

(2) スピネトラムのカブにおける代謝試験

(資料 II-2)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

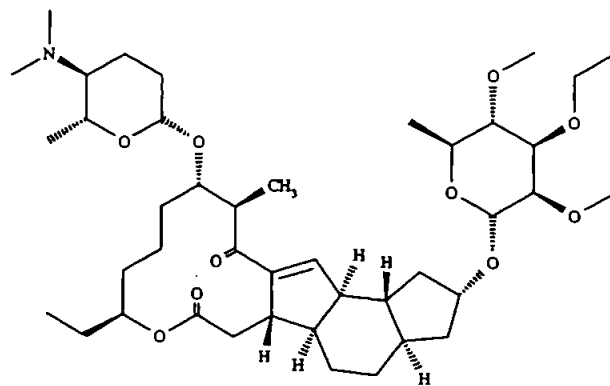
報告書作成年：2005年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

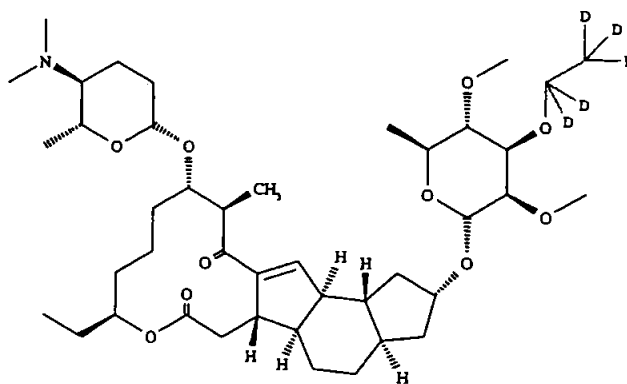
^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2) の混合物 (約 1:1:1 (w/w/w))；

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5) の混合物 (約 1:1 (w/w))；

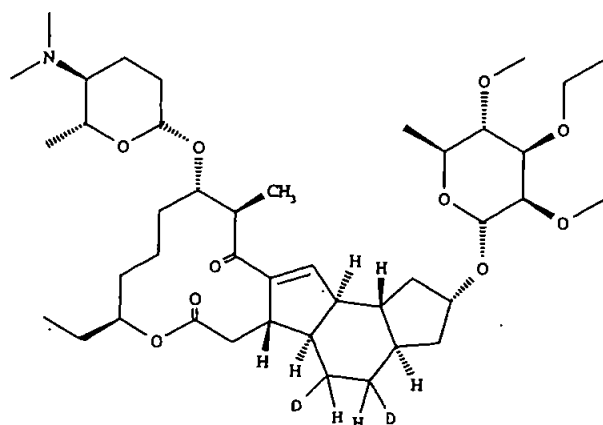
構造式：



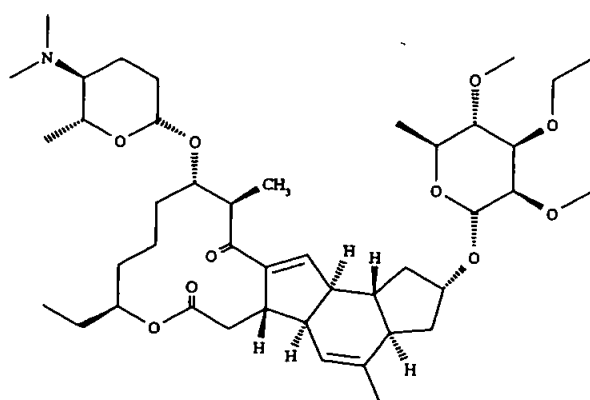
^{14}C -スピネトラム-J



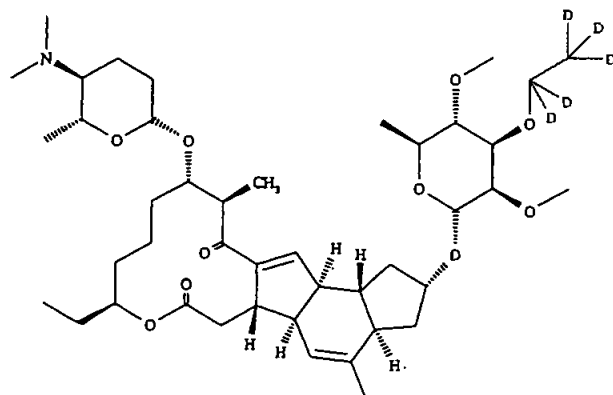
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



¹⁴C-スピネトラム-J (D2)



¹⁴C-スピネトラム-L



¹⁴C-スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxyl-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-as-indaceno [3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxyl-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-as-indaceno [3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物：カブ（品種：Purple Top White Globe）

栽培条件：戸外に設置したプラスチック製ポットに種子を播き、¹⁴C-スピネトラム乳剤を1回処理あるいは3回処理を行った。ポットに使用した土壌は、有機物含量1.0%、pH7.4の砂壤土（砂63%、シルト24%および粘土13%）であった。

方 法：

被験物質の調製： 処理前に、¹⁴C-スピネトラム-J 混合物および ¹⁴C-スピネトラム-L 混合物をそれぞれ乳剤の空製剤に溶解し、乳剤として製剤化した。

処理方法： ポットに、スピネトラム-J を 900g/ha で、スピネトラム-L を 300 g/ha で茎葉処理した。1 回処理を行うポットでは、この被験物質質量全部を 1 度に処理し、3 回処理を行うポットでは、同量を 3 等分し、7 日間隔で処理した。処理は CO₂ 使用加圧式単一ノズル研究用散布器を用いて、ポット植えの葉に散布することにより行った。

試料採取時期： 1 回処理を行ったポットからは、処理後 0、0.25、1、3 および 7 日目に試料（カブ植物）を採取した。3 回処理を行ったポットからは、最終処理後 3 および 7 日目に試料を採取した。植物をポットから引き抜き、静かに振って根から土壌を除去した後、上部を塊根の直ぐ上で切り取り、試料をカブ上部と根部に分けた。

分析方法： 各試料中の残留放射能の抽出および分析に用いた方法の詳細なフローチャートを図 1～6 に示す。抽出の概要は以下のとおりである。カブ上部試料は一連の溶媒で表面洗浄に供し、その後洗浄した試料について、残存した放射能を回収するために水/有機溶媒混合液中でホモジナイズした。洗浄液は直接 HPLC で分析した。抽出液は中性ならびに酸性条件下、有機溶媒にて液/液分配を行い有機溶媒可溶性画分（中性、酸性）と水溶性画分に分画した。残留量により有機溶媒可溶性画分と水溶性画分を HPLC 分析に供した。また別途、表面洗浄液および抽出液のいずれかの画分をあわせた混合物を調製し、これらの試料をシリカカラム分析に供した後、一部のシリカカラム画分を HPLC 分析することにより、更なる化学的特徴付けを行った。結合放射能が十分量に存在する採取時点の遅い試料の抽出残渣を酸性条件にて抽出および還流を行った。その抽出液については分配抽出を行い、有機溶媒可溶性の放射能の HPLC 分析に供し、更なる残留物の化学的特徴付けを行った。カブ根部試料は水/有機溶媒混合液中でホモジナイズし、抽出液は中性ならびに酸性条件下、有機溶媒にて液/液分配を行い有機溶媒可溶性画分（中性、酸性）と水溶性画分に分画した。残留量により有機溶媒可溶性画分と水溶性画分を HPLC にて分析した。また、抽出液のいずれかの画分をあわせた混合物を調製し、これらの試

料をシリカカラム分析に供した後、一部のシリカカラム画分を HPLC 分析することにより、更なる化学的特徴付けを行った

代謝物の同定：スピネトラム-J、N-demethyl-175-J および N-formyl-175-J の同定は逆相 HPLC を用いた標品とのクロマトグラフィーにより行った。最終的な構造の確認は LC-MS 分析により実施した。スピネトラム-L、N-demethyl-175-L および N-formyl-175-L についても同様にして同定を行った。シリカカラム画分の一部についても LC-MS 分析に供し、分子式の推定を試みた。

結果：

^{14}C 分布：試料中の放射能分布を表 1 および 2 に示す。

スピネトラム-J を 1 回処理したカブ上部における総放射能残留量 (TRR) は、スピネトラム-L を処理した同様の試料における量より顕著に高かった。処理後 7 日目までに採取したスピネトラム-J で処理したカブ上部試料の残留量は 4.874~11.781 mg/kg であり、スピネトラム-L で処理したカブ上部試料の残留量は、1.128~5.340 mg/kg であった。スピネトラム-J およびスピネトラム-L のいずれで処理した場合も、3 回処理したカブ上部試料の TRR は 1 回処理で認められた量より低かった。スピネトラム-J を処理したカブ上部試料は TRR の 86.3~99.3% が、スピネトラム-L を処理したカブ上部試料は TRR の 73.5~97.3% が、ジクロロメタン洗浄液、アセトニトリル洗浄液および有機溶媒可溶性画分中に認められた。水溶性画分では TRR の 8.6% を越えることはなかった。

処理後 7 日目までに採取したスピネトラム-J を処理したカブ根部試料の残留量は 0.004~0.123 mg/kg であり、スピネトラム-L を処理したカブ根部試料の残留量は、0.004~0.031 mg/kg であった。スピネトラム-J およびスピネトラム-L で処理した根部試料は残留量において特別なパターンは示さず、1 回および 3 回処理間に顕著な差は認められなかった。スピネトラム-J を 1 回処理後 1 および 3 日目のカブ根部試料は、TRR の 87% 以上が有機溶媒可溶性画分に認められ、水溶性画分は TRR の 2% を超えることはなかった。3 回処理後 7 日目の根部試料では TRR の 59.1% が有機溶媒可溶性画分に認められ、TRR の 6.8% が水溶性画分であった。スピネトラム-L を処理したカブ根部試料では、スピネトラム-J 処理に比べて抽出される放射能に大きな違いはなかった。

代謝：試料中の代謝物の分布を表 3 および 4 に示す。

スピネトラム-J の 1 回処理のカブ上部試料では、処理後 0.25 日目の試料中に TRR の 60% 以上が、スピネトラム-J および、N-demethyl-175-J、N-formyl-175-J として存在した。処理後 3 日目の試料においても、これら 3 成分が TRR の 29% 認められ、2 種の主要代謝物の合計値は親化合物の 2 倍以上の量となった。3 回処理後 3 日目の試料では、これら 3 成分は TRR の 20% 以上を占め、N-formyl-175-J が主要成分であった。スピネトラム-L のカブ上部試料については、親化合物および 2 個の代謝物 (N-demethyl-175-L およ

びN-formyl-175-L)の残留量および残留割合(%TRR基準)は、概してスピネトラム-Jの場合と比較してかなり低かった。0.25日目にはTRRの27.5%がこれら3成分であったが、処理後3日目の1回処理試料中にはTRRの4.5%、処理後3日目の3回処理試料中にはTRRの4.6%に減少した。スピネトラム-L試料については、放射能の大部分がシリカカラムの極性部分に溶出される多成分の複合混合物であった。

スピネトラム-Jの1回処理後3日目のカブ根部試料では、親化合物および2個の代謝物(N-demethyl-175-JおよびN-formyl-175-J)がTRRのほぼ50%を占め、多成分の複合混合物がTRRのほぼ10%であった。スピネトラム-Lの1回処理後3日目のカブ根部試料では、親化合物および代謝物N-formyl-175-LがTRRの17.8%を占め、多成分の複合混合物がTRRの13.1%であった。

抽出残渣(結合放射能): 抽出残渣の分析結果を表5に示す。

スピネトラム-Jおよびスピネトラム-Lを処理したカブの上部および根部の両方において、結合放射能の経時的増加する傾向が認められた。しかし、根部については、結合放射能の絶対量が少なかったため(0.034 mg/kg以下)、更なる化学的特徴付けは実施しなかった。カブ上部における抽出残渣の化学的特徴付けは、最大の残留量を示した3回処理の処理後3日目の試料を代表例として実施した。0.1N塩酸を用いた穏やかな抽出操作の後に、1N塩酸を用いて還流した結果、抽出残渣中の放射能の約50%が溶出された。得られた酸性水層を有機溶媒で分配抽出したところ、両化合物において、有機層にはTRRの0.5~2.1%の放射能が認められた。有機層をHPLC分析に供したところ、スピネトラム-J処理試料では、スピネトラム-JおよびN-demethyl-175-J(ともにTRRの0.1%未満)が認められたが、スピネトラム-L処理試料では、標品と一致するピークは検出されなかった。有機層中の放射能の大部分は多成分からなる複合混合物であり、その中にTRRの0.1%を超える成分は認められなかった。

代謝経路: スピネトラム-Jの予想代謝経路を図7に、スピネトラム-Lの予想代謝経路を図8に示す。スピネトラムの代謝には、2種の代謝経路が関与していると考えられる。1つ目は、forosamine糖の変化により、主要成分であるN-demethylおよびN-formyl代謝物が生成される経路である。これら両代謝物および親化合物は、マクロライド骨格の1箇所以上での開裂または開環を含むと推測される2つ目の経路による変化も受ける。この経路から生じる最初の生成物は、さらに変化または代謝を受けて、100個近くの別々の成分を含む残留物の複合混合物となる。これらの両経路は、最初に光分解によって促進されると考えられる。スピネトラム-Jについては、forosamine糖への変化を含む経路の方が、マクロライド骨格の変化を含む経路よりやや優位である。スピネトラム-Lについては逆である。この違いは、スピネトラム-Jのマクロライド骨格の5,6位に二重結合がないことによるものと推定される。

表1 カブ上部試料中の総放射能残留量および各画分における放射能分布

	TRR (mg/kg)	シクロファン 洗浄液		7ヒトトリム 洗浄液		抽出液 有機溶媒 可溶性画分		抽出液 水溶性 画分		抽出 残渣	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
ストロラム-J 上部:											
0 DAT	10.064	79.6	8.012	8.8	0.890	10.8	1.090	<0.1	0.004	0.7	0.068
0.25 DAT	11.781	86.0	10.129	5.2	0.607	8.1	0.959	0.1	0.010	0.6	0.075
1 DAT	8.067	78.6	6.337	9.0	0.727	11.3	0.914	0.2	0.012	0.9	0.076
3 DAT (SA)	11.776	73.8	8.686	8.2	0.965	15.4	1.806	0.5	0.056	2.2	0.264
7 DAT (SA)	7.661	70.2	5.378	10.2	0.778	16.0	1.227	0.7	0.051	3.0	0.227
3 DAT (MA)	7.220	58.2	4.203	7.1	0.514	25.2	1.819	1.8	0.129	7.7*	0.556*
7 DAT (MA)	4.874	50.6	2.468	8.2	0.401	27.5	1.343	2.4	0.119	11.2	0.545
ストロラム-L 上部:											
0 DAT	3.597	73.3	2.637	7.2	0.257	16.8	0.606	0.6	0.023	2.1	0.075
0.25 DAT	5.340	62.6	3.345	7.0	0.372	26.6	1.421	1.1	0.058	2.7	0.143
1 DAT	3.342	62.0	2.074	13.5	0.452	19.3	0.648	1.2	0.042	3.8	0.127
3 DAT (SA)	2.136	50.2	1.073	16.8	0.360	22.4	0.477	3.9	0.084	6.6	0.142
7 DAT (SA)	1.982	43.3	0.859	16.2	0.321	27.9	0.552	1.9	0.038	10.7	0.212
3 DAT (MA)	2.159	36.9	0.797	12.8	0.277	31.0	0.668	5.8	0.126	13.5*	0.291*
7 DAT (MA)	1.128	22.9	0.259	15.8	0.179	34.8	0.392	8.6	0.097	17.9	0.202

DAT: 処理後日数、SA: 1回処理、MA: 3回処理、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度

* 抽出残渣の化学的特徴付け実施

表2 カブ根部試料中の総放射能残留量および各画分における放射能分布

	TRR (mg/kg)	抽出液 有機溶媒 可溶性画分		抽出液 水溶性画分		抽出残渣	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
ストリラム-J 根部:							
0 DAT	0.022	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.25 DAT	0.004	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1 DAT	0.029	92.6	0.027	1.5	<0.001	5.9	0.002
3 DAT (SA)	0.123	87.8	0.108	2.0	0.002	10.3	0.013
7 DAT (SA)	0.016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3 DAT (MA)	0.030	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7 DAT (MA)	0.098	59.1	0.058	6.8	0.007	34.2	0.034
ストリラム-L 根部:							
0 DAT	0.004	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.25 DAT	0.030	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1 DAT	0.030	84.2	0.025	4.8	0.001	11.1	0.003
3 DAT (SA)	0.031	75.5	0.024	4.7	0.001	19.8	0.006
7 DAT (SA)	0.020	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3 DAT (MA)	0.016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7 DAT (MA)	0.015	38.0	0.006	28.2	0.004	33.8	0.005

DAT: 処理後日数、SA: 1回処理、MA: 3回処理、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度
 NA: 試料は抽出して、分析しなかった。

