6	
30	5.2	

各 pH 緩衝液における一次速度式に従うフェンメディファムの DT_{50} 及び DT_{90} を、下表に示した。フェンメディファムの半減期は、pH4 及び 5 においてそれぞれ 259 日及び 47 日、pH7 及び 9 においてはそれぞれ 12 時間及び 7 分であり、塩基性領域において極めて急速に分解した。

表 7: フェンメディファムの加水分解における DT_{50} 及び DT_{90}

pH	相関係数	速度定数	DT_{50}	DT_{90}
4	-0.9726	0.0027 d^{-1}	259 日	861 日
5	-0.9958	0.0148 d^{-1}	47 日	156 日
7	-0.9922	0.0588 h^{-1}	12 時間	39 時間
9	-0.9860	0.0981 min^{-1}	7 分	24 分

本試験結果から得られたフェンメディファムの加水分解経路図を示す。

(2) 水中光分解動態試験 (緩衝液)

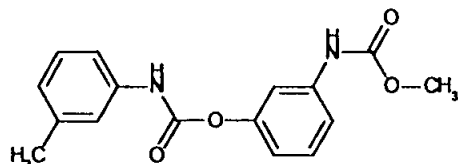
(資料 : 代謝 7)

試験機関 :

[GLP]

報告書作成年 : 1992 年

供試化合物 : フェンメディファム



化学名 : 3-メチルカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーボメート

化学的純度 :

供試水 : 0.02M 酢酸緩衝液 pH4 (120°Cのオートクレーブを用いて滅菌)
2.95g (0.036 mol) の酢酸ナトリウムと 9.2 mL (0.161 mol) の酢酸を 1000 mL の再蒸留水に溶解した。この溶液 100 mL を再蒸留水を用いて 1000 mL に定容した。

光源 : キセノンランプ (290nm 未満の波長をフィルターにより除去)

光強度 : 6.36 mW/cm² = 63.6 W/m² (波長範囲 : 290~400nm)

試験方法 : フェンメディファムのメタノール溶液を 0.02M 酢酸緩衝液 pH4 を用いて定容し、フェンメディファム濃度 3.99ppm の試験溶液を調製した。この試験溶液を石英容器に移し、キセノンランプを光源とする冷却装置を備えた光照射装置を用いて試験した。試験温度は光照射試料で 22.9±1.5°C、暗対照試料では 22.3±1.4°Cであった。試料を 0、72.1、166.8、278.8、353.9、425.4 時間後に採取し、2 反復で HPLC (UV) を用いてフェンメディファム濃度を測定した。

結果：

分析結果を表 1 に示した。425.4 時間（17.7 日）後において、フェンメディファムは照射試料で 99.2%、暗対照試料で 97.5%が残存していた。

pH4 の緩衝液中の光分解において、実験条件下 17.7 日間（東京、春換算で、144.7 日間）の光分解で、フェンメディファムは分解しなかった。

表 1 pH4 緩衝液中光分解におけるフェンメディファム濃度

時間[hr]	光照射試料		暗対照試料	
	[mg/L]	[%]	[mg/L]	[%]
0	3.99	100.0	3.99	100.0
72.1	3.87	97.0	3.90	97.7
166.8	3.95	99.0	3.97	99.5
278.8	3.95	99.0	3.99	100.0
353.9	3.95	99.0	3.93	98.5
425.4	3.96	99.2	3.89	97.5

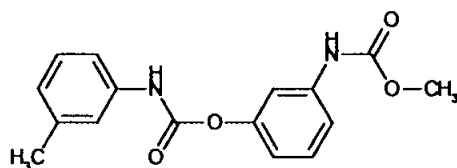
(3a)水中光分解動態試験 (自然水)

(資料：代謝8)

試験機関：

報告書作成年：2004年 [GLP]

供試標識化合物：¹⁴C標識フェンメディファム



()

化学名：3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート
放射化学的純度： 、比放射能：

試験水：滅菌自然水

[採取場所：英国Essex州Ongar, Fyfield Roadの池、採取年月日：2004年7月19日、
pH 8.1]

試験濃度：フェンメディファム 1.14 mg/L (共存溶媒として、メタノール0.15%)

光源及び光強度

光源：キセノンランプ

光強度 [W/m ²]	測定波長 [nm]
410	290~800

試験方法：

試験装置：Suntest

試験系：本試験系は光照射区と暗対照区から構成されている。

・ 光照射区

試験温度：25±2℃

試験容器：石英製、試験水量：18mL

光照射：キセノンランプ光 (290nm以下の波長を除去) を最長5.06日間にわたって照射した。この照射期間は、東京の春期太陽光 (北緯35度、4~6月) の30.04日間に相当する。

・ 暗対照区

試験温度：25±1℃

試験水量：18mL

試験容器：石英製、最長5.06日間にわたって暗所の環境キャビネット内で培養した。

光照射区および暗対照区とも、揮発性物質を捕集するために、揮発性有機物を捕集す

るポリウレタン栓と¹⁴C₂を捕集するソーダ石灰層からなる捕集装置を接続した。

試料採取：次の採取間隔で照射区及び暗対照区から試験水及び揮発性物質捕集装置を採取し、放射能測定及び分解生成物の分析に供した。

採取時点 (照射開始後)	採取した光分解容器及び揮発性物質捕集装置の数	
	照射区	暗対照区
0時間	2	
1.5時間	2	—
3.0時間	2	—
4.5時間	2	—
1日	1	—
2日	1	2
3日	1	—
4日	2	—
5日	2	2