表3 カブ上部試料中の親化合物および代謝物の放射能分布

	%TRR ^a	スピネトラム-J		N-demethyl -175-J		N-formyl -175-J		微量 代謝物 ^b		多成分 混合物 ^c	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネトラム-J 上部:</u>											
0.25 DAT	99.4	35.7	4.202	14.4	1.692	10.4	1.229	9.3	1.099	25.3	2.984
3 DAT (SA)	97.8	9.4	1.105	8.5	1.005	11.2	1.322	12.9	1.523	51.0	6.007
3 DAT (MA)	92.3	4.9	0.352	4.1	0.296	11.4	0.822	9.5	0.684	53.3	3.848
	%TRR ^a	スピネトラム-L		N-demethyl -175-L		N-formyl -175-L		微量 代謝物 ^b		多成分 混合物 ^c	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネトラム-L 上部:</u>											
0.25 DAT	99.4	17.1	0.912	7.4	0.396	3.0	0.160	5.1	0.276	57.3	3.062
3 DAT (SA)	93.4	2.9	0.061	1.0	0.022	0.6	0.013	2.5	0.054	73.8	1.575
3 DAT (MA)	86.5	3.0	0.065	1.1	0.024	0.5	0.012	2.3	0.052	68.8	1.485

DAT: 処理後日数, SA: 1回処理, MA: 3回処理, TRR: 総放射能残留量, mg/kg: 親化合物換算濃度

- ^a シリカゲルカラム分析に供した放射能の TRR に対する割合
- ^b これらは、親化合物と構造的に類似していると考えられる、微量の未同定代謝物であった。スピネトラム-J 処理した上部試料については、4 個以上の代謝物を含み、TRR の 4.3% を超える単一成分はなかった。そのうち 4 個は、LC-MS 分析から、9~10 個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式 $C_{17}H_{19}NO_{10}$ 、 $C_{17}H_{19}NO_{10}$ 、 $C_{16}H_{17}NO_{10}$ 、 $C_{11}H_{13}NO_{11}$ と推定された。スピネトラム-L 処理した上部試料については、4 個の微量代謝物を含み、TRR の 1.8% を超える単一代謝物はなかった。そのうち 2 個は、LC-MS 分析から、10~11 個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式 $C_{17}H_{19}NO_{11}$ 、 $C_{17}H_{17}NO_{11}$ と推定された。
- ^c この群は、HPLC でほとんど分離されない、多成分の複合混合物を含んでいた。シリカカラムによる分析では、この混合物は 5 または 6 個以上の画分に分離され、HPLC 分析では各画分は最高 69~84 個の成分を含むことが示され、その成分の大部分は TRR の 0.2~0.3% に過ぎなかった。スピネトラム-J 試料では、TRR の 2.6% を超える単一代謝物はなく、スピネトラム-L 試料では、TRR の 0.9% を超える単一代謝物はなかった。

表4 カブ根部試料中の親化合物および代謝物の放射能分布

	%TRR ^a	スピネトラム-J		N-demethyl -175-J		N-formyl -175-J		微量 代謝物 ^b		多成分 混合物 ^c		HPLCで更な る分析せず ^d	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピネトラム-J 根部: 3 DAT (SA)	89.7	22.3	0.027	10.0	0.012	16.6	0.020	5.9	0.007	9.9	0.012	17.3	0.021
	%TRR ^a	スピネトラム-L		N-demethyl -175-L		N-formyl -175-L		微量 代謝物 ^b		多成分 混合物 ^c		HPLCで更な る分析せず ^d	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピネトラム-L 根部: 3 DAT (SA)	80.2	14.8	0.005	- ^e	-	3.0	0.001	2.0	<0.001	13.1	0.004	36.8	0.012

DAT: 処理後日数、SA: 1回処理、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度

- ^a シリカゲルカラム分析に供した放射能のTRRに対する割合
- ^b これらは、親化合物と構造的に類似していると考えられる、微量の未同定代謝物であった。スピネトラム-J処理した根部試料については、4個以上の代謝物を含み、TRRの2.7%を超える単一成分はなかった。そのうち3個は、LC-MS分析から、9~10個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式 $C_{17}H_{19}NO_{10}$ 、 $C_{13}H_{19}NO_{10}$ 、 $C_{10}H_{15}NO_{10}$ と推定された。スピネトラム-L処理した根部試料については、2個の微量代謝物を含み、TRRの1.6%を超える単一代謝物はなかった。そのうち1個は、LC-MS分析から、10個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式 $C_{13}H_{19}NO_{11}$ と推定された。
- ^c この群は、HPLCでほとんど分離されない、多成分の複合混合物を含んでいた。これらの残留物はHPLCで分析した画分の2または3個に認められた。HPLC分析では各画分は9~18個の成分を含むことが示され、その成分の大部分はTRRの0.2~0.3%に過ぎなかった。スピネトラム-J試料では、TRRの1.2%を超える単一代謝物はなく、スピネトラム-L試料では、TRRの1.6%を超える単一成分はなかった。
- ^d これは、スピネトラム-J処理の根部では0.008 mg/kg以上、スピネトラム-L処理の根部では0.003 mg/kg以上含まれる単一成分がなかったために、HPLCで更なる分析を行わなかった画分中の放射能であった。
- ^e この試料中にはN-demethyl-175-Lは認められなかった。

表5 3回処理のカブ上部の処理後3日目の抽出残渣の化学的特徴付け

分画	%TRR	
	スピトラム-J 処理試料 (残留濃度 0.556 mg/kg)	スピトラム-L 処理試料 (残留濃度 0.291 mg/kg)
0.1 N HCl 抽出	1.2	2.8
有機層	0.5*	0.9
水層	0.7	1.9
1 N HCl 還流	2.5	4.5
有機層	1.9	2.1
水層	0.7	2.4
残渣	4.0	6.2
計	7.7	13.5

* スピトラム-J および N-demethyl-175-J を検出 (ともに < 0.1% TRR)

図1 1回処理後0、1および7日目の上部試料の抽出および分析スキーム

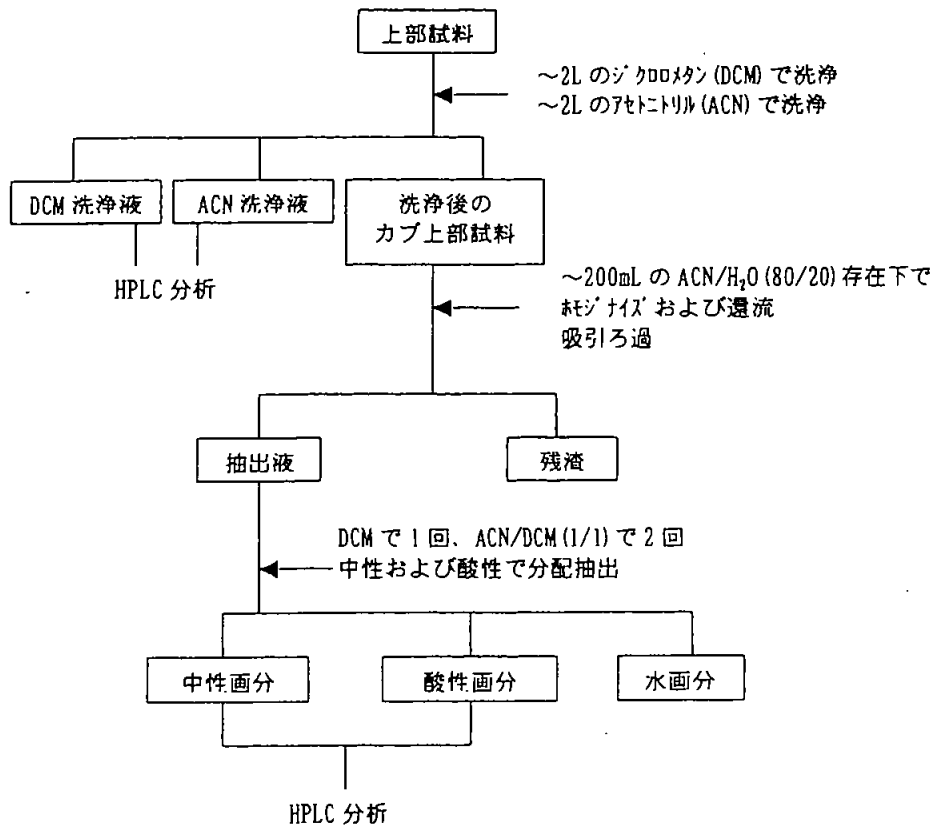


図2 1回処理後0.25および3日目の上部試料の抽出および分析スキーム

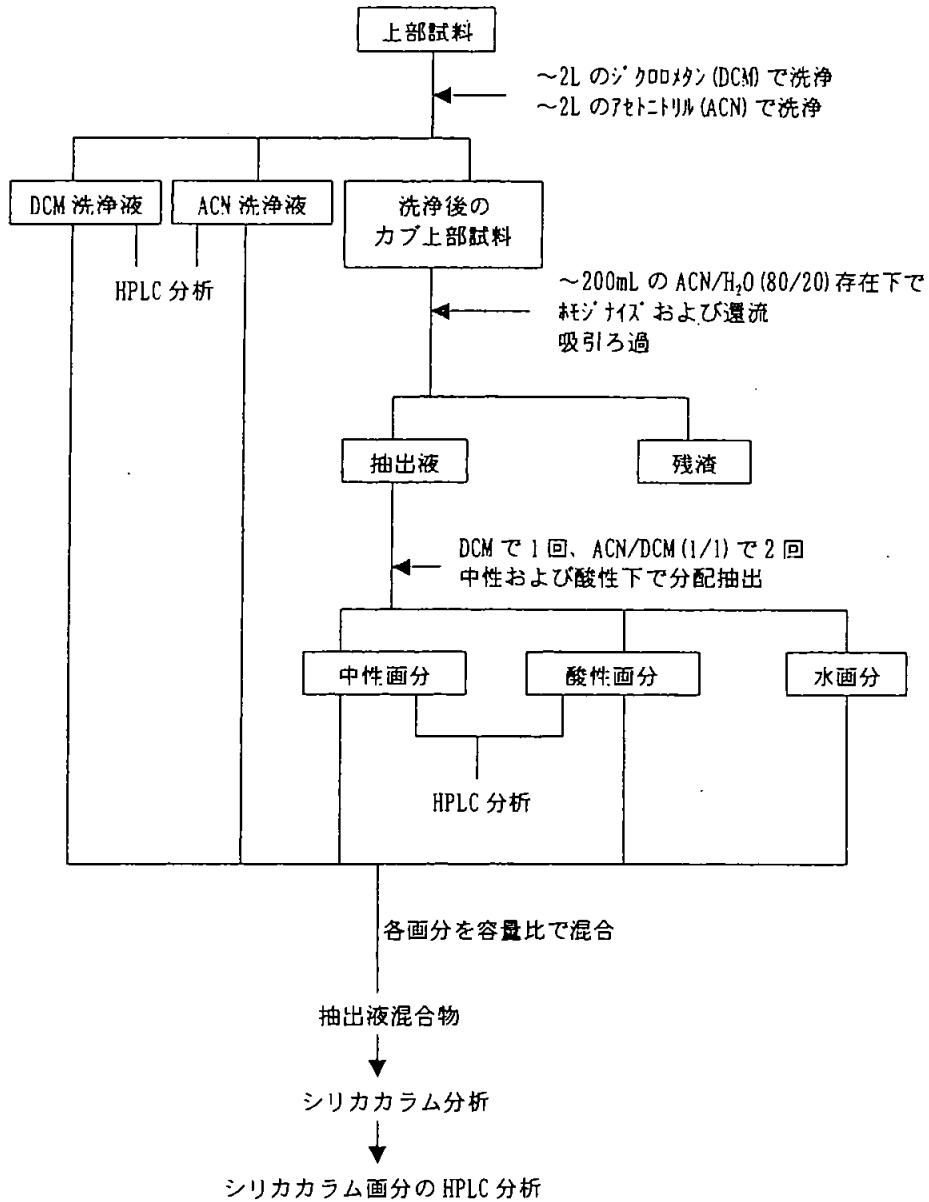


図3 3回処理後3日目の上部試料の抽出および分析スキーム

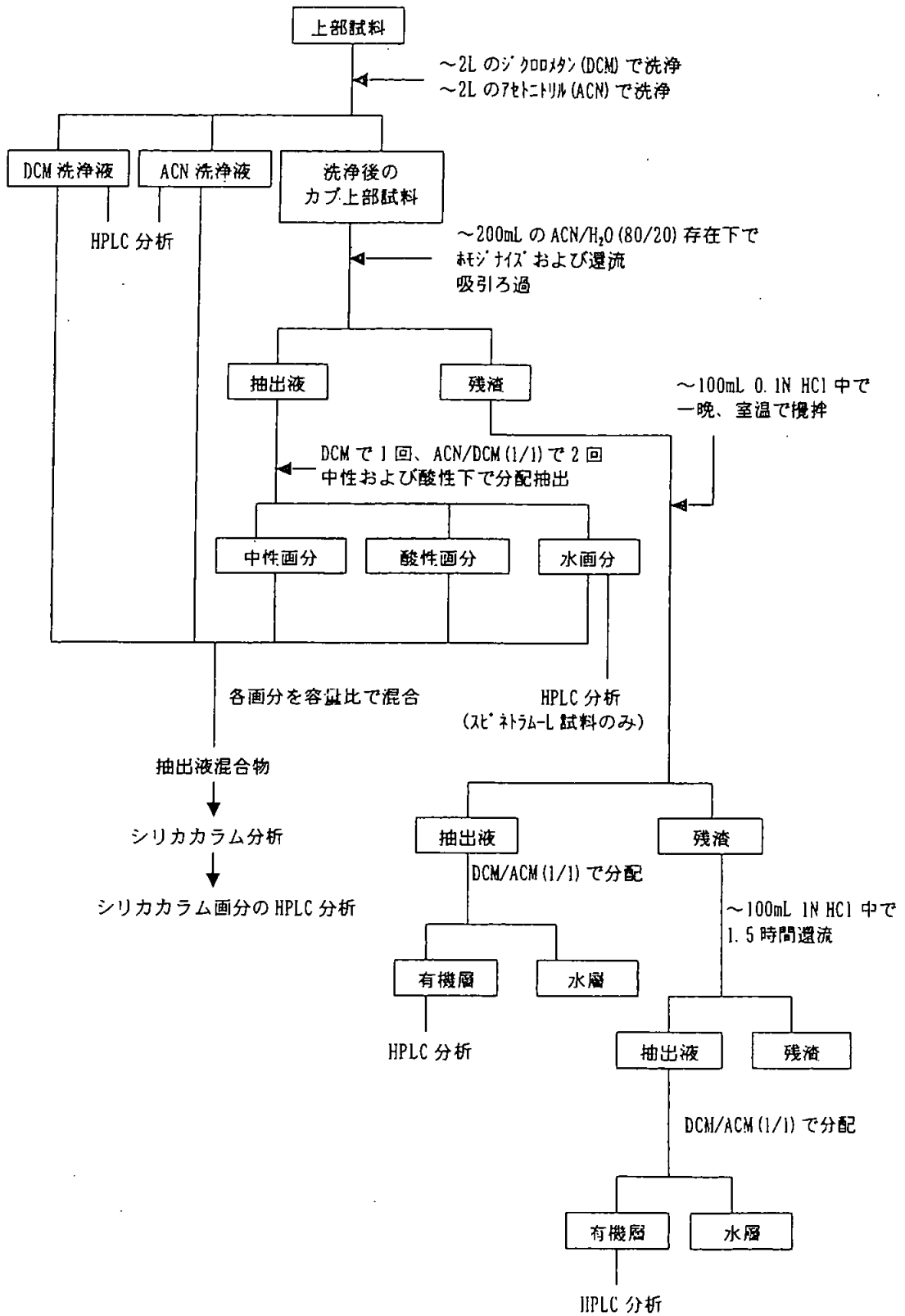


図4 3回処理後7日目の上部試料の抽出および分析スキーム

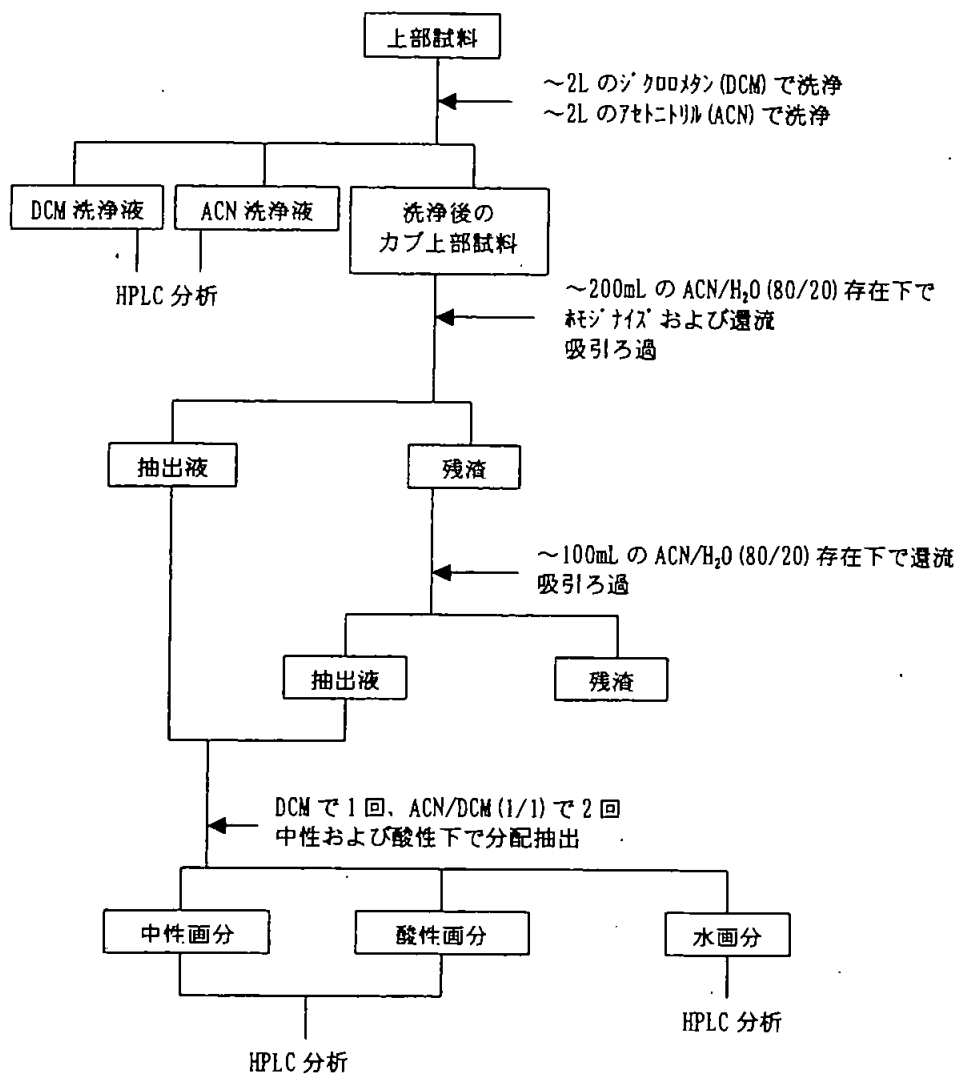


図5 1回処理後1日目および3回処理後7日目の根部試料の抽出および分析スキーム

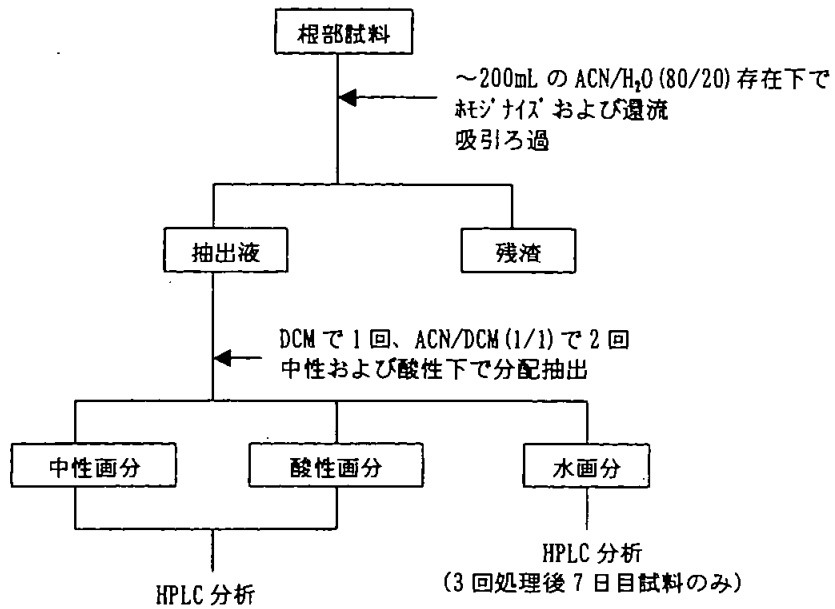


図6 1回処理後3日目の根部試料の抽出および分析スキーム

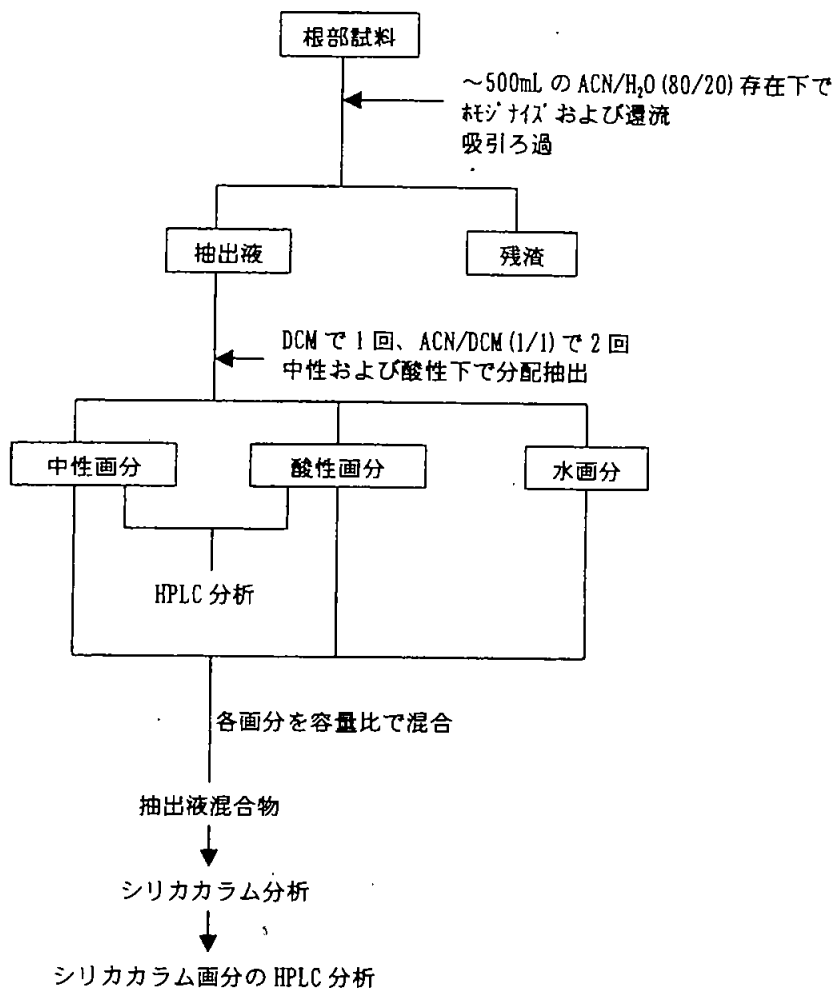


図7 カブにおけるスピネトラム-Jの予想代謝経路

図8 カブにおけるスピネトラム-Lの予想代謝経路

(3) スピネトラムのりんごにおける代謝試験

(資料 II-3)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2005年 [GLP 対応]

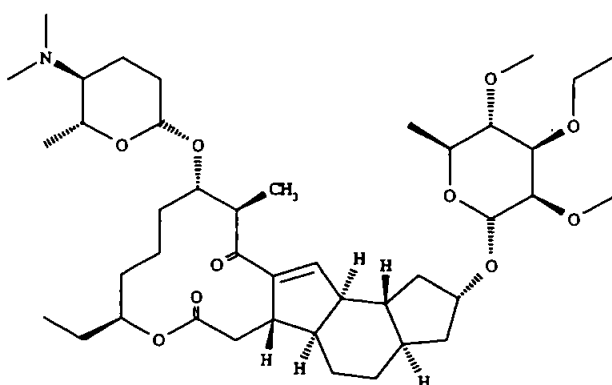
供試標識化合物：

^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2) の混合物 (約 1:1:1 (w/w/w))；

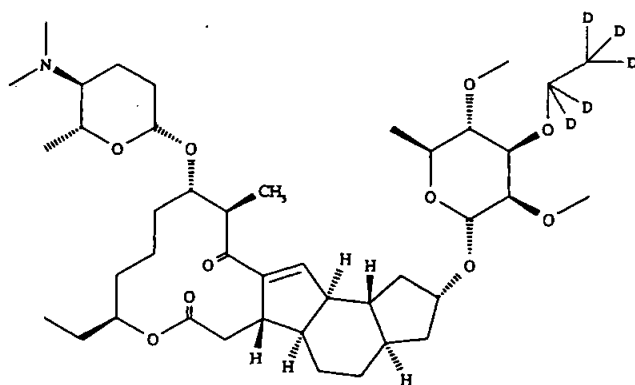
および

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5) の混合物 (約 1:1 (w/w))；

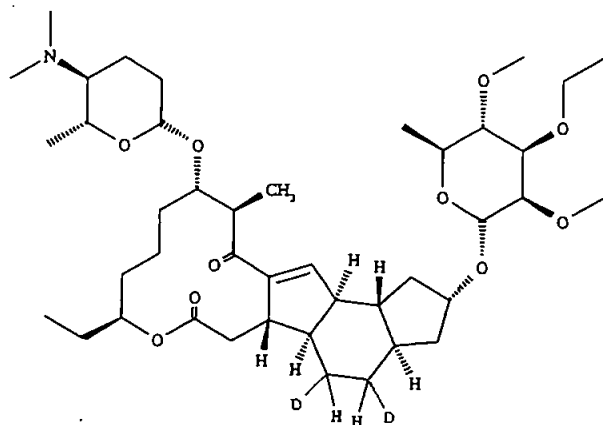
構造式：



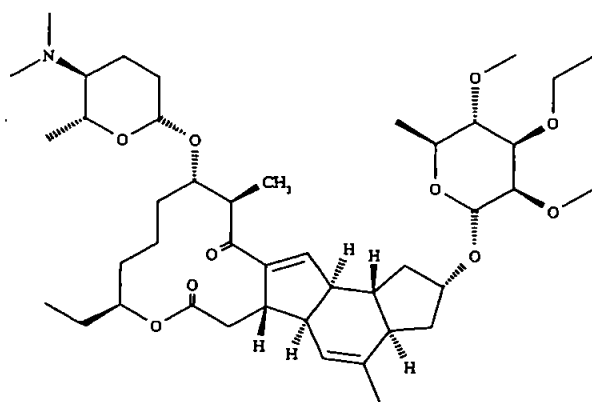
^{14}C -スピネトラム-J



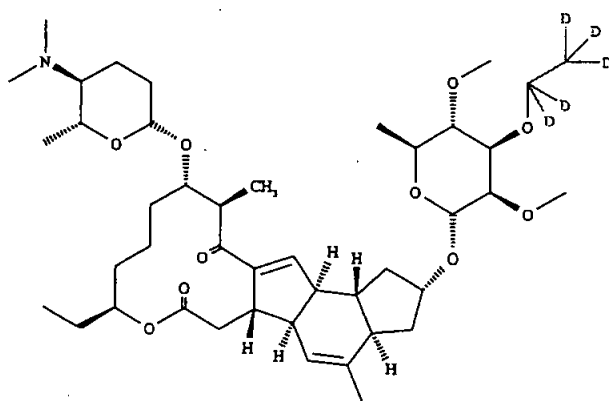
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



¹⁴C-スピネトラム-J (D2)



¹⁴C-スピネトラム-L



¹⁴C-スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-([(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy)-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*- α -indaceno [3, 2-*d*] oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl- β -L-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-([(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy)-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*- α -indaceno [3, 2-*d*] oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl- β -L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物： りんご（品種：Granny Smith）

栽培条件： 米国カリフォルニア州にある Research For Hire の試験場の屋外で、樹齢 17 年のりんご樹を用いて果実を成熟期まで生育させた。栽培土壌は、有機物含量 3.4%、pH 7.7 の砂質埴壤土（砂 50%、シルト 20%および粘土 30%）であった。

方 法：

被験物質の調製：処理前に、¹⁴C-スピネトラム-J 混合物および ¹⁴C-スピネトラム-L 混合物をそれぞれ乳剤の空製剤に溶解し、乳剤として製剤化した。

処理方法：スピネトラムのりんごにおける予想年間最大総施用量は 500 g/ha である。スピネトラムは 2 種の活性成分であるスピネトラム-J およびスピネトラム-L を約 3 : 1 の比率で含有し、スピネトラム-J の年間最大施用量は 375 g/ha (500 g/ha × 0.75)、スピネトラム-L の年間最大施用量は 125 g/ha (500 g/ha × 0.25) であるが、代謝物同定の作業に必要な残留物を十分得るため、それぞれ 1810.2 g/ha および 1108.2 g/ha の過剰量で処理した。処理前に、処理するりんご樹のうち 1 本を除くすべての枝をプラスチックで覆いをし、処理散布溶液が葉や果実にかからないようにした。覆いをした枝は移行性確認用試料とした。処理は、手持ちサイズのノズル型噴霧器を用いて、処理液を均一に葉面散布することにより行った。

試料採取時期：未熟期のりんご果実および葉は、処理後 0 日目（処理後約 5 時間）、1、3、7 および 14 日目に採取した。処理後にアルミホイルで覆いをしたりんご果実（暗所試料）は処理後 3 日目に採取した。また、処理後 3 日目に覆いをしたりんご果実は 7 日後に採取した（処理後 3 日目から 7 日まで覆いをした）。成熟期のりんご果実および葉は、処理後 30 日目に採取した。

分析方法：各試料中の残留物の抽出および分析に用いた方法の詳細なフローチャートを図 1 および 2 に示す。試料は、アセトニトリルに続いてジクロロメタンで洗浄し、表面残留物を除去した。洗浄液の一部は LSC および HPLC で分析した。洗浄後の試料を粉碎した（果実は果皮をむき、果皮と果肉を別々に粉碎した）後、オキシダイザーにより燃焼分析に供した。洗浄後の粉碎した試料の一部をアセトニトリル/水 80/20 (v/v) を用いて 3 回抽出した。果皮の抽出液は濃縮後ジクロロメタン/アセトニトリル 80/20 (v/v) で 3 回分配し、有機層と水層に分画した。有機層は LSC および HPLC で分析し、水層は LSC で分析した。抽出後の残渣はオキシダイザーによる燃焼分析に供した後、LSC で分析した。

代謝物の同定：最初の代謝物の単離および化学的特徴付けにおいては、処理後7日目の葉洗浄液および抽出液を容量比で混合した試料を調製して、これらをシリカ上で乾燥し、低圧シリカカラムに添加して溶出を行った。次に、TRRの85%を超える放射能が認められた処理後7日目の葉およびりんご果実洗浄液をシリカカラムに通し、繰り返し溶出させ、各画分をLSCおよびHPLC分析に供した。一部はLC-MS分析に供し、分子式の推定を試みた。最終的な代謝物単離および化学的特徴付けでは、低圧シリカカラムではなくシリカ固相抽出カートリッジを用いた。各画分をLSCおよびHPLC分析に供し、一部をLC-MS分析に供し、分子式の推定を試みた。最終的な代謝物の同定は分析用標品とのHPLCおよびLC-MS分析における比較により行った。

結果：

¹⁴C分布：試料中の放射能分布を表1～4に示す。TRRの96%を超える果実の残留物が表面（洗浄液と果皮）に存在し、果肉中の残留物はその残り（TRRの4%未満）にすぎなかった。移行性確認用果実試料のTRRレベルは定量限界未満であり、移行性確認用葉試料のTRRレベルは同じ時点に採取した処理区の葉試料の0.2%に満たなかったことから、親化合物および代謝物とも枝を介して容易に移行しないことが示された。

代謝：試料中の代謝物の分布を表5および6に示す。スピネトラム-Jのりんご果実および葉における半減期は約15日、スピネトラム-Lの半減期は5日未満であった。覆いをしたりんご果実では両化合物の残留量が多く認められたことから、光分解が関与していることが示された。主要代謝物として、N-ジメチル部分が変化を受けたN-demethyl体およびN-formyl体が認められた。N-demethyl-175-Jはりんご果実および葉において、処理後3～7日目に最大の約14%TRRに達した。N-demethyl-175-Lはりんご果実において、0日目が最大の8%TRRで、それ以降減少したが、葉では、1日目が最大で約3%TRRであった。N-formyl-175-Jは、りんご果実では処理後3～7日目に最大の約5%TRRに達し、葉では処理後3日目に4.1%TRRとなった。N-formyl-175-Lは、処理後3日目の暗所りんご果実および処理後3日目の葉において最大の約3%TRRに達した。これらの代謝物に加えて、スピネトラム-J試料ではO-deethyl-175-JおよびC9-pseudoaglycone-175-Jがりんご果実および葉の両方に検出された。スピネトラム-J試料の微量代謝物群のうち4個は、LC-MS分析から、9～10個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式は $C_{42}H_{69}NO_{10}$ 、 $C_{42}H_{69}NO_{10}$ （N-formyl-175-Jが脱メチル化されたと推定される代謝物）、 $C_{41}H_{67}NO_{10}$ 、 $C_{43}H_{69}NO_{12}$ であると推定された。スピネトラム-L試料の微量代謝物群のうち2個は、LC-MS分析から、10～11個の環および二重結合を含む構造を示し、分子式は $C_{43}H_{69}NO_{11}$ （マクロライド骨格に水酸基が付加したと推定される代謝物）、 $C_{43}H_{67}NO_{11}$ であると推定された。

代謝経路：スピネトラム-Jの予想代謝経路を図3に、スピネトラム-Lの予想代謝経路

を図4に示す。スピネトラムの代謝には、3種の代謝経路が関与していると考えられる。1つ目の経路は、分子の forosamine 部分に変化し、生成される主要な代謝物は N-demethyl 体および N-formyl 体である。2つ目の経路は、分子のラムノース部分に変化し、生成する代謝物は O-deethyl 体および C9-pseudoaglycone である。これらの代謝物は全て、親化合物と同様、マクロライド骨格の1箇所以上での開裂または開環に関与すると推測される経路によって変化を受け、最終的に100個以上の異なる成分を含む複合混合物となる。スピネトラムの代謝は、最初光分解によって促進すると考えられる。スピネトラム-Jについては、forosamine 糖の変化を含む経路の方が、マクロライド骨格の変化を含む経路よりやや優位であり、スピネトラム-Lについては、生成した残留物の大部分がマクロライド骨格部位の変化による経路であった。この違いは、スピネトラム-Jのマクロライド骨格の5,6位に二重結合がないことによるものと推定される。