照射開始後0時間～4.5時間に採取した水試料については、採取後のフェンメディファミンの加水分解を抑制するため、酢酸0.5mLを添加した。

揮発性物質捕集装置のポリウレタン栓及びソーダ石灰層は、ポリウレタン栓は酢酸エチルによる超音波浸漬を行い、浸漬液を採取した。ソーダ石灰は三角フラスコに移し、水次いで塩酸を加え、放出される二酸化炭素を水酸化カリウムに吸収させた。

放射能測定：

液体試料（水試料、ポリウレタン栓の酢酸エチル浸漬液及び水酸化カリウム吸収液）を液体シンチレーションカクテルに溶解させ、液体シンチレーションカウンター（LSC）で試料中放射能を測定した。

水試料中の分解物の分析：

逆相カラムを用いた¹⁴C-高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、水試料を分析した。用いたHPLC条件は次のとおりであった。

カラム	Kromasil KR100 5C18 (250×4.6 mm i. d.)		
移動相	A) 水		
	B) アセトニトリル		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	95	5
	4	95	5
	25	20	80
	35	20	80
	40	95	5
	45	95	5
注入量	50~200 μ L		
流速	1mL/min		
UV 波長	239nm		

また [14 C]-HPLCで認められた極性領域のピークを画分収集し、順相の薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。

分解物の同定/特徴付け：

想定分解物の参照物質をマーカーとして使用し、HPLCでの保持時間の比較を行った。
また選択した水試料について、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) で分析した。

試験系の滅菌：

試験に先立ち、試験器具を121 $^{\circ}$ C及び20分間のオートクレーブ処理又はメタノールによる洗浄処理を行った。また自然水は0.22 μ mの滅菌フィルターで濾過して滅菌した。照射開始直後及び終了時、又は照射期間中に採取した試験水 (照射区及び暗対照区) を寒天プレートで一定期間培養し、コロニーの有無で滅菌状態の維持を判断した。培養後にコロニーは認められなかった。

試験結果：

物質収支：

照射区及び暗対照区における物質収支を表1に示す。

物質収支は照射区及び暗対照区とも良好であり、照射区では94.43~102.53% (試験期間を通じた平均値：99.08%)、暗対照区では100.04~101.14% (平均値：100.41%) の範囲にあった。

揮発性物質 (揮発性有機物質及び二酸化炭素) 捕集装置に捕集された放射能は、照射区及び暗対照区とも処理放射能に対して1%以下であった。

表1：物質収支（表中の数値は処理放射能に対する％）

採取時点 (照射開始 後)	光照射区			暗対照区		
	水試料	揮発性物質 捕集装置	合計	水試料	揮発性物質 捕集装置	合計
0時間	100.04	測定せず	100.04	100.04	測定せず	100.04
1.5時間	101.55	0.03	101.58	/	/	/
3時間	102.02	0.03	102.05			
4.5時間	102.50	0.02	102.53			
1日 (*)	99.41	0.09	99.50			
2日 (*)	99.01	0.20	99.21			
3日 (*)	96.26	0.19	96.46	/	/	/
4日	95.73	0.18	95.92			
5日	93.92	0.51	94.43			
試験期間を 通じた平均値	/		99.08	/		100.41

(*) n=1の数値、他の採取時点はn=2の平均値

[¹⁴C]-HPLCによる放射性成分の定量及び経時的推移：

水試料中における放射性成分の経時的推移を表2（光照射区）及び表3（暗対照区）に示した。

光照射区：

フェンメディファムの急速な分解が認められ、照射開始後1日以内に消失した。
 フェンメディファムの消失に伴い、分解物が経時的に増加し、照射開始後1日に処理放射能に対して最高値87.44%となった。はその後減少し、照射開始後5日には3.60%となった。

HPLC分析において、高極性である5種類の未知ピーク (rrt : 0.10~0.17) が認められた。中でも相対保持時間が0.10の未知ピークは経時的に増加し、照射開始後5日には処理放射能に対して最高値68.01%となった。同じく相対保持時間が0.16の未知ピークも、照射開始後5日には処理放射能に対して最高値19.51%となった。これらのピーク（相対保持時間：0.10及び0.16）を採取し、TLCで分析した結果、複数の極性分解物で構成されていた。

暗対照区におけるフェンメディファム及びの消失/生成パターン及び供試した自然水のpHから、未知のピーク及び分解物は何れもフェンメディファムの加水分解物が光分解されて生成したと考えられた。

暗対照区：

フェンメディファムは急速にに分解された。からの分解は認められなかった。

表2：照射区－水試料中での放射性成分の経時的推移

採取時点 (照射開始後)	処理放射能に対する%						
	水試料	フェン メディ ファム	認められた未知ピークの相対保持時間 (rrt)				その他 未知 分解物 (<5%)
0時間	100.04	98.13					1.32
1.5時間	101.55	77.85					0.60
3時間	102.02	67.79					0.33
4.5時間	102.50	50.22					0.27
1日 (*)	99.41	—					—
2日 (*)	99.01	—					4.65
3日 (*)	96.26	—					6.74
4日	95.73	—					4.87
5日	93.92	—					1.63

(*) n=1の数値、他の採取時点はn=2の平均値。

表3：暗対照区－水試料中での放射性成分の経時的推移

採取時点 (照射開始後)	処理放射能に対する%			その他未知分解 物(<5%)
	水試料	フェンメディ ファム		
0時間	100.04	98.13		—
2日	100.05	—		—
5日	101.11	—		0.13

n=2の平均値。

分解物の同定：

LC/MSにより、分解物が同定された。

フェンメディファムのDT50及びDT90 :