表1 りんご果実試料中の総放射能残留量および各画分における放射能分布

	TRR (mg/kg)	アセトリル 洗浄液		ジクロロタン 洗浄液		果皮		果肉	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネトラム-J:</u>									
0 DAT	0.870	91.6	0.797	5.3	0.046	3.0	0.026	0.2	0.002
1 DAT	1.671	93.1	1.557	3.7	0.062	3.1	0.051	0.1	0.001
3 DAT	1.330	91.0	1.210	4.8	0.064	4.1	0.054	0.1	0.001
3 DAT (暗所)	1.019	92.8	0.945	5.1	0.052	2.1	0.021	---	<LOQ
7 DAT	1.158	84.7	0.981	6.1	0.071	8.9	0.103	0.3	0.004
7 DAT (暗所)	0.793	81.5	0.646	11.0	0.087	7.2	0.057	0.3	0.003
14 DAT	1.094	89.0	0.974	6.8	0.074	3.9	0.043	0.3	0.003
30 DAT	0.713	77.8	0.555	10.6	0.076	10.6	0.075	1.0	0.007
30 DAT*	<LOQ	---	---	---	---	---	<LOQ	---	---
<u>スピネトラム-L:</u>									
0 DAT	0.431	79.0	0.341	10.8	0.046	9.6	0.042	0.5	0.002
1 DAT	0.626	84.7	0.530	9.8	0.061	5.5	0.034	---	<LOQ
3 DAT	0.888	51.3	0.455	20.9	0.185	26.8	0.238	1.0	0.009
3 DAT (暗所)	1.339	66.2	0.887	20.3	0.271	12.7	0.170	0.8	0.011
7 DAT	0.356	57.8	0.206	15.7	0.056	24.8	0.088	1.7	0.006
7 DAT (暗所)	1.037	72.5	0.752	12.9	0.134	13.4	0.139	1.2	0.013
14 DAT	0.528	60.3	0.318	18.2	0.096	19.5	0.103	1.9	0.010
30 DAT	0.728	46.1	0.335	17.1	0.124	33.3	0.242	3.5	0.026
30 DAT*	<LOQ	---	---	---	---	---	<LOQ	---	---

DAT: 処理後日数、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度、LOQ: 定量限界

* 移行性確認用試料

表2 りんご果皮のアセトニトリル/水抽出後の画分の放射能分析

	溶媒洗浄後の 試料*		アセトニトリル/水抽出液				抽出残渣		HPLC分析 供試試料**
			有機層		水層				
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR
<u>ストマトム-J:</u>									
0 DAT	3.0	0.026	2.6	0.022	0.003	0.00002	0.2	0.001	99.4
1 DAT	3.1	0.051	2.2	0.037	0.01	0.0002	0.3	0.005	99.1
3 DAT	4.1	0.054	4.2	0.056	0.3	0.004	0.8	0.010	100
3 DAT (暗所)	2.1	0.021	2.1	0.022	0.2	0.002	0.3	0.003	100
7 DAT	8.9	0.103	8.3	0.096	0.8	0.009	1.3	0.016	99.1
7 DAT (暗所)	7.2	0.057	4.6	0.037	0.5	0.004	1.3	0.010	97.1
14 DAT	3.9	0.043	1.9	0.021	0.7	0.007	1.0	0.011	97.7
30 DAT	10.6	0.075	5.9	0.042	1.8	0.013	2.8	0.020	94.4
<u>ストマトム-L:</u>									
0 DAT	9.6	0.042	5.4	0.023	0.7	0.003	1.5	0.007	95.2
1 DAT	5.5	0.034	3.3	0.021	0.9	0.006	1.2	0.007	97.8
3 DAT	26.8	0.238	12.6	0.112	7.0	0.062	6.0	0.054	84.7
3 DAT (暗所)	12.7	0.170	7.6	0.102	4.0	0.053	2.2	0.030	94.1
7 DAT	24.8	0.088	11.4	0.041	4.7	0.017	5.5	0.019	89.7
7 DAT (暗所)	13.4	0.139	6.8	0.070	3.3	0.035	2.8	0.029	95.5
14 DAT	19.5	0.103	5.6	0.030	6.7	0.035	5.0	0.026	90.8
30 DAT	33.3	0.242	10.1	0.073	11.2	0.082	8.6	0.063	84.5

* 表1より

** アセトニトリル洗浄液+ジクロロメタン洗浄液+有機層

表3 りんご葉試料中の総放射能残留量および各画分における放射能分布

	TRR (mg/kg)	アセトニトリル 洗浄液		ジクロロメタン 洗浄液		洗浄後の試料	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スト・ネトラム-J:</u>							
0 DAT	131.245	82.1	107.79	8.8	11.521	9.1	11.931
1 DAT	127.347	88.4	112.58	6.3	8.015	5.3	6.752
3 DAT	168.039	82.9	139.37	7.8	13.167	9.2	15.505
7 DAT	155.462	85.4	132.74	7.6	11.835	7.0	10.890
14 DAT	143.162	82.3	117.82	9.8	14.030	7.9	11.315
30 DAT	139.517	66.7	93.068	10.8	15.011	22.5	31.437
30 DAT*	0.054	---	---	---	---	---	0.054
<u>スト・ネトラム-L:</u>							
0 DAT	64.427	77.8	50.107	11.3	7.262	11.0	7.059
1 DAT	47.442	78.8	37.401	10.4	4.956	10.7	5.086
3 DAT	58.068	72.4	42.026	12.9	7.506	14.7	8.535
7 DAT	52.048	71.7	37.311	12.3	6.385	16.0	8.352
14 DAT	39.400	68.3	26.930	17.1	6.745	14.5	5.725
30 DAT	55.535	54.7	30.359	14.2	7.910	31.1	17.266
30 DAT*	0.099	---	---	---	---	---	0.099

DAT: 処理後日数、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度、* 移行性確認用試料

表4 りんご葉のアセトニトリル/水抽出後の画分の放射能分布

	溶媒洗浄後の 試料*		アセトニトリル/水 抽出液		抽出残渣		HPLC 分析 供試試料**
	%TRR	mg/kg	%TRR	%TRR	%TRR	mg/kg	%TRR
<u>スト・ネトラム-J:</u>							
0 DAT	9.1	11.931	11.5	15.071	0.3	0.334	102.4
1 DAT	5.3	6.752	6.3	8.017	0.2	0.289	101.0
3 DAT	9.2	15.505	8.8	14.754	0.6	1.025	99.6
7 DAT	7.0	10.890	5.8	9.011	0.5	0.775	98.8
14 DAT	7.9	11.315	6.3	9.068	1.0	1.476	98.4
30 DAT	22.5	31.437	18.7	26.049	3.3	4.536	96.1
<u>スト・ネトラム-L:</u>							
0 DAT	11.0	7.059	10.8	6.980	1.2	0.771	99.9
1 DAT	10.7	5.086	8.7	4.124	1.3	0.603	98.0
3 DAT	14.7	8.535	13.0	7.535	2.2	1.285	98.3
7 DAT	16.0	8.352	14.0	7.290	2.7	1.383	98.0
14 DAT	14.5	5.725	11.3	4.465	2.4	0.940	96.8
30 DAT	31.1	17.266	22.2	12.314	6.8	3.765	91.1

* 表3より、** アセトニトリル洗浄液+ジクロロメタン洗浄液+アセトニトリル/水抽出液

表5 りんご果実中の親化合物および代謝物の分布

	%TRR ^a	スピネトラム-J		N-demethyl-175-J		N-formyl-175-J		微量代謝物 ^b		多成分混合物 ^c	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピネトラム-J:											
0 DAT	99.4	82.2	0.715	5.0	0.044	1.7	0.015	4.8	0.043	5.7	0.049
1 DAT	99.1	76.3	1.271	9.1	0.152	2.9	0.048	5.0	0.083	6.1	0.102
3 DAT	100	56.3	0.749	12.7	0.169	4.9	0.065	13.5	0.181	12.5	0.166
3 DAT (暗所)	100	68.1	0.694	9.9	0.101	4.3	0.044	9.1	0.094	8.5	0.087
7 DAT	99.1	46.4	0.537	13.5	0.156	4.8	0.056	17.3	0.200	17.2	0.199
7 DAT (暗所)	97.1	51.1	0.405	11.6	0.092	4.3	0.034	15.8	0.126	14.5	0.115
14 DAT	97.7	44.3	0.485	9.1	0.100	3.0	0.033	19.8	0.214	21.6	0.236
30 DAT	94.4	22.2	0.158	5.7	0.041	2.1	0.015	23.0	0.162	41.6	0.296
スピネトラム-L:											
0 DAT	95.2	42.6	0.184	8.0	0.034	1.6	0.007	17.6	0.076	25.4	0.110
1 DAT	97.8	24.7	0.154	4.7	0.030	1.2	0.007	19.4	0.123	47.7	0.298
3 DAT	84.7	13.5	0.120	4.4	0.039	1.6	0.014	15.6	0.138	49.8	0.442
3 DAT (暗所)	94.1	18.9	0.253	5.1	0.068	2.7	0.036	18.7	0.253	48.6	0.651
7 DAT	89.7	2.6	0.009	1.7	0.006	---	---	22.2	0.079	63.1	0.225
7 DAT (暗所)	95.5	8.7	0.090	3.9	0.041	0.8	0.008	20.9	0.217	61.3	0.635
14 DAT	90.8	0.9	0.005	0.4	0.002	1.1	0.006	18.7	0.098	69.7	0.368
30 DAT	84.5	---	---	0.4	0.003	0.4	0.003	14.8	0.107	68.9	0.501

DAT: 処理後日数、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度

a: 表2より

b: 親化合物と構造が類似していると推定される未同定代謝物群。

スピネトラム-Jの場合、少なくとも9個の代謝物を含み、個々の代謝物は4.9%TRRを超えない。
この群の中には、C9-pseudoaglycon-175-J (最大値4.6%TRR、0.033 mg/kg、30DAT) および
0-deethyl-175-J (最大値3.4%TRR、0.024 mg/kg、30DAT) を含む。

スピネトラム-Lの場合、少なくとも7個の代謝物を含み、個々の代謝物は7.5%TRRを超えない
(但し溶媒先端ピークは最大9.6%TRR)。

c: HPLC分析で分離が不十分な複合成分 (マクロライド骨格の開裂により生成すると推定される)。

スピネトラム-Jおよびスピネトラム-Lとも、50個を超える成分を含み、個々の成分は1%TRRを超えない。

表6 りんご葉中の親化合物および代謝物の分布

	%TRR ^a	スピネトラム-J		N-demethyl-175-J		N-formyl-175-J		微量代謝物 ^b		多成分混合物 ^c	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピネトラム-J:											
0 DAT	102.4	80.2	105.254	9.1	11.882	2.4	3.202	6.3	8.265	4.4	5.782
1 DAT	101.0	78.5	99.999	10.5	13.345	2.4	3.087	7.0	8.930	2.6	3.253
3 DAT	99.6	51.3	86.174	13.9	23.324	4.1	6.913	13.9	23.541	16.3	27.336
7 DAT	98.8	42.2	65.583	12.5	19.363	2.7	4.211	17.7	27.497	23.8	36.928
14 DAT	98.4	24.0	34.358	9.4	13.447	3.0	4.341	22.0	31.459	40.0	57.310
30 DAT	96.1	19.9	27.772	7.5	10.501	2.2	3.065	19.5	27.061	47.1	65.729
	%TRR ^a	スピネトラム-L		N-demethyl-175-L		N-formyl-175-L		微量代謝物 ^b		多成分混合物 ^c	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピネトラム-L:											
0 DAT	99.9	26.8	18.555	1.9	1.363	2.0	1.504	19.1	14.212	50.2	36.806
1 DAT	98.0	19.6	9.288	3.2	1.532	1.2	0.583	20.1	9.529	53.9	25.548
3 DAT	98.3	4.1	2.356	2.1	1.209	2.5	1.470	19.0	10.932	70.8	41.101
7 DAT	98.0	1.2	0.630	0.7	0.349	1.9	0.986	15.6	8.093	78.6	40.928
14 DAT	96.8	0.6	0.242	0.6	0.249	1.0	0.393	17.4	6.782	77.3	30.474
30 DAT	91.1	0.2	0.121	0.2	0.121	0.3	0.182	17.8	9.895	72.5	40.262

DAT: 処理後日数、TRR: 総放射能残留量、mg/kg: 親化合物換算濃度

a: 表4より

b: 親化合物と構造が類似していると推定される未同定代謝物群。

スピネトラム-Jの場合、少なくとも9個の代謝物を含み、個々の代謝物は4.5%TRRを超えない。

この群の中には、C9-pseudoaglycon-175-J (最大値 4.5%TRR、7.028 mg/kg、7DAT; 成熟期残留値 3.1%TRR、4.368 mg/kg、30DAT) および

O-deethyl-175-J (最大値 4.3%TRR、6.144 mg/kg、14DAT; 成熟期残留値 2.5%TRR、3.447 mg/kg、30DAT) を含む。

スピネトラム-Lの場合、少なくとも7個の代謝物を含み、個々の代謝物は6.9%TRRを超えない (但し溶媒先端ピークは最大9.5%TRR)。

c: HPLC分析で分離が不十分な複合成分 (マクロライド骨格の開裂により生成すると推定される)。

スピネトラム-Jおよびスピネトラム-Lとも、50個を超える成分を含み、個々の成分は1%TRRを超えない。

図1 果実試料の抽出および分析スキーム

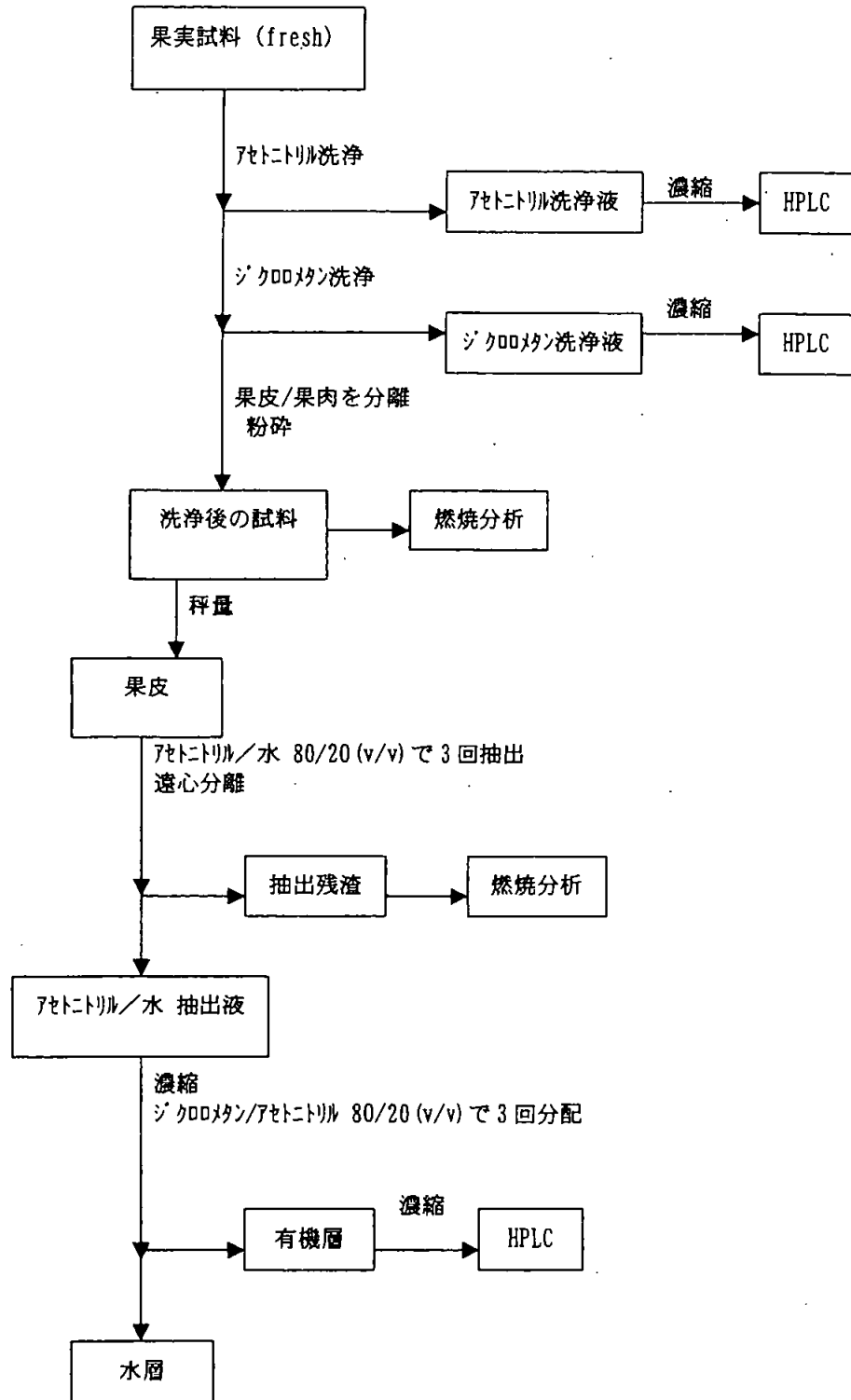


図2 葉試料の抽出および分析スキーム

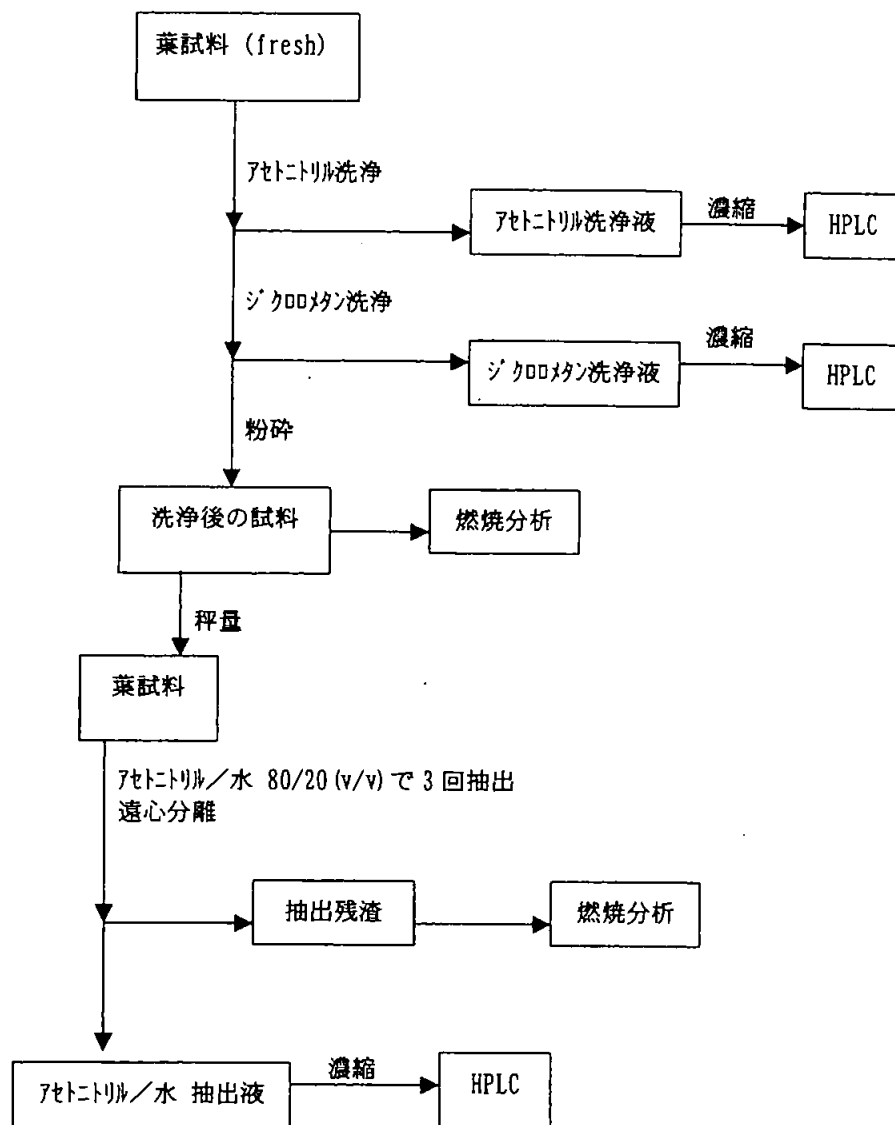


図3 りんごにおけるスピネトラム-Jの予想代謝経路

図4 りんごにおけるスピネトラム-Lの予想代謝経路

(4) スピネトラムのイネにおける代謝試験

(資料 II-4)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

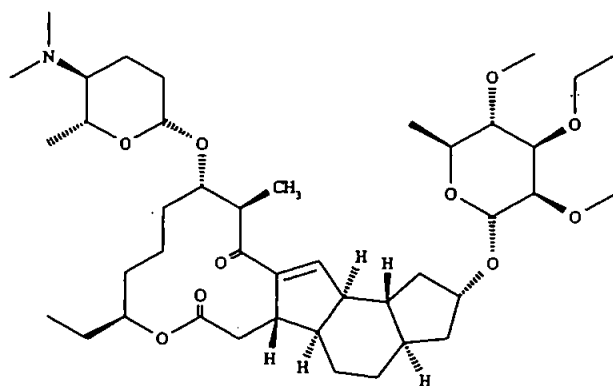
供試標識化合物：

^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2) の混合物 (約 1:1:1 (w/w/w))；

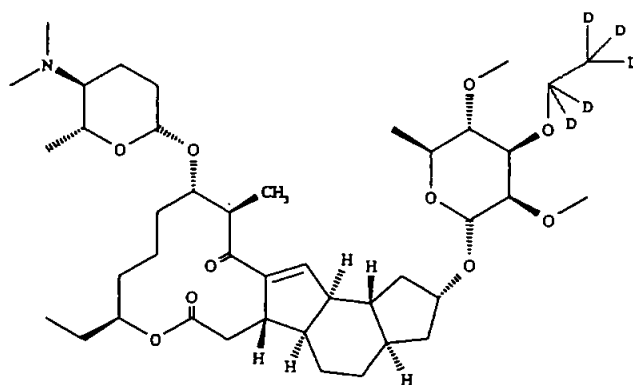
および

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5) の混合物 (約 1:1 (w/w))；

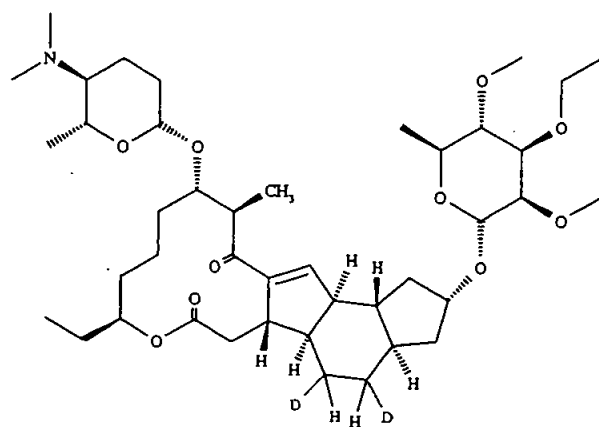
構造式：



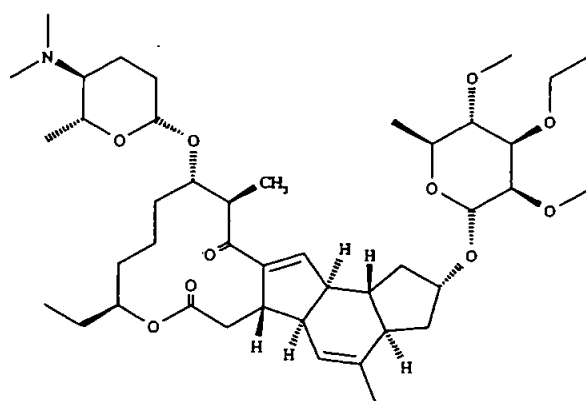
^{14}C -スピネトラム-J



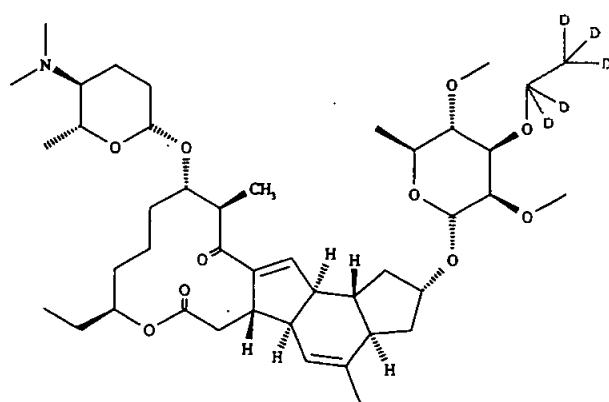
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



¹⁴C-スピネトラム-J (D2)



¹⁴C-スピネトラム-L



¹⁴C-スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[{(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-*as*-indaceno [3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-*L*-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[{(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-*as*-indaceno [3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-*L*-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試植物：イネ（品種：Japonica M202、早生、中粒米）

栽培条件：イネは2種の異なる大きさの容器で栽培した。定植後最初の1ヶ月の間に試料を採取する予定の植物は、約46×31×20 cm（長さ×幅×高さ、内寸）の小型のグラスファイバー製容器内で栽培した。各被験物質または対照用に、これらの容器を3個使用し、

調製した水田泥（泥状の土壌）を約 10 cm の深さまで入れた。青刈り期または成熟期まで生育させる植物は、約 58×31×31 cm（長さ×幅×高さ、内寸）の大型のプラスチック製容器内で栽培した。各被験物質または対照用に、これらの容器を 5 個使用し、調製した水田泥を約 20 cm の深さまで入れた。使用した土壌は、有機物含量 2.6%、pH 7.4 の埴埴土（砂 49%、シルト 28%および粘土 23%）であった。

方 法：

被験物質の調製：¹⁴C-スピネトラム-J および ¹⁴C-スピネトラム-L を、それぞれメタノールおよびアセトニトリルに溶解させた。一部を採って LSC 分析に供して処理液中の濃度を測定し、その結果から各植穴に処理する溶液量を 0.021 mL に決定した。

処理方法：水田泥の入った各容器にイネの苗を植える穴（直径約 2~3 cm、深さ約 2~3 cm）をあけた。各植穴に、約 50 mg の空粒剤を入れ、その後、¹⁴C-スピネトラム-J または ¹⁴C-スピネトラム-L 処理液 0.021 mL を各植穴の粒剤に添加し、溶媒を蒸発させた後、2~4 葉期のイネ苗 3 本を各植穴に定植した。定植した容器は水田泥から約 2~5 cm の深さまで灌水させ、昼時間が 16 時間の長さで、昼/夜ともに約 29℃に設定した温室内に置いて、イネを栽培した。

試料採取時期：処理後 7、14、28、72、149 および 162 日目に採取した。72 日目試料は青刈りイネ、149 日目試料はもみ、もみ殻および玄米、162 日目の試料は稲わらの分析に用いた。処理後 7、14、28 および 72 日目試料は水面のすぐ上で切断して植物全体を採取した。処理後 149 および 162 日目試料は穂を採取した後、落水前の水面の約 1~2 cm 上を切断し稲わらを収穫した。

分析方法：各試料中の残留放射能の抽出および分析に用いた方法の概略を示すフローチャートを図1～3に示す。粉碎した植物試料はアセトニトリル/水 (80/20, v/v) を用いて抽出、還流を行った。抽出した組織を吸引ろ過によって分離し、抽出残渣は燃焼分析に供し、抽出液の一部を LSC で分析した。処理後 14 日目の抽出残渣中の結合残留物は酸性デタージェント繊維抽出およびセルラーゼ処理により化学的特徴付けを行った。処理後 162 日目の稲わらから得られた、抽出残渣中の結合残留物は Skidmore および Langebartels による方法を用いて化学的特徴付けを行った。アセトニトリル/水 (80/20) 抽出液は、ジクロロメタンを用いて 1 回、次にジクロロメタン/アセトニトリル (1/1, v/v) を用いて 2 回分配抽出した。残った水層を酸性化して pH 約 1~2 とした後、ジクロロメタン/アセトニトリル (1/1, v/v) で 3 回分配抽出した。処理後 7 および 14 日目の試料については、中性および酸性有機層を合わせて分析したが、それ以降の試料については中性有機層のみを分析した。上記有機溶媒抽出液の HPLC 分析は、更なる分配抽出、固相 (シリカ SPE または C18 SPE) 抽出操作により精製後、実施した。

代謝物の同定：処理後 7 日目の試料を用いて単離および分配抽出を行った後、シリカカラムクロマトグラフィーを用いて中性有機溶媒抽出液の更なるクリーンアップを実施し、個々のシリカカラム画分の HPLC 分析を行った。また、シリカカラム画分の一部については LC-MS 分析に供した。最終的な代謝物の同定は、分析用標品との HPLC および LC-MS 分析における比較により行った。

結果：

¹⁴C 分布：試料中の放射能分布を表 1 に示す。

スピネトラム-J および-L を処理したイネの両方において放射能残留濃度は速やかに減少した。特に未成熟期のイネ茎葉部での濃度減少は植物重量増加による希釈が主要因と考えられた。処理後 162 日目の稲わらにおける残留量は、処理後 72 日目の青刈りイネにおける量より 2~4 倍高かったが、これは乾燥した稲わら中の水分含量が青刈りイネ中の水分含量より低かったためと考えられる。スピネトラム-J を処理した試料中の残留量は、玄米を除くと全ての種類の試料で、スピネトラム-L を処理した試料中の残留量より 1.2~4.9 倍高かった。両被験物質の土壌における分解速度は遅いことから、この差は土壌からの取り込み量の相違を反映していると考えられた。玄米およびもみ殻中に検出された残留量が低かったことは、スピネトラム-J または-L が稲のもみ中に移行して蓄積する可能性が低いことを示している。

代謝：試料中の代謝物の分布を表 2 に示す。

イネ植物中において、スピネトラム-J は、処理後 7 日目に TRR の 63.2% であったが、処理後 162 日目には TRR の 11.3% まで減少した。スピネトラム-L は、処理後 7 日目に

TRR の 54.5%であったが、処理後 162 日目には TRR の 3.3%まで減少した。処理後 28 日目の試料を比較した場合、スピネトラム-J 処理区では残留放射能の約 43%が親化合物であったが、スピネトラム-L 処理区では親化合物として残留していたものは約 14%と少なく、スピネトラム-L はスピネトラム-J より速やかに代謝されることが示唆された。スピネトラム-J およびスピネトラム-L とも同様の代謝を受け、それぞれの N-demethyl 体および N-formyl 体が生成した。試験期間中における N-demethyl-175-J、N-formyl-175-J、N-demethyl-175-L および N-formyl-175-L それぞれの最大検出量は、TRR の 25.5%、11.6%、14.5%および 7.3%であった。なお、成熟期の稲わらを分析したところ、スピネトラム-J および-L の両試料において、N-demethyl 体および N-formyl 体は、TRR の 3.4%以下まで減少していた。多成分混合物は、スピネトラム-J あるいはスピネトラム-L のいずれの場合にも、30 個以上の異なる未同定ピークからなっていたが、TRR の 5.5 または 6.8%を超える成分はなかった。

抽出残渣（結合放射能）：抽出残渣の分析結果を表 3 および 4 に示す。

スピネトラム-J およびスピネトラム-L を処理したイネの両方について結合放射能の経時的な増加が認められ、処理後 162 日目の稲わらにおいては TRR の約 40~50%となった。処理後 14 日目の試料と処理後 162 日目の稲わら試料から得られた結合放射能を分析した。処理後 14 日目では、結合放射能の大部分が、酸性デタージェント繊維抽出またはセルラーゼ酵素処理の組み合わせによって遊離しなかったことから、放射能の大半はリグニンまたは他の植物天然構成成分に取り込まれていると推定された。結合放射能の詳細な化学的特徴付けは最終収穫物である稲わら試料にて行い、その結果 ^{14}C はペクチン、リグニン、ヘミセルロースおよびセルロースに分布していることが明らかとなり、その中でもヘミセルロース画分の割合（19.6~33.6%TRR）が最も多かった。

代謝経路：スピネトラム-J の予想代謝経路を図 4 に、スピネトラム-L の予想代謝経路を図 5 に示す。スピネトラムの代謝には、2 種の代謝経路が関与していると考えられる。1 つ目の経路では、分子の forosamine 部分が変化し、N-demethyl 体および N-formyl 体が主な代謝物として生成する。また、これらの両代謝物および親化合物は 2 つ目の経路、すなわち、マクロライド骨格の 1 箇所以上での開裂または開環により変化を受けると推定される。この経路から生じる最初の代謝物は、更に変化または代謝を受けて、30 個以上の成分からなる複合混合物となると推定される。

表1 イネ試料中の総放射能残留量および各画分における放射能分布

	TRR (mg/kg)	中性有機溶媒 抽出液		酸性有機溶媒 抽出液		水層		抽出残渣	
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネトラム-J:</u>									
7 DAT	20.489	96.7	19.812	0.3	0.068	0.3	0.063	2.7	0.546
14 DAT	3.911	83.3	3.257	0.5	0.020	0.9	0.037	15.3	0.598
28 DAT	1.038	78.5	0.814	0.4	0.004	0.6	0.006	20.6	0.213
青刈り稲、72 DAT	0.089	62.6	0.056	0.2	<0.001	0.8	0.001	36.4	0.033
稲わら、162 DAT	0.213	58.3	0.124	0.1	<0.001	1.3	0.003	40.3	0.086
もみ、149 DAT	0.004	- ^a	- ^a	-	-	-	-	-	-
もみ殻、149 DAT	0.015	51.5	0.008	0.0 ^b	0.000	0.4	<0.001	48.1	0.007
玄米、149 DAT	0.001 ^c	- ^a	- ^a	-	-	-	-	-	-
<u>スピネトラム-L:</u>									
7 DAT	10.391	94.1	9.774	0.7	0.070	0.6	0.063	4.7	0.484
14 DAT	3.386	74.6	2.525	0.9	0.029	1.8	0.062	22.7	0.770
28 DAT	0.680	64.6	0.439	1.4	0.009	2.5	0.017	31.5	0.214
青刈り稲、72 DAT	0.018	44.3	0.008	0.0 ^b	0.000	5.2	0.001	50.5	0.009
稲わら、162 DAT	0.080	41.9	0.034	0.9	0.001	4.9	0.004	52.3	0.042
もみ、149 DAT	0.002 ^c	- ^a	- ^a	-	-	-	-	-	-
もみ殻、149 DAT	0.004 ^c	- ^a	- ^a	-	-	-	-	-	-
玄米、149 DAT	0.002 ^c	- ^a	- ^a	-	-	-	-	-	-