光照射区におけるフェンメディファムの減衰に基づくDT50及びDT90値は、次のとおり算出された。

	実験条件下		環境条件下 (北緯35度、春期太陽光)	
	DT50 (日)	DT90 (日)	DT50 (日)	DT90 (日)
フェンメディファム	0.23	0.75	1.36	4.44

フェンメディファムの急速な加水分解のため、暗対照試料のDT50及びDT90値は算出できなかった。

また光照射区における分解物 の水中光分解に基づくDT50及びDT90値は、次のとおり算出された。

	実験条件下		環境条件下 (北緯35度、春期太陽光)	
	DT50 (日)	DT90 (日)	DT50 (日)	DT90 (日)

フェンメディファムの自然水中光分解経路 :

フェンメディファムは自然水中 (pH 8.1) において へと急速に加水分解され、加水分解物 は自然水中で多数の極性物質へと光分解される。

自然水中におけるフェンメディファムの想定分解経路を示す。

自然水中におけるフェンメディファムの推定分解経路

(3b) 水中光分解動態試験 (自然水、極性分解物の特徴付け) (資料: 代謝9)

試験機関:

報告書作成年: 2006年 [GLP]

目的:

フェンメディファムの中光分解動態試験 (資料No. 代謝8、試験機関:) では、光照射区において照射開始後1日以降に高極性を示す未知物質 (高速液体クロマトグラフィー (HPLC) での複数の未知ピーク) が認められた。中でも相対保持時間 (rrt) が 0.10と0.16の未知ピークは、照射開始後3日以降に処理放射能に対して 10%以上生成し、試験終了時点 (照射開始後5日) ではそれぞれ処理放射能に対する最高値68.01%及び19.51%であった。

当試験では、照射開始後3日以降の水試料 (光照射区) を順相カラムを用いた¹⁴C-高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて再分析し、極性分解物の特徴付けを行うことを目的とした。

試験方法:

分析試料: フェンメディファムの中光分解動態試験 (資料No. 代謝8、光照射区) で得た照射開始後3日、4日及び5日の水試料

分析方法: 資料No. 代謝8では、逆相カラムを用いた¹⁴C-HPLCが用いられた。本試験では、資料No. 代謝8と類似した逆相カラムの¹⁴C-HPLC (HPLC方法1) を用いて試料の保存安定性を測定し、水試料を順相カラムの¹⁴C-HPLC (HPLC方法2) に供した。また順相¹⁴C-薄層クロマトグラフィー (TLC) も行った。

本試験で用いたHPLC条件を次に示す。

逆相HPLC (HPLC方法1)

機器	放射能検出器 Ramona Star (Raytest) 付き Agilent 1050
固定相	Phenomenex Kromasil C18、150×4.6mm ; 3.5µm
ガードカラム	Phenomenex Purospher RP18e ; 4×3mm
注入に先立つ試料の希釈	該当無し
注入量	通常、未精製の水試料 50~100µL を注入した。
カラム温度	40°C
流速	1mL/min
溶出方法	グラジエント
溶媒 A	Milli-Q 水 (pH 8 ホウ酸塩緩衝液 28mM)
溶媒 B	アセトニトリル

順相HPLC (HPLC方法2)

機器	放射能検出器 Ramona Star (Raytest) 付き Agilent 1050
固定相	Phenomenex Luna 5 μ フェニルヘキシル、250 \times 4.6mm ; 5 μ m
ガードカラム	Phenomenex C18 (ODS) ; 4 \times 3mm i. d.
注入に先立つ試料の希釈	該当無し
注入量	通常、未精製の水試料又は画分収集した代謝物 15~200 μ L を注入した。
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流速	1mL/min
溶出方法	グラジエント
溶媒 A	0.1%酢酸 Milli-Q 水溶液
溶媒 B	アセトニトリル

試験結果：

分析試料の安定性：

分析試料をHPLC方法1で分析した結果、得られたクロマトグラムは資料No. 代謝8のHPLCクロマトグラムと極めて類似しており、分析試料は長期にわたって安定であったと考えられた。

HPLC方法2による分析結果：

照射区 (照射開始後3日以降) の水試料を HPLC 方法 2 で分析した結果、資料 No. 代謝 8 で認められた極性分解物は適度に分離し、 以外に処理放射能に対して10%以上生成した分解物は認められなかった。

照射開始後3日の照射区-水試料

処理放射能 (AR) に対して18.37%のピークが認められたが、このピーク以外にARに対して10%以上認められたピークは無かった。

TLC分析の結果、ARに対して18.37%を示したピークは (ARの16.51%) 及び高極性の分解物 (ARの1.9%) で構成されていた。

照射開始後4日の照射区-水試料

処理放射能 (AR) に対して11.33%のピークが認められたが、このピーク以外にARに対して10%以上認められたピークは無かった。

TLC分析の結果、ARに対して11.33%を示したピークは6種類の微量分解物 (何れもARに対して4%未満) で構成されていた。

照射開始後5日の照射区-水試料

処理放射能 (AR) に対して10%のピークは認められず、個別ピークの値は最高でARに対して5.45%であった。

5. 土壌吸着試験

¹⁴C 標識フェンメディファムの土壌吸着

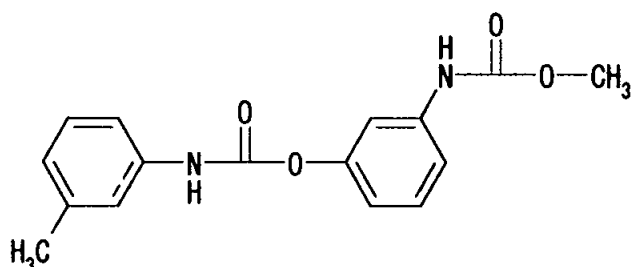
(資料：代謝 10)