^a: 放射能濃度が低かったため抽出しなかった。

^b: 抽出液中には放射能は検出されなかった。

^c: 検出限界 (スピネトラム-J 0.001 mg/kg、スピネトラム-L 0.002 mg/kg) と定量限界 (スピネトラム-J 0.003 mg/kg、スピネトラム-L 0.006 mg/kg) の間の値であった。

表2 イネ試料中の親化合物および代謝物の放射能分布

	HPLC 分析供試 試料 (注)		ピーク A ^a (スピネラム-J)		ピーク B ^a (N-demethyl- 175-J)		ピーク C ^a (N-formyl- 175-J)		多成分 混合物 ^b	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネラム-J:</u>										
7 DAT	96.1	19.685	63.2	12.954	25.5	5.232	3.6	0.729	3.4	0.694
14 DAT	87.3	3.418	47.0	1.840	18.1	0.707	7.1	0.277	7.9	0.309
28 DAT	73.0	0.758	42.6	0.442	9.3	0.096	7.0	0.072	12.8	0.133
青刈りイネ, 72 DAT	52.6	0.047	27.8	0.025	5.2	0.005	11.6	0.010	5.5	0.005
稲わら, 162 DAT	38.1	0.082	11.3	0.024	3.4	0.007	2.3	0.005	18.2	0.040
	HPLC 分析供試 試料 (注)		ピーク A ^c (スピネラム-L)		ピーク B ^c (N-demethyl- 175-L)		ピーク C ^c (N-formyl- 175-L)		多成分 混合物 ^d	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
<u>スピネラム-L:</u>										
7 DAT	92.9	9.646	54.5	5.660	14.5	1.507	7.1	0.741	15.1	1.568
14 DAT	72.1	2.441	29.3	0.992	8.1	0.276	7.3	0.247	23.1	0.783
28 DAT	59.7	0.406	14.2	0.097	1.4	0.010	5.9	0.040	33.3	0.227
稲わら, 162 DAT	15.5	0.012	3.3	0.003	- ^e	- ^e	1.3	0.001	9.4	0.007

^a: ピーク A はスピネラム-J から、ピーク B は N-demethyl-175-J から、ピーク C は約 91% が N-formyl-175-J から、それぞれ成っていた。

^b: 34 個の別々の構成成分 (最大成分は 5.5% TRR)

^c: ピーク A はスピネラム-L から、ピーク B は約 74% が N-demethyl-L から、ピーク C は約 23% が N-formyl-175-L から、それぞれ成っていた。

^d: 36 個の別々の構成成分 (最大成分は 6.8% TRR)

^e: 放射能は検出されず

(注) 処理後 7 および 14 日目の試料の中性および酸性有機溶媒抽出液、並びに処理後 28 日目の試料、青刈りイネ、稲わら試料の中性有機溶媒抽出液については、HPLC 分析に先立ち、それぞれ、濃縮、ろ過操作や固相および分配抽出操作により精製する必要があったため、表 1 の中性および酸性有機溶媒抽出液の数値とは一致していない。

表3 処理後14日目試料（未成熟イネ）における抽出残渣の分析結果

	%TRR	
	ｽﾋﾞｰﾄﾗﾑ-J 処理試料	ｽﾋﾞｰﾄﾗﾑ-L 処理試料
ｱﾚﾄﾞﾘﾙ/水 抽出残渣 (注)	16.8 (0.657 mg/kg)	23.4 (0.791 mg/kg)
ADF 抽出ろ液	4.5	6.6
有機層	3.9	4.6
水層	0.6	2.0
ADF 抽出残渣	12.3	16.8
セルラーゼ 酵素分解	0.2	0.3
沈殿	12.1	16.5

ADF: 酸性デターゼント繊維

(注) ADF および酵素処理に十分な量の抽出残渣を得るために、新たにｱﾚﾄﾞﾘﾙ/水抽出を行ったため、表1の抽出残渣の数値とは一致していない。

表4 処理後162日目試料（稲わら）における抽出残渣の分析結果

	%TRR	
	ｽﾋﾞｰﾄﾗﾑ-J 処理試料	ｽﾋﾞｰﾄﾗﾑ-L 処理試料
抽出残渣（表1より）	40.3 (0.086 mg/kg)	52.3 (0.042 mg/kg)
ヘクチン画分	2.4	6.7
リグニン画分 1回目	2.9	1.6
2回目	2.3	0.7
ヘミセルロース画分	19.6	33.6
セルロース画分	4.9	0.0
残渣	8.2	9.6

図1 未成熟イネ (7, 14 および 28 日目)、青刈り (72 日目)、スピネトラム-J のもみ殻 (149 日目)、スピネトラム-J および-L の稲わら (162 日目) の各試料の抽出および分析スキーム

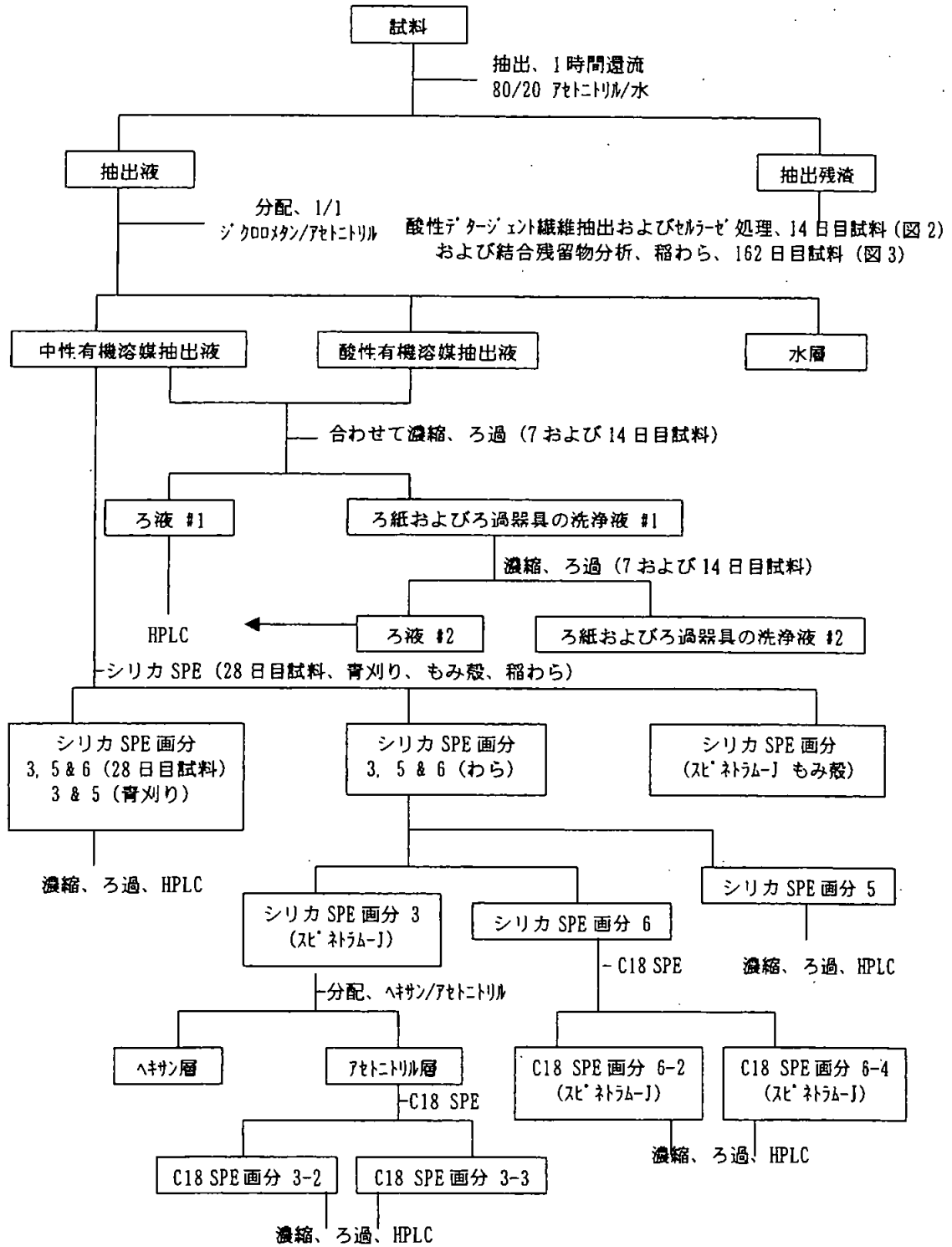


図2 未成熟イネ（14日目試料）の酸性デタージェント繊維（ADF）抽出およびセルラーゼ処理のスキーム

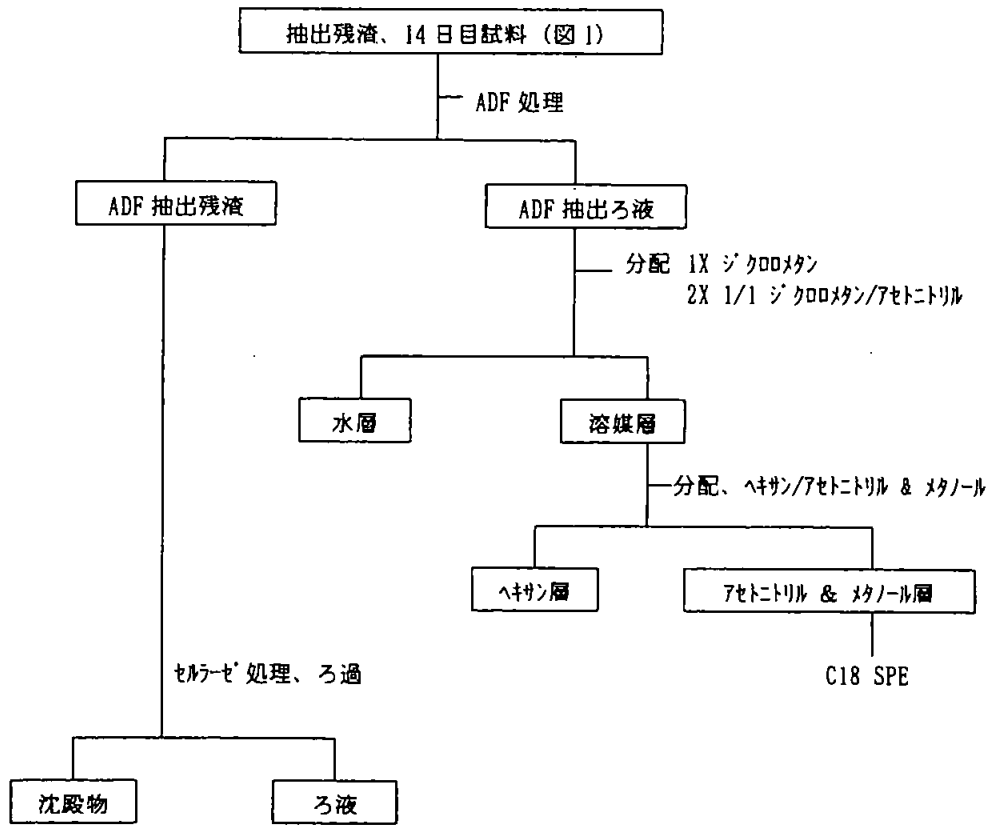


図3 稲わら（162日目試料）の抽出残渣（結合放射能）の分析スキーム

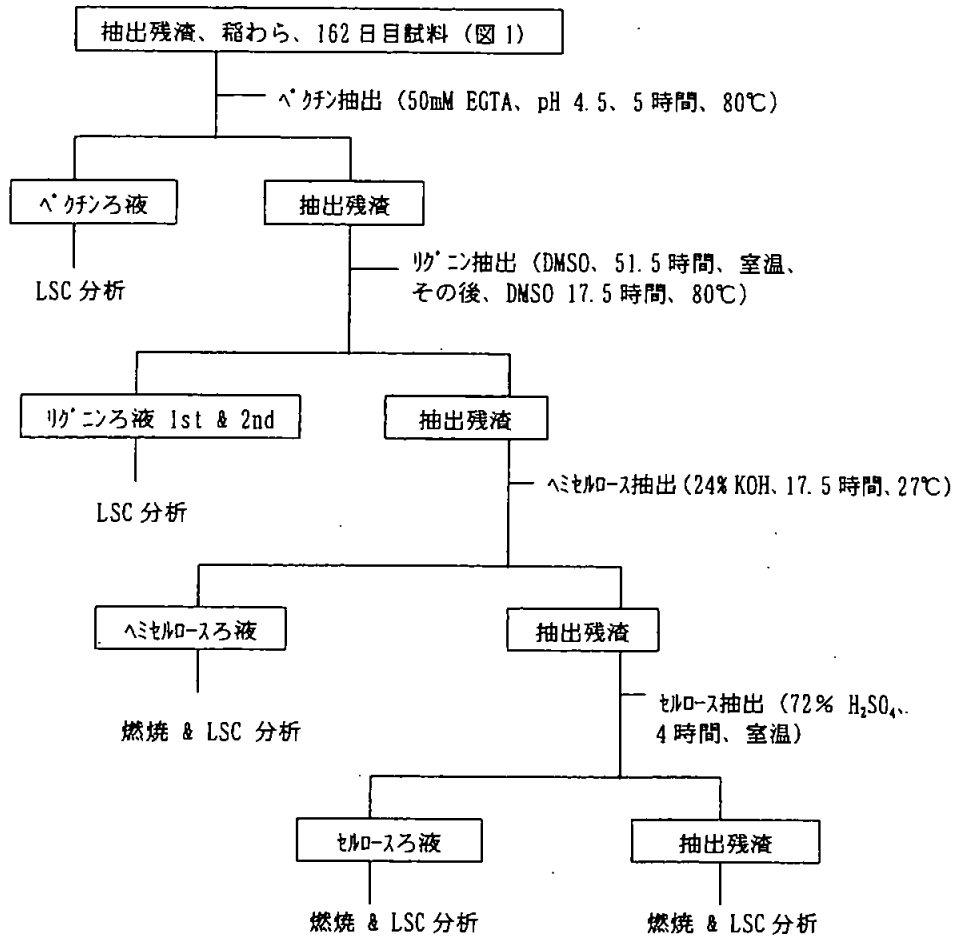


図4 イネにおけるスピネトラム-Jの予想代謝経路

図5 イネにおけるスピネトラム-Lの予想代謝経路

3. 土壌中運命に関する試験

(1) スピネトラムの好氣的湛水土壌中運命試験

(資料 III-1)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

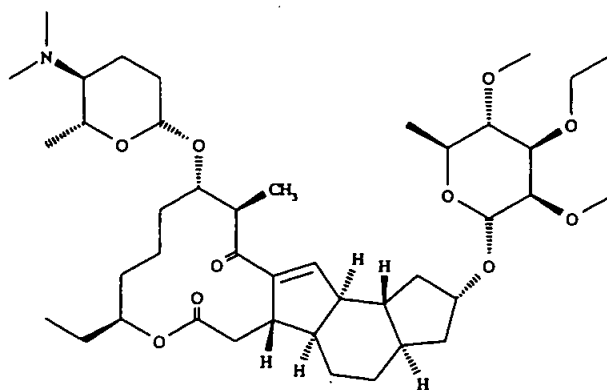
供試標識化合物：

^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2)の混合物 (約1 : 1 (w/w/w))

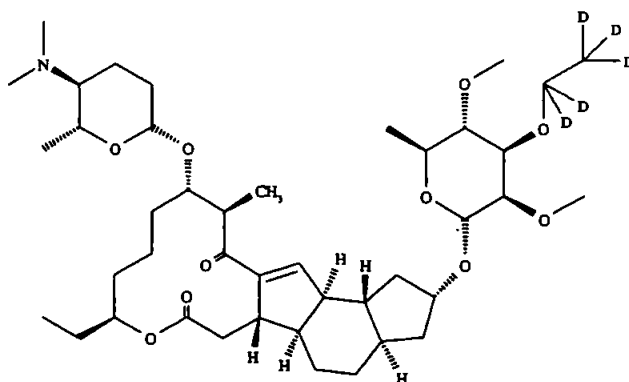
および

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5)の混合物 (約1 : 1 (w/w))

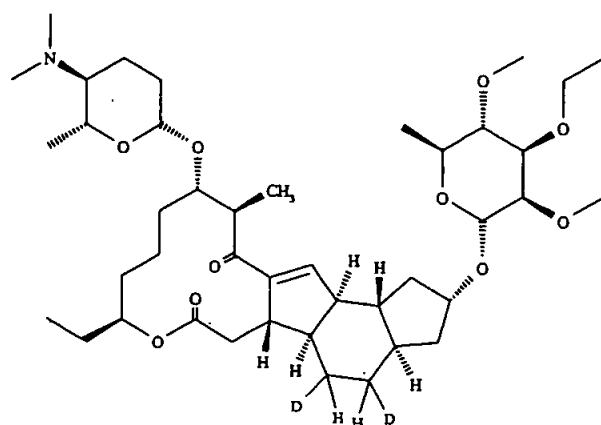
構造式：



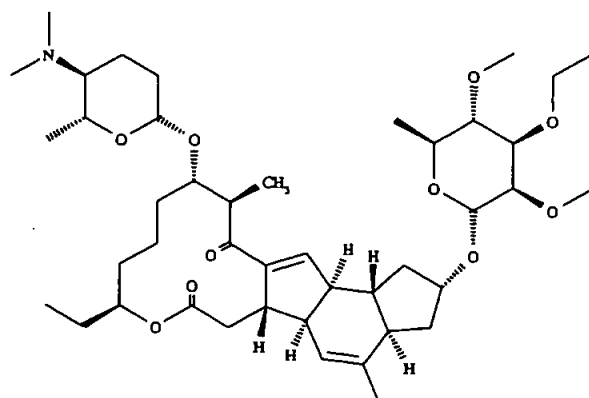
^{14}C -スピネトラム-J



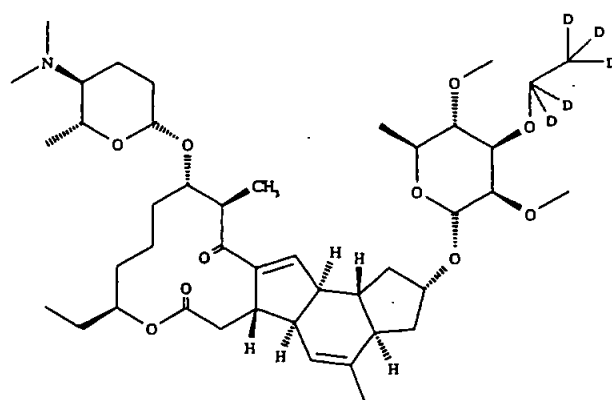
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