試験機関：

報告書作成年：2010年[GLP]

供試標識化合物：

-¹⁴C 標識フェンメディファム



** ¹⁴C 標識位置

化学名： 3-メトキシカルボニルアミノフェニル-N-(3'-メチルフェニル)カーバメート

比放射能：

放射化学的純度：

化学的純度：

供試土壌：下記 5 種土壌を検討したが、Dollendorf II 土壌（土壌Ⅲ）ではフェンメディファムが不安定であったため予備試験のみで本試験には用いなかった。また、Hofchen am Hohenseh 土壌（土壌Ⅱ）は殺菌剤（HgCl₂）50ppm を試験系に添加して実施した。

表 1 供試土壌の性状

番号	I	II	III	IV	V
土壌名	Wurmwiese	Hofchen am Hohenseh	Dollen- dorf II	Laacher Hof AXXa	Hanscheid erHof
土性 [USDA]	壤土	シルト質 壤土	埴壤土	砂壤土	壤土
砂 [2000-50 μm]	51	27	31	72.5	35
シルト [50-2 μm]	28	54	38	18.1	50
粘土 [<2μm]	21	19	31	9.3	15
pH: 水	5.5	6.8	7.4	6.7	5.8
CaCl ₂	5.3	6.6	7.3	6.2	5.6
有機炭素 (%)	1.76	2.42	4.72	1.84	3.1
有機物 (%)*	3.03	4.17	8.14	3.13	5.33

CEC (meq/100 g 土壌)	10.8	13.9	21.9	9	10
OECD 土壌分類**	3 または 4 に類似	3 に類似	2 に類似	5 に類似	4 に類似

* 有機物%は有機炭素%×1.724 で計算

** : 申請者記載

【方法】:

予備試験を実施して、被験物質の 0.01M CaCl₂ 中における安定性、及び適切な土壌/溶液比、平衡化時間の確認を行った。

表 2 本試験の条件

	Wurmwiese (土壌 I)、 Laacher Hof AXXa (土壌 IV)、 Hanscheider Hof (土壌 V) 土壌	Hoefchen am Hohenseh (土壌 II) 土壌
土壌/溶液比	1/20	1/50
吸着平衡化時間	24 時間	4 時間
殺菌剤 (HgCl ₂) の添加	非添加	添加
温度	20±2°C	
光条件	暗黒下	

全ての試験系において水相中のフェンメディファムは不安定であったので、放射エネルギーの他に、水相中及び土壌中のフェンメディファム量を HPLC 測定した。

【結果】

1. 予備試験

(1) 0.01M CaCl₂ 中の安定性及び容器への吸着性

0.01M CaCl₂ 溶液中の 96 時間後のフェンメディファム残存量は 98.0% より高く、安定であった。また容器表面への吸着も無かった。

(2) 土壌/溶液比

振とう時間 24 時間、3 種の土壌/溶液比 (1/1、1/2、1/10) で予備試験を実施したところ、土壌/溶液比 1/10 で 78.6~89.6% の吸着率が得られた。本

試験では 50~80%の吸着率を目標とすることが推奨されていることから、土壌 I、IV、V では土壌/溶液比 1/20、土壌 II では 1/50 で本試験を実施した。

(3) 吸着平衡化時間

土壌/溶液比 1/20、2~96 時間の振とう時間で予備試験した結果、平衡化時間を土壌 I、IV、V では 24 時間とした。分解が速かった土壌 II では殺菌剤を添加し、土壌/溶液比 1/50、2~24 時間の振とう時間で確認した結果、4 時間とした。

表 3 平衡化時間を求めるための水相中の放射能濃度測定 2~120 時間
(殺菌剤非添加；土壌/溶液比 1/20)

土壌	時間								
	2hr	4hr	6hr	24hr	30hr	48hr	72hr	96hr	120hr
	濃度 [mg/L]								
I	0.49	0.47	0.46	0.41 (0.41)	0.39	0.38 (0.38)	0.36 (0.27)	0.35 (0.20)	*
II	0.4	0.38	0.37	0.33 (0.25)	0.32	0.31 (0.18)	0.30 (0.13)	*	*
III	0.29	0.27	0.27	0.25 (0.14)	0.25	0.25 (0.10)	0.25 (0.07)	*	*
IV	0.48	0.46	0.45	0.37 (0.35)	0.39	0.36 (0.32)	0.36 (0.20)	0.40 (0.14)	*
V	0.32	0.3	0.27	0.22 (0.22)	0.22	0.20 (0.19)	0.20 (0.15)	0.20 (0.12)	*

() 内は HPLC 測定によるフェンメディファム濃度、その他は放射能濃度

表 4 平衡化時間を求めるための水相中の放射能濃度測定 2~24 時間
(殺菌剤添加；土壌/溶液比 1/50)

土壌	時間			
	2hr	4hr	6hr	24hr
	濃度 [mg/L]			
II	0.68 (0.64)	0.65 (0.52)	0.64 (0.61)	0.60 (0.51)
III	0.61 (0.44)	0.60 (0.34)	0.58 (0.30)	0.60 (0.12)

() 内は HPLC 測定によるフェンメディファム濃度、その他は放射能濃度

2. 本試験

(1) 総放射能回収率（振とう 24 時間後）

Wurmwiese（土壌Ⅰ）、Hoefchen am Hohenseh（土壌Ⅱ）、Laacher Hof AXXa（土壌Ⅳ）、Hanscheider Hof（土壌Ⅴ）それぞれで、処理放射エネルギーに対して、95.4-99.9%、95.8-100.6%、90.9-100.1%及び94.4-97.9%であった。