¹⁴C-スピネトラム-J (D2)



¹⁴C-スピネトラム-L



¹⁴C-スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試土壌：日本の水田土壌（茨城県桜川市）

項目	分析値	項目	分析値
砂 (%) *	54	pH (H ₂ O)	5.9
シルト (%) *	23	陽イオン交換容量 (meq/100 g 乾土)	23.2
粘土 (%) *	23		
有機炭素含量 (%)	2.1	粘土鉱物	アロフェン、カオリナイト

* USDA土性分類：砂質壇壤土

供試水： HPLC グレードの水

方法：

処理液の調製： 各標識化合物をそれぞれ 2 mL のアセトニトリルに溶解し、¹⁴C-スピネトラム-J は 3 種類がほぼ同量となるように、¹⁴C-スピネトラム-L は 2 種類がほぼ同量となるようにガラスバイアル内で混合し、それぞれアセトニトリルで希釈して処理液を調製した。最終濃度はいずれの処理液も約 613 $\mu\text{g a. i. / mL}$ であった。

試験系の調製： ガラス製遠心容器に供試土壌を深さ約 5 cm (乾土重量約 92 g) となるように入れた後、HPLC グレード水を添加して、土壌層/水層を 5 cm/1 cm とし、25°C の暗条件で最低 2 週間インキュベートした。

処理方法： 処理液 150 μL を水面上から処理し、試料容器を緩やかに回転させ、水層に被験物質を分散させた。処理濃度はいずれも 1.0 $\mu\text{g a. i. / g}$ であった。

試験条件： 処理した土壌は二酸化炭素を除去した加湿空気を通気させることにより好気的条件を維持し、25°C の暗条件で処理後 180 日間インキュベートした。

試料採取時期： 処理後 0、7、15、30、63、100、141 および 180 日目に、2 連で試料を採取した。

分析方法： 試料採取時には、フラスコ内の全土壌試料およびアルカリ性トラップを採取した。アルカリ性トラップは LSC 分析に供し、その一部は BaCl_2 を添加して放射能が沈殿するか調べることにより二酸化炭素であることを確認した。土壌試料の抽出および分析手順を図 1 に示す。

試料採取時に水層と土壌層を遠心分離し、デカンテーションにより水層を分離して、水層の一部を LSC および HPLC 分析に供した。土壌層はメタノール/5% NaCl /1 M NaOH (65/27/8) を用いて水平型振盪機により振盪抽出した。処理後 63 日以降の土壌残渣については、さらにメタノール/1 M HCl (90/10) を用いて抽出を行った。塩基性および酸性溶媒抽出液はそれぞれ pH 7 に調整後、LSC および HPLC 分析に供した。代謝分解物の同定は、LC/MS および分析用標品とのクロマトグラフィーにより行った。土壌残渣は風乾後、燃焼分析に供して LSC により土壌残渣中の放射能を測定した。試験終了時 (180 日目) の土壌残渣については、フミン、フミン酸およびフルボ酸に分画することにより、土壌残渣の化学的特徴付けを行った。

代謝分解半減期は、単純一次反応速度式あるいは一次マルチコンパートメントモデルを用いて算出した。

結果：

1) 放射能分布 (表1および2)

スピネトラム-J

塩基性溶媒土壌抽出液中の放射能は、0日目の処理量の24%から30日目に84%まで増加した後、試験終了時には76%に減少した。試験終了に向けて土壌残渣中の放射能が上昇したため、一部の土壌試料について、さらにメタノール/1 M HCl (90/10)を用いて抽出を行った。酸性溶媒により、さらに処理放射能の4~6%が抽出された。土壌残渣中の放射能は0日目の0.7%から試験終了時には14%に増加し、フミン画分に最も多くの放射能が認められた。試験終了時に処理放射能の4%が二酸化炭素としてアルカリ性トラップ中に存在した。水層中のスピネトラム-Jは0日目の処理量の66%から試験終了時には0.2%にまで減少した。土壌中のスピネトラム-Jは0日目の処理量の24%から30日目に76%まで上昇した後、試験終了時には45%に減少した。主要代謝物(処理放射能の10%以上)は水層中では検出されなかった。水層中で検出された微量代謝物はN-demethyl-175-Jであり、その量は試験期間を通して処理放射能の2%未満であった。土壌中で検出された主要代謝物はN-demethyl-175-Jであり、180日目に最大で処理量の30%であった。未同定¹⁴Cは平均で処理量の5%であり、多数の微量成分が含まれていた。

スピネトラム-L

塩基性溶媒土壌抽出液中の放射能は、0日目の処理量の32%から30日目に87%まで増加した後、試験終了時には73%に減少した。試験終了に向けて土壌残渣中の放射能が上昇したため、一部の土壌試料について、さらにメタノール/1 M HCl (90/10)を用いて抽出を行った。酸性溶媒により、さらに処理放射能の4~6%が抽出された。土壌残渣中の放射能は0日目の1%から試験終了時には14%に増加し、フミン画分に最も多くの放射能が認められた。試験終了時に放射能の3%が二酸化炭素としてアルカリ性トラップ中に存在した。水層中のスピネトラム-Lは0日目の処理量の56%から試験終了時には0.3%にまで減少した。土壌中のスピネトラム-Lは0日目の処理量の31%から30日目に79%まで上昇した後、試験終了時には65%に減少した。主要代謝物は水層中では検出されなかった。水層中で検出された微量代謝物はN-demethyl-175-Lであり、その量は試験期間を通して処理放射能の3%未満であった。土壌中で検出された主要代謝物はN-demethyl-175-Lであり、100日目に最大で処理量の11%であった。未同定¹⁴Cは平均で処理量の5%であり、多数の微量成分が含まれていた。

2) 推定半減期 (表3および4)

水層中、土壌中および系全体において、スピネトラム-Jの半減期は、それぞれ4、198

および193日、スピネトラム-Lの半減期は、それぞれ2,577および456日であった。N-demethyl-175-Jの分解速度は、この代謝分解物の濃度が試験終了時にも上昇し続けていたため算出できなかった。N-demethyl-175-Lの土壌中および系全体における半減期は、それぞれ217および238日であった。

3) 予想代謝分解経路 (図2および3)

スピネトラム-Jおよびスピネトラム-Lは好氣的湛水土壌中において、初めにN-脱メチル化反応を受けてそれぞれN-demethyl-175-JおよびN-demethyl-175-Lに分解し、更に代謝分解を受け、二酸化炭素へ無機化および土壌残渣へ強固に結合すると考えられる。

表1 スピネトラム-Jの好氣的湛水土壤における放射能分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)							
	処理後の経過日数 (日)							
	0	7	15	30	63*	100	141	180
揮散 (トラップ)	na	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	1.2	3.5
水層	70.4	23.8	11.6	6.1	4.0	2.9	2.0	1.8
スピネトラム-J	66.2	20.1	7.7	3.6	2.5	1.0	0.4	0.2
N-demethyl-175-J	1.3	1.1	1.6	0.9	0.9	1.6	1.4	1.3
未同定 ¹⁴ C	3.0	2.6	2.3	1.6	0.6	0.4	0.2	0.3
(代謝分解物数) <1%	3	2	17	16	5	4	1	3
1-3%	0	0	0	0	0	0	0	0
土壤抽出層								
塩基性溶媒抽出層	24.4	68.7	78.1	83.9	81.0	78.2	78.1	75.9
スピネトラム-J	23.8	65.1	72.6	75.8	71.9	59.7	49.1	41.3
N-demethyl-175-J	nd	1.6	2.5	4.9	4.6	16.7	25.7	27.5
未同定 ¹⁴ C	0.7	2.1	3.0	3.2	4.5	1.9	3.4	7.2
(代謝分解物数) <1%	0	0	1	3	1	1	2	5
1-3%	0	0	1	1	1	0	1	3
酸性溶媒抽出層	na	na	na	na	3.7	5.0	6.1	6.0
スピネトラム-J	na	na	na	na	na	3.2	2.9	3.4
N-demethyl-175-J	na	na	na	na	na	1.4	2.7	2.1
未同定 ¹⁴ C	na	na	na	na	na	0.5	0.7	0.6
(代謝分解物数) <1%	na	na	na	na	na	1	2	3
1-3%	na	na	na	na	na	0	0	0
土壤残渣	0.7	5.5	8.6	9.5	7.8	12.0	12.5	14.3
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	5.1
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	0.6
フミン	na	na	na	na	na	na	na	8.6
物質収支	95.5	98.0	98.3	99.6	96.8	98.5	100.0	101.6

数値は2連の平均値 (但し、*は1連の値、代謝分解物数は最大値を示す)

na : 実施せず

nd : 検出せず

表2 スピネトラム-Lの好氣的湛水土壤における放射能分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)							
	処理後の経過日数 (日)							
	0	7	15	30	63*	100	141	180
揮散 (トラップ)	na	0.0	0.0	0.2	0.5	0.6	0.7	3.1
水層	59.9	20.7	10.1	4.2	3.5	3.0	2.7	2.8
スピネトラム-L	55.8	12.0	4.7	1.8	1.1	0.5	0.5	0.3
N-demethyl-175-L	2.6	2.3	1.3	0.9	0.9	0.4	0.4	0.5
未同定 ¹⁴ C	1.5	6.5	4.1	1.6	1.4	2.2	1.8	2.0
(代謝分解物数) <1%	2	10	23	16	13	19	15	12
1-3%	0	0	0	0	0	0	0	0
土壤抽出層								
塩基性溶媒抽出層	31.6	72.0	78.9	87.3	83.0	78.8	76.9	72.8
スピネトラム-L	30.5	69.4	75.0	78.6	72.3	65.4	66.9	61.0
N-demethyl-175-L	nd	1.5	1.3	6.3	6.3	11.0	7.0	7.8
未同定 ¹⁴ C	1.1	1.2	2.6	2.5	4.4	2.6	3.1	4.0
(代謝分解物数) <1%	0	0	1	0	1	0	1	3
1-3%	0	0	1	0	1	1	0	1
酸性溶媒抽出層	na	na	na	na	3.7	4.3	5.0	5.6
スピネトラム-L	na	na	na	na	na	na	3.2*	4.0
N-demethyl-175-L	na	na	na	na	na	na	1.2*	1.1
未同定 ¹⁴ C	na	na	na	na	na	na	1.1*	0.7
(代謝分解物数) <1%	na	na	na	na	na	na	1	0
1-3%	na	na	na	na	na	na	0	0
土壤残渣	0.9	4.8	8.0	8.2	7.4	11.4	12.0	13.8
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	4.6
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	0.6
フミン	na	na	na	na	na	na	na	8.6
物質収支	92.4	97.5	97.1	99.9	98.1	98.1	97.3	98.1

数値は2連の平均値 (但し、*は1連の値、代謝分解物数は最大値を示す)

na: 実施せず

nd: 検出せず

申請者注:

2連の試料のうち1連の試料は、抽出割合が処理放射能の5%未満であり分析を実施しなかった。*は分析を行った1連の試料の分析結果を示す。

表3 スピネトラム-Jの推定半減期

	推定半減期 (日)	相関係数 (r^2)
水層 スピネトラム-J	4	0.9912
土壌層 スピネトラム-J	198	0.7387
系全体 スピネトラム-J	193	0.8776

単純一次反応速度式により算出

N-demethyl-175-Jの半減期は算出できず

表4 スピネトラム-Lの推定半減期

	推定半減期 (日)	相関係数 (r^2)
水層 スピネトラム-L	2*	0.9968
土壌層 スピネトラム-L	577	0.5593
系全体 スピネトラム-L	456	0.7893

単純一次反応速度式により算出

但し、*は一次マルチコンパートメントモデルを使用

N-demethyl-175-Lの半減期は算出できず

図1 土壌の抽出および分析手順

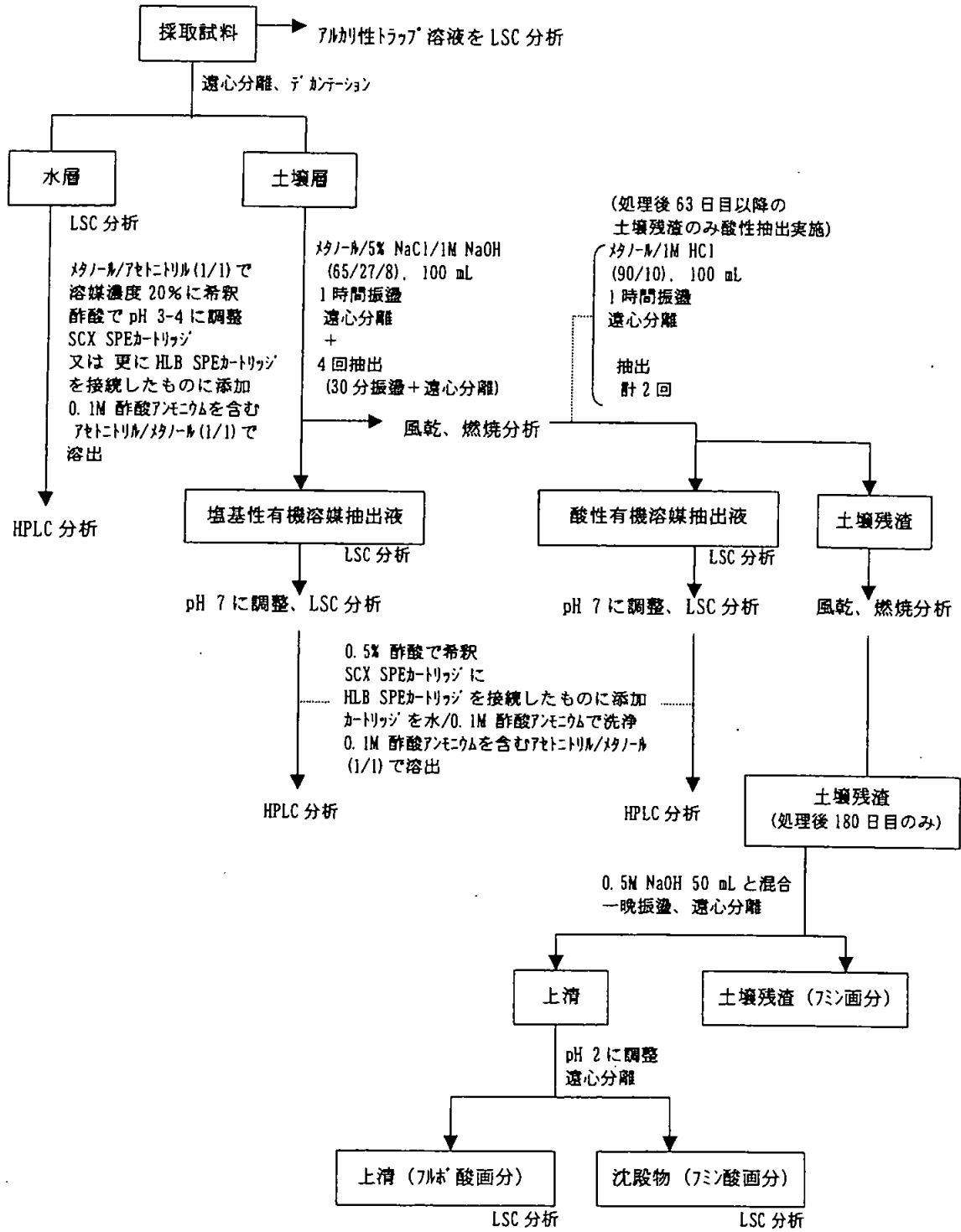


図2 スピネトラム-Jの好氣的湛水土壤中における予想代謝分解経路

図3 スピネトラム-Lの好氣的湛水土壤中における予想代謝分解経路

(2) スピネトラムの好氣的土壤中運命試験

(資料 III-2)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2005年 [GLP 対応]

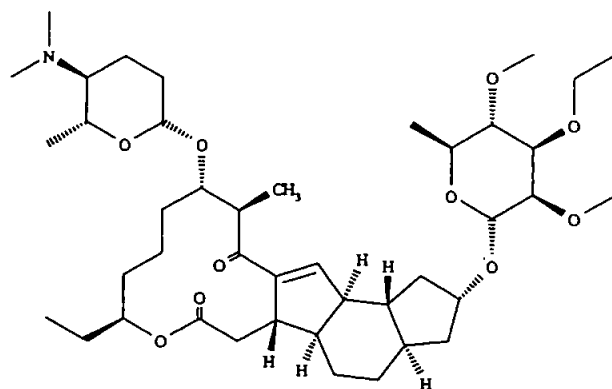
供試標識化合物：

^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2)の混合物 (約1 : 1 : 1 (w/w/w))