(2) 吸着率

本試験の吸着試験で処理した被験物質の 59.0-82.2%、32.5-56.8%、63.3-86.9%及び75.6-91.5%が Wurmwiese、Hoefchen am Hohenseh、Laacher Hof AXXa、Hanscheider Hofそれぞれで吸着された。

表 5 各土壌における吸着率

	I Wurmwiese	II Hoefchen am Hohenseh	IV Laacher Hof AXXa	V Hanscheider Hof
吸着率 [%]	59.0~82.2	32.5~56.8	63.3~86.9	75.6~91.5

(3) 吸着係数

得られたデータからフロイントリッヒの吸着係数を直線近似により求めた。土壌により、 $K_F^{(ads)}$: 24.2、22.2、29.8、47.6、 $K_{F,oc}^{(ads)}$: 1375、918、1617、1534 の値が得られた。

表 6 各土壌の吸着係数

	I Wurmwiese	II Hoefchen am Hohenseh	III Dollendorf II	IV Laacher Hof AXXa	V Hanscheider Hof
土性 (USDA)	壤土	シルト質 壤土	埴壤土	砂壤土	壤土
pH (0.01M CaCl ₂)	5.3	6.6	7.3	6.2	5.6
有機炭素 [%]	1.76	2.42	4.72	1.84	3.1
$K_F^{(ads)}$ [mL/g]	24.2	22.2	*	29.8	47.6
1/n	0.785	0.8022	*	0.7732	0.7885
$K_{F,oc}^{(ads)}$ [mL/g]	1375.5	918.2	*	1617.8	1534.8

* Dollendorf II 土壌は土壌中で被験物質が不安定であったため、本試験から除外した。

6. 生物濃縮性に関する試験

(1) ブルーギルを用いた魚類濃縮性試験

(資料：代謝 11)

試験機関：

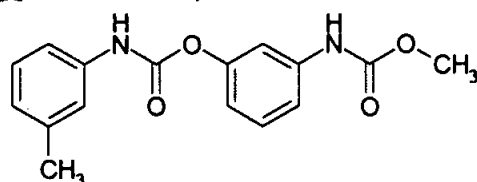
[GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

被験物質：放射能標識フェンメディファム

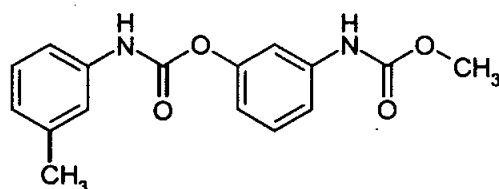
① [¹⁴C]-標識フェンメディファム

(放射化学的純度)



② [¹⁴C]-標識フェンメディファム

(放射化学的純度)



及び 非標識フェンメディファム (純度)

供試生物：ブルーギル(学名 *Lepomis macrochirus*)、各サンプリング時毎に 1 群
各 5 匹、

試験開始時；体重：0.42(0.14~1.30) g、体長 26.6(19.9~37.6) mm

試験終了時；体重：0.84(0.53~1.45)g、体長 33.2(28.9~38.4) mm

方 法：

暴露条件；連続流水式。試験容器は 88 L 容量ガラスタンクを、希釈水は脱塩
素した水道水を用いた。

試験期間；10 日間試験水に暴露し、その後 6 日間回復(排泄)期間を設けた。

試験濃度区；設定濃度 0.03mg a. i. /L

試験液の調製；被験物質を 1500mg/mL の設定濃度で アセトンに溶解したストック溶液を調製し、これを注入ポンプを用いて希釈水と混合した。ストック溶液の流入速度は 0.01mL/分、希釈水の流入速度は 500mL/分でありアセトンの最終濃度は 約 2.0µg/L であった。

環境条件；水温 21.5-22.7°C、pH6.5-7.0、溶存酸素 8.0-9.0ppm、室内蛍光灯による明暗サイクル 12 時間明、12 時間暗

観察及び測定；

魚の生死及び症状；毎日観察した。

試験水の測定；平衡化段階の3日間及び取込期間中0、1、2、3、4、6、7、10日に放射能濃度を測定し、一部については未変化体の濃度も測定した。

魚体の測定；取込期間の4時間後、1、3、7及び10日と、排泄期間の1、2、4及び6日、5匹の魚を採取し総放射能を測定した。また、魚組織中フェンメディファム代謝物の特性化のために、取込期間終了時の10日目に各試験水槽から20匹の魚を採取し、魚組織中の放射性残留を抽出しHPLC及びTLCにて分析した。

結果；暴露に関連した所見はみられなかった。以下に濃縮性に関する結果を示す。

(1) 魚体中の放射能濃度 (mg 換算/kg湿重量)

試験区		取込期間 (日)						排泄期間 (日)			
		0	1	3	7	10	1~10 平均	1	2	4	6
標識体	内臓	10.82	43.97	56.87	34.05	28.80	40.92	6.16	1.49	1.00	0.78
	筋肉	1.6	0.37	0.45	0.53	0.61	0.49	0.37	0.32	0.31	0.25
	カーカス	13.21	1.00	1.22	1.76	1.84	1.46	1.17	1.25	1.21	0.99
	魚体全体	10.83	4.52	5.75	4.49	4.00	4.69	1.39	1.08	0.98	0.80
標識体	内臓	11.55	53.93	44.34	32.26	49.40	44.98	15.21	4.87	0.29	0.21
	筋肉	0.87	0.31	0.30	0.25	0.33	0.298	0.05	0.01	<0.01	<0.01
	カーカス	6.43	1.02	0.75	0.88	0.87	0.88	0.19	0.15	0.09	0.07
	魚体全体	5.85	5.20	4.82	3.75	4.59	4.59	1.25	0.51	0.09	0.07

0日は暴露4時間後の測定値。数値は5匹の平均値。

取込期間 1 日後に魚体中フェンメディファム濃度は平衡に達し、筋肉中への蓄積性はほとんど認められなかった。蓄積した残留物の大部分が排

排泄期間中に消失し、排泄期間 4 日後には内臓中のほとんど全ての放射能 (>97%)、魚体全体では 89%が消失した。

(2) 試験水中の放射能及び被験物質濃度 (mg/L)

試験期間	日	標識体		標識体	
		放射能	未変化体	放射能	未変化体
平衡化 段階	3日前	0.0197	0.0175	0.0309	0.0245*
	2日前	0.0216		0.0302	
	1日前	0.0227		0.0303	
取り 込み 期間	0	0.0263	0.023	0.0307	0.027
	1	0.0246	0.019	0.0299	0.026
	2	0.0275	-	0.0313	-
	3	0.0277	-	0.0307	-
	4	0.0241	-	0.0312	-
	6	0.0240	-	0.0324	-
	7	0.0240	0.014	0.0316	0.021
	10	0.0265	0.018	0.0323	0.021
	平均 0-10	0.0256	0.0185	0.0313	0.0238

*報告書に記載がないため申請者が算出した平均値

いずれの部位を放射性標識した場合も被験物質は加水分解を受けていることが示され、
 内臓では約28%、
 魚体全体では約24%が分解していた。

(3) 魚体中濃度

魚体における総放射能が定常状態に達した後の 1~10 日間の各部位の総放射能濃度の平均値を以下に示す。

試験区	魚体中濃度 (mg/kg)			
	内臓	筋肉	カーカス	魚体全体
標識体	40.92	0.49	1.46	4.69
標識体	44.98	0.298	0.88	4.59

(4) 魚体中放射性残留の解析

取り込み10日目に20匹を採取し魚組織中の放射性残留を抽出しHPLC及びTLCにて分析した。

その結果、いずれの部位でも親化合物はほとんど認められず、極性の高い

が遊離体あるいは抱合体で存在し、親化合物が酸化あるいは水酸化で分解されることが示唆された。そのほかの多数の代謝物については残留レベルが低いことから、これ以上の解析は不可能であった。

(5) 濃縮係数

魚体中に親化合物はほとんど認められなかったため、生物濃縮係数は、1～10日間の取り込み期間の各部位の総放射能濃度の平均値を、取り込み期間の0～10日の試験水中の総放射能濃度の平均値で除して算出した。

BCF_{ss} (1～10日)

試験区	水中濃度 (ng/L)	濃縮係数							
		内臓		筋肉		カーカス		魚体全体	
標識体	0.0256	1599	平均	19.1	平均	57	平均	183	平均
標識体	0.0313	1437	1518	9.5	14	28	43	147	165

(2) ニジマスを用いた魚類濃縮性試験

(資料：代謝 12)

試験機関：

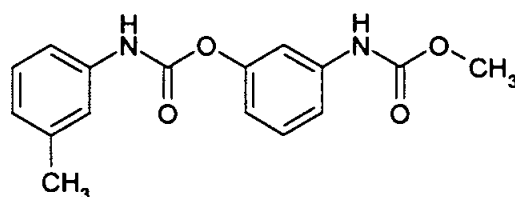
[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

供試標識化合物

化学名：メチル-N-(3-[N' (3'-メチル-フェニル)カルバモイルオキシ]-フェニル)カルバミン酸

化学構造：



*：標識部位

標識：	[⁻¹⁴ C] PMP
比放射能	
放射化学的純度：	

供試生物：

ニジマス (*Salmo gairdneri* Rich.)、試験施設で試験前の 2 週間馴化後に使用

試験群及び試料採取：

表 1 に示す流水条件 (300 L/日) で以下の濃度の [⁻¹⁴C] PMP を含む試験水に曝露した。曝露開始後、下表に示す時間にそれぞれの試験区から各 10 匹のニジマスを採取した。試験水についても同じ間隔で採取した。曝露開始 64 時間以降は無処理の水を流水する排泄期間とした。

試験期間中の水温は 15~16℃ とし、12~16 時間の明条件とした。

試験群	試験水中濃度	開始時匹数	体長 (cm)	曝露期間 (曝露後時間)	排泄期間 (曝露後時間)
高濃度群	0.2 mg/L	106	1.4±0.7	5、11、21、43 及び 64	96、128、160 及び 192
低濃度群	0.02 mg/L	115	1.7±0.4	5、11、21、43 及び 64	96、128、160 及び 192

分析：

各採取時点に 10 匹の魚を採取後、速やかに屠殺した。そのうち、5 匹を可食部と非可食部に分け、それぞれを秤量し、細胞溶解液で溶解後、放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定した。

魚の採取時にそれぞれの水槽から 100 mL の水を採取し、分析まで凍結保存した。水をジクロロメタンで分配し、濃縮後、放射エネルギーを LSC で測定した。また、異なる展開溶媒 2 種を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)により試験水中の分解物を同定した。

結果：

1. 試験系の維持；

試験期間中、pH、水温及び溶存酸素濃度は、それぞれ下記の範囲で比較的一定に保たれていた。pH: 7.6~8.2、水温: 15.0°C~16.0°C及び溶存酸素濃度: 8.4~9.5 mg/L

2. 試験水中の被験物質濃度

取り込み期間中の試験水中被験物質濃度は低濃度群(設定濃度: 0.020 mg/L)及び高濃度群(設定濃度: 0.20 mg/L)でそれぞれ 0.019 ± 0.002 mg/L 及び 0.184 ± 0.004 mg/L であった。排泄期間中の試験水からは被験物質は検出されなかった。以下に試験期間中の放射能濃度を示す(表 1)。

試験水中の放射性成分について、低濃度群は濃度が低く分析できなかったため、高濃度群のみの試験水を 21 及び 64 時間後について調べた。その結果、未変化のフェンメディファムは 21 時間後で 6.1%そして 64 時間後で 7.3%とその残存割合は低く、大部分が

と同定され、試験水中でフェンメディファムは不安定であることが明らかであった。

表 1 試験水中の放射能濃度 (mg/L)

	採取時間 (時)	低濃度群(0.02 mg/L)*	高濃度群 (0.2 mg/L) *
取り込み期間	0	0.019	0.186
	0.5	0.017	0.183
	1	0.018	0.180
	1.5	0.017	0.180
	5	0.017	0.182
	11	0.018	0.188
	21	0.021	0.191
	43	0.019	0.186
	64	0.021	0.182
	平均	0.019	0.184

* 括弧内に設定濃度を示す。

表 2 試験水中の放射能の分布 (%)

採取時間 (時)	成分	分布割合
21	フェンメディファム	6.1
	未同定成分	5.0
64	フェンメディファム	7.3
	未同定成分	n. d.

n. d. : 検出せず

3. 取り込み期間中の魚体中の放射能濃度

魚体中の可食部及び非可食部ならびに魚体全体中における残留濃度を有効成分換算濃度で表 3 に示す。対照の無処理区の魚体中から放射能は検出されなかった。低濃度群(設定濃度: 0.020 mg/L)及び高濃度群(設定濃度: 0.20 mg/L)のいずれでも魚体中濃度は速やかに定常状態に達し、低濃度群では 11 時間後、高濃度群では 21 時間後に定常状態に達した。定常状態以降の魚体全体における被験物質濃度は低濃度群で約 6 mg/kg、高濃度群で約 22 mg/kg であった。

表 3 魚体中の放射能濃度 (mg/L)

採取時間 (時)	低濃度群 (0.02 mg/L) *			高濃度群 (0.2 mg/L) *		
	可食部	非可食部	魚体全体	可食部	非可食部	魚体全体
5	1.657	5.258	3.758	8.690	9.771	9.393
11	3.487	7.924	6.322	18.191	11.710	14.617
21	3.334	5.915	5.159	14.332	25.234	21.391
43	3.700	9.005	7.071	16.394	31.659	26.126
64	3.545	7.093	5.837	8.331	30.001	19.524
定常後の平均 [#]	3.517	7.484	6.097	14.312	28.965	22.347

* 括弧内に設定濃度を示す。

低濃度群では 11 時間後以降、高濃度群では可食部で 11 時間以降、非可食部及び魚体全体では 21 時間以降の濃度より算出。

4. 排泄期間中の魚体中の放射能濃度

魚体中の可食部及び非可食部ならびに魚体全体中における残留濃度を有効成分換算濃度で表 4 に示す。被験物質の曝露を停止後の魚体中からの被験物質の排泄は速やかであり、試験開始 96 時間後(曝露停止 32 時間後)には、低濃度群(設定濃度: 0.020 mg/L)及び高濃度群(設定濃度: 0.20 mg/L)のいずれでも魚体中濃度は曝露終了時の魚体中濃度の 10%未満となった。

表 4 魚体中の放射能濃度 (mg/L)

採取時間 (時)	低濃度群 (0.02 mg/L) *			高濃度群 (0.2 mg/L) *		
	可食部	非可食部	魚体全体	可食部	非可食部	魚体全体
64	3.545	7.093	5.837	8.331	30.001	19.524
96	0.194	0.240	0.221	0.323	2.060	1.411
128	0.049	0.084	0.070	0.233	0.173	0.189
160	0.039	0.073	0.060	0.103	0.216	0.172
192	0.038	0.055	0.049	0.088	0.174	0.141

* 括弧内に設定濃度を示す。

5. 濃縮係数(BCF)

取り込み期間中の試験水中の平均放射能濃度及び定常状態における魚体中平均濃度から濃縮係数 BCF を総放射能濃度に基づいて算出した(表 5)。可食部、非可食部及び魚体全体での BCF はそれぞれ低濃度群で 185、394 及び 321 であり、高濃度群で 78、157 及び 121 であった。フェンメディファムの魚における生物濃縮係数は総放射能に基づき、121~321 と求められた。

表 5 フェンメディファムの生物濃縮係数

	低濃度群			高濃度群		
	可食部	非可食部	魚体全体	可食部	非可食部	魚体全体
生物濃縮係数	185	394	321	78	157	121

代謝分解のまとめ

フェンメディファムの動物、植物、土壌、水中における代謝、分解、残留の要約は下記のとおりであり、代謝分解経路を代-77 頁に、結果の概要を代-78 頁に示した。

動物：

^{14}C 標識フェンメディファムを経口投与し、ラットにおける代謝を試験した。尿排泄量から求めた吸収率は低用量 (20 mg/kg 体重) において約 48 ~74%、高用量 (1000 mg/kg 体重) においては 10% 程度であった。主排泄経路は尿であり、24 時間以内に大部分が排泄された。糞中の放射エネルギーは約 12~44% であった。呼気中への排泄はほぼ認められず ND~0.04% であった。

投与 96 時間後における各臓器及び組織への残留は、 ^{14}C 標識ではカーカスを除き検出限界未満であった。 ^3H 標識ではより多く残留したが血液、血漿における残留が最も高かった。

尿中の主要代謝物は
であった。その他に

等も認められた。少量代謝物として
が認められ、中間代謝物として
が推定されている。糞中の主要代謝物は未変化のフェンメディファムであった。

フェンメディファムの類似化合物にデスメディファムがあり、両者の構造、物化性、生物活性、及び代謝は類似していると考えられる。

植物：

てんさい：

(資料代謝 3)： ^{14}C 標識フェンメディファムを葉面処理したてんさいを用いて試験した。メタノールによる表面洗浄、その後にアセトン抽出してクロロホルム及び水/メタノールの間で分配した。表面洗浄液中の放射エネルギーは処理 48 時間後には 38.3%、7 日後には 13.4% に減少した。これに対して抽出液のクロロホルム相の放射エネルギーは処理 4 日後に 49.6% に増加した後、60 日後には 0.3% に減少した、水/メタノール相は経時的に増加し、7 日後には 54.1%、60 日後には 70.5% であった。

てんさい葉部における代謝物として、未変化のフェンメディファム [I] が最も多く、他に代謝物として

が認められた。

てんさい根部の放射エネルギーは検出限界未満であった。

(資料代謝 13 及び 14) : ^{14}C 標識フェンメディファムを散布処理したてんさいを用いて試験した。採取した試料の総残留量は、処理 19 日後の茎葉で約 20~30 mg/kg、137 日後の収穫期の茎葉で 0.121~0.122 mg/kg、根部で 0.075~0.105 mg/kg であった。

親化合物フェンメディファムが主要な残留物であり、生育期の茎葉では 76.2~83.5% (約 16~23mg/kg)、収穫期の茎葉で 23.7~41.6% (0.029~0.051 mg/kg)、収穫期の根部で 4.6% (0.003 mg/kg) であった。少量代謝物として生育期の茎葉では

が認められ、収穫期の茎葉では
が認められた。収穫期の根部では
が認められた。その他に糖と思われる成分が認められ、生体成分への取り込みの可能性が示唆された。

資料代謝 3 で認められた代謝物

いちご : 標識 ^{14}C フェンメディファムを花序出現前のいちごへ散布処理し、49 日後に果実を採取し、分析した。果実における残留はフェンメディファム [I] が最も多く 0.0413 mg/kg (51.1%TRR)、次いで
であった。

土壌 :

標識 ^{14}C -フェンメディファムを用いて、好気、嫌気、滅菌条件下の土壌を用いて試験した。好気条件下においては継続的に CO_2 が発生し、60 日後には 14.4% となった。結合性残渣も次第に増加し、60 日後には 69.7% であった。滅菌土壌では CO_2 の発生は無く、結合性残渣も最大で 10.3% であった。滅菌条件では CO_2 はほぼ一定であったが、結合性残渣は次第に増加した。

好気条件下ではフェンメディファムは速やかに分解し、
が認められた。嫌気条件下においても
が認められ、好気条件下と比較して緩やかであるが減少した。滅菌土壌におけるフェンメディファムの分解は非滅菌土壌と比較して有意に遅く、
が主要分解物として認められたが、減少せず、フェンメディファムと
でほぼ処理放射能の 90% を占め、残りは結合性残渣が約 10% であった。

フェンメディファムの好気条件土壌における DT50 は 12.5 日であった。

4種の土壌を用いてフェンメディファムの吸着試験が実施され、 $K_{ndsF_{oc}}=918\sim 1617$ であった。

水中：

pH 4、5、7、9の緩衝液中で加水分解試験を行った結果、揮発性物質は認められず、分解物はのみであった。フェンメディファムは定量的にに分解した。分解速度はアルカリ性になるほど速く、各pHにおけるDT50はそれぞれ、259日(pH4)、47日(pH5)、12時間(pH7)であった。

pH4緩衝液中における光分解試験では、実験条件下17.7日間(春季東京換算で144.7日間)フェンメディファムは安定であった。滅菌自然水(pH8.1)を用いた光分解試験では、揮発性物質は認められず、主要分解物としてが最大87.44%(1日後)認められ、その他に高極性の複数の未同定分解物が認められた。暗対照試験ではフェンメディファムは定量的にに分解した。フェンメディファムのDT50は実験条件下で0.23日、春季東京換算で1.36日であり、のDT50は実験条件下で1.05日、東京(4-6月)換算で6.2日であった。

生物濃縮性：

ブルーギル及びニジマスを用いた生物濃縮性を検討した。ブルーギルでは¹⁴C標識フェンメディファム(取り込み期間：1, 3, 7及び10日、排泄期間：6日間)での濃度0.03mg/Lにおける濃縮係数、ならびにニジマスのメチルフェニル¹⁴C標識体(取り込み期間：5, 11, 21, 43及び64時間、排泄期間：128時間)での高低2試験濃度(0.02及び0.2mg/L)における濃縮係数は次のとおりであった。

ブルーギル(暴露濃度0.03mg/L)

試験区	水中濃度 (mg/L)	魚体中濃度 (mg /kg)				濃縮係数							
		内臓	筋肉	カカス	全体	内臓		筋肉		カカス		全体	
標識体	0.0256	40.9	0.49	1.46	4.69	1599	平均	19.1	平均	57	平均	183	平均
標識体	0.0313	45.0	0.30	0.88	4.59	1437	1518	9.5	14	28	43	147	165

ニジマス (標識体)

試験区 (mg/L)	水中濃度 (mg/L)	魚体中濃度 (mg /kg)			濃縮係数		
		可食部	非可食部	全体	可食部	非可食部	全体
0.02	0.019	3.517	7.484	6.097	185	394	321
0.2	0.184	14.312	28.965	22.347	78	157	121

以上。

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