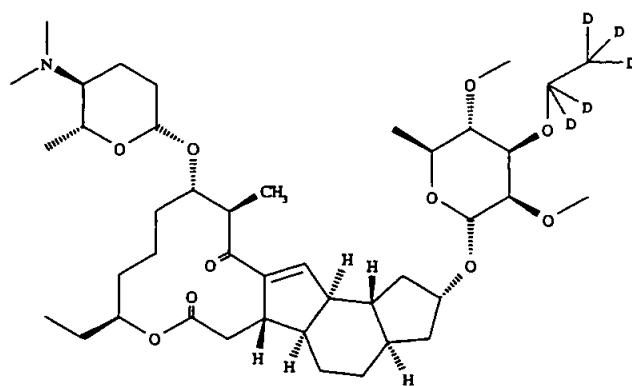
および

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5)の混合物 (約1 : 1 (w/w))

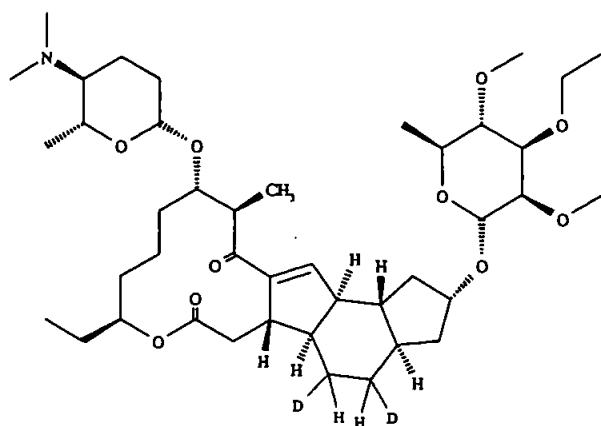
構造式：



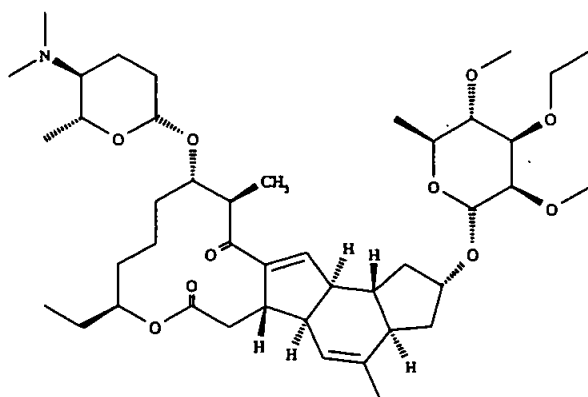
^{14}C -スピネトラム-J



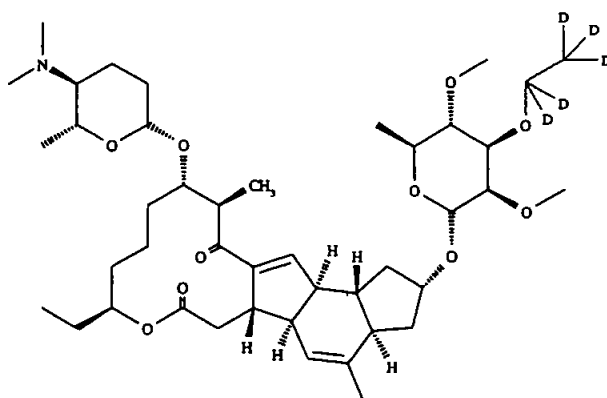
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



¹⁴C-スピネトラム-J (D2)



¹⁴C-スピネトラム-L



¹⁴C-スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試土壌：

以下の 4 種類の米国土壌を試験に使用した。これらの土壌の物理化学的性質を表 1 に示す。

ミシシッピ州 Commerce 壤土

アイオワ州 Fayette シルト質壤土

カリフォルニア州 Kimberlina/Nord 砂壤土

バージニア州 Slagle 壤土

方法：

処理液の調製：

¹⁴C-スピネトラム-J：各 ¹⁴C-スピネトラム-J をそれぞれ 1 mL のメタノールに溶解し、3 種類がほぼ同量となるように 25 mL 容メスフラスコ内で混合してアセトンで定容した。

¹⁴C-スピネトラム-L：各 ¹⁴C-スピネトラム-L をそれぞれ 1 mL のメタノールに溶解し、2 種類がほぼ同量となるように 25 mL 容メスフラスコ内で混合してアセトンで定容した。

処理方法：水分調整した各土壌サンプル（乾土 50g）に乾土あたり 0.2 μg ai/g となるように処理液を添加した後、処理土壌をアルカリ性トラップに接続したバイオメーターフラスコに入れ、好氣的条件下、25℃の暗所で、水分含量を 1/3 bar の 75% に調整して、1 年間インキュベートした。

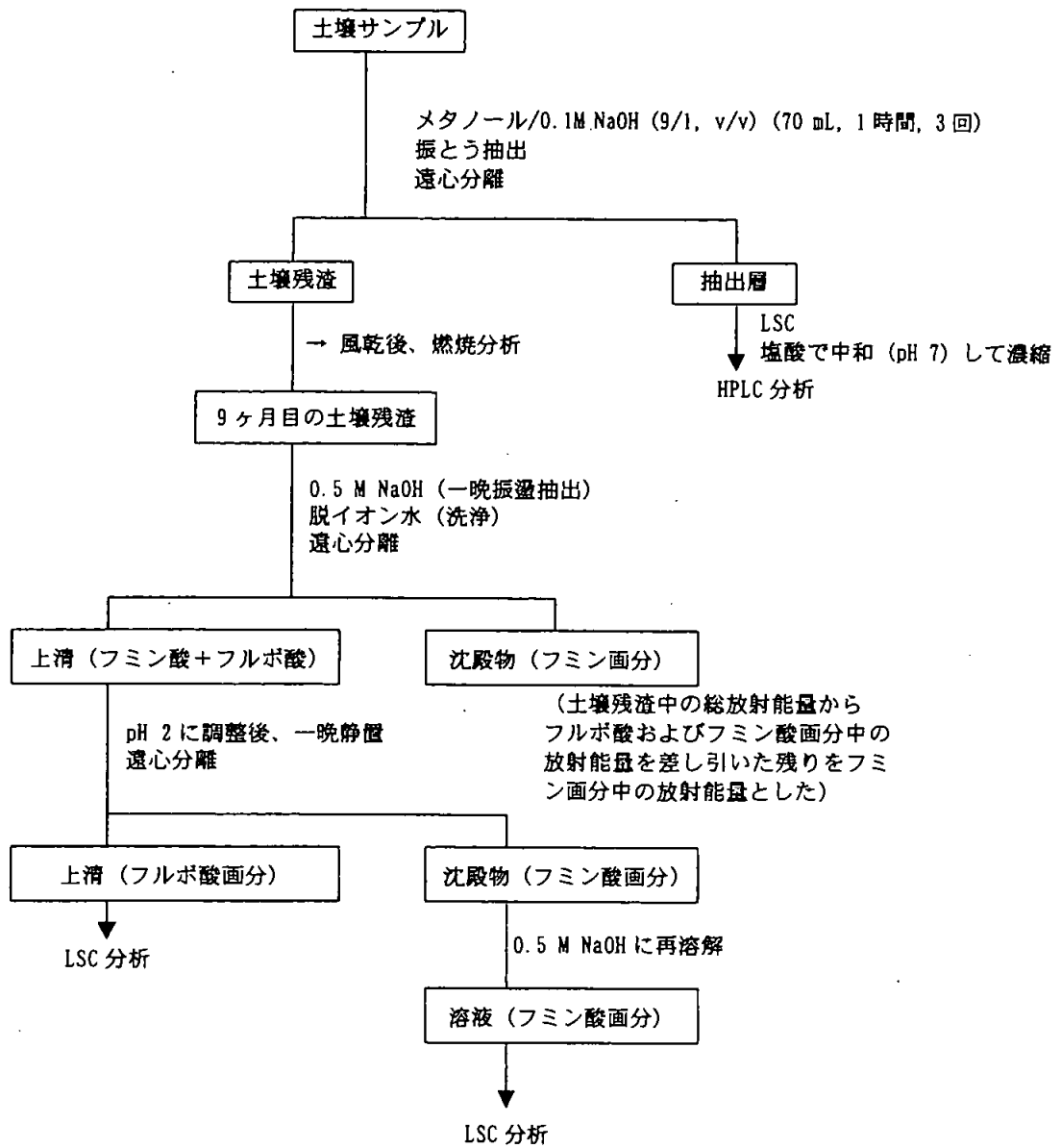
試料採取時期：処理後 0、3、7、および 14 日目ならびに 1、2、3、4、6、9、12 ヶ月目に、2 連で試料を採取した。

分析方法：試料採取時には、フラスコ内の全土壌試料およびアルカリ性トラップを採取し分析に供した。アルカリ性トラップの一部は LSC 分析に供した。土壌の抽出スキームを次ページに示す。

土壌試料はメタノール/0.1N NaOH (90/10) を用いて水平型振盪機により振とう抽出を行い、抽出物を LSC および HPLC 分析に供した。LC/MS および分析用標品とのコクロマトグラフィーにより代謝分解物の同定を行った。

土壌残渣は風乾後、燃焼分析に供して LSC により土壌残渣中の放射能を測定した。9 ヶ月目の試料については、土壌残渣を 0.5 M NaOH を用いてフミン、フミン酸およびフルボ酸に分画することにより、残渣中の放射能の化学的特徴付けを行った。

代謝分解半減期は、ModelMaker version 4.0 (Cherwell Scientific, Oxford, UK) を用いて算出した。



結果：

1) 放射能分布 (表 2~9)

スピネトラム-J およびスピネトラム-L は 4 種類のすべての土壌において経時的に分解し、実験終了時には処理量の 3%以下に減少した。

脱メチル化された代謝分解物である N-demethyl-175-J がスピネトラム-J の主要代謝分解物として認められた。この代謝分解物は Commerce 土壌において 125 日目に最高で処理量の 68.1%に達した後、実験終了時には 44.5%に減少した。Fayette 土壌、Kimberlina/Nord 土壌および Slagle 土壌においては、N-demethyl-175-J はそれぞれ最高で 61.9% (63 日目)、50.9% (92 日目) および 45.2% (14 日目) に達したが、実験終了時にはそれぞれ 40.9%、23.0% および 6.3% に減少した。

スピネトラム-L においても脱メチル化された代謝分解物である N-demethyl-175-L が主要代謝分解物として認められた。この代謝分解物は Commerce 土壌、Kimberlina/Nord 土壌および Slagle 土壌において、32 日目に最高でそれぞれ 41.0%、29.3% および 33.1% に達した後、実験終了時には 9.1%、0.8% および 6.9% に減少した。Slagle 土壌では、N-demethyl-175-L は 3 日目に最高で処理量の 12.2% に達した後、61 日目以降は 1% 未満で推移した。

他にスピネトラム-J およびスピネトラム-L から多数の代謝分解物が検出されたが、処理量の 10% を超える代謝分解物は検出されなかった。これらの代謝分解物の個数は最大 60 個に達し、そのほとんど大部分は処理量の 2% 未満の微量代謝分解物であった。

土壌残渣に含まれる放射能は実験終了時には両化合物で 4 種類の土壌において、処理量の 21.7~37.9% 存在した。スピネトラム-J では 3 種類の土壌でこれらの放射能の多くはフルボ酸画分に結合していたが、Slagle 土壌ではフミン画分に結合していた。スピネトラム-L では 4 種類の土壌とも土壌残渣中の放射能の大部分はフルボ酸画分に結合していた。

アルカリ性トラップに捕集された揮散性放射能は塩化バリウム水溶液を添加して沈殿したことにより、二酸化炭素 (CO₂) であることが確認された。実験終了時には ¹⁴CO₂ の発生量はスピネトラム-J で処理量の 5.0~35.2%、スピネトラム-L で 9.5~36.2% に達した。

2) 推定半減期 (表 10~11)

好氣的土壌中においてスピネトラム-J の半減期は 8~29 日であった。スピネトラム-L はスピネトラム-J よりも速く分解し、その半減期は 3~17 日であった。

主要代謝分解物である N-demethyl-175-J および N-demethyl-175-L の分解速度は親化合物よりも遅く、4 種類の土壌での半減期はそれぞれ 32~273 日 および 5~88 日と算出された。

3) 代謝分解経路 (図 1~2)

スピネトラム-J およびスピネトラム-L は好氣的土壤中において、初めに脱メチル化反応を受けてそれぞれ N-demethyl-175-J および N-demethyl-175-L に分解した後、多数の微量代謝分解物や土壤残渣への結合を経て、最終的には CO₂ に無機化され则认为られる。

表 1 供試土壤の物理化学的性質

土壤名	Commerce	Fayette	Kimberlina/Nord	Slagle
採取場所 州	ミシシッピ	アイオワ	カリフォルニア	バージニア
郡	Wasbington	Fayette	Kings	Caroline
土性	壤土	シルト質壤土	砂壤土	壤土
%砂	36	18	65	47
%シルト	50	62	25	33
%粘土	14	20	10	20
pH (水)	7.5	7.4	8.1	5.8
有機物含量 (%)	1.3	2.4	1.4	1.3
有機炭素含量 (%)	0.6	1.1	0.7	0.5
バイオマス (μg/g) 試験前	92.0	78.3	72.1	136.4
バイオマス (μg/g) 試験後	65.1	60.1	65.2	80.0
CEC (meq/100 g)	9.1	7.0	8.1	3.9
%含水量 (0.33 bar)	15.7	24.0	15.5	8.7

表2 スピネトラム-Jの好氣的土壤(Commerce 壤土)における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合(%)										
	処理後の経過日数(日)										
	0	3	7*	14	29	63	92	125	188	276	366
揮散 CO ₂	na	0.1	0.4	0.2	0.4	1.1	1.6	2.1	4.1	7.5	na
土壤抽出物	103.3	99.5	98.0	96.0	93.7	96.4	93.1	90.5	83.2	69.3	na
スピネトラム-J	101.9	90.1	82.8	60.9	40.1	15.8	10.5	4.8	2.1	1.2	na
N-demethyl-175-J	0.8	7.1	12.4	28.8	48.3	66.6	67.8	68.1	56.2	44.5	na
(代謝分解物数) <2%	0	2	2	5	5	10	12	9	10	9	na
2-5%	0	0	0	0	1	2	3	4	5	3	na
5-10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	na
土壤残渣	1.7	2.5	2.0	3.7	5.8	6.4	7.9	9.8	13.7	21.7	na
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	11.1	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2.3	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	8.4	na
物質収支	104.9	102.0	100.4	99.8	99.7	103.8	102.5	102.3	100.9	98.4	na

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す(ただし*は1連の値、また代謝分解物数は最大値を示す)

表3 スピネトラム-Jの好氣的土壤 (Fayetteシルト質壤土) における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	29	63	92	125	188	276	366
揮散 CO ₂	na	0.8	0.2	0.2	0.4	0.8	1.4	2.3	3.7	5.8	6.8
土壤抽出物	96.4	90.0	99.3	93.4	90.3	96.3	89.9	85.9	77.1	69.6	71.0
スピネトラム-J	94.5	78.6	76.7	62.0	44.5	20.6	13.2	7.1	4.2	2.2	1.7
N-demethyl-175-J	1.6	7.6	18.1	26.9	40.9	61.9	61.5	60.2	50.0	46.8	40.9
(代謝分解物数) <2%	1	3	1	2	5	7	10	6	7	6	22
2-5%	0	0	1	1	0	3	2	4	5	5	4
5-10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
土壤残渣	2.6	6.7	3.6	7.3	8.7	9.5	11.6	11.6	16.1	24.2	23.3
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	12.0	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2.3	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	9.9	na
物質収支	99.0	97.5	103.1	100.9	99.3	106.6	102.8	99.5	96.9	99.4	101.1

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし代謝分解物数は最大値を示す)

表4 スピネトラム-Jの好氣的土壤(Kimberlina/Nord 砂壤土)における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合(%)										
	処理後の経過日数(日)										
	0	3	7	14	29	63	92	125	188	276	366
揮散CO ₂	na	0.1	0.2	0.1	0.2	0.6	0.9	1.5	2.0	4.4	5.0
土壤抽出物	100.8	94.0	101.5	95.7	93.5	92.2	85.9	80.7	79.5	67.1	70.9
スピネトラム-J	97.9	80.9	74.1	54.1	41.6	22.0	10.6	7.1	4.4	3.0	2.8
N-demethyl-175-J	0.0	8.4	23.9	34.7	43.3	46.4	50.9	42.7	40.4	23.2	23.0
(代謝分解物数) <2%	1	2	1	4	7	11	13	18	23	19	26
2-5%	1	1	1	1	1	4	4	3	4	6	3
5-10%	0	0	0	0	0	1	0	2	2	1	4
土壤残渣	1.3	2.7	3.3	5.5	7.8	12.6	18.1	24.0	20.0	27.4	24.9
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	22.4*	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2.7*	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	3.6*	na
物質収支	102.1	96.7	104.9	101.2	101.5	105.2	104.9	106.1	101.5	98.8	100.8

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す(ただし*は1連の値、また代謝分解物数は最大値を示す)

表5 スピネトラム-Jの好氣的土壌 (Slagle 壤土) における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	29	63	92	125	188	276	366*
揮散 CO ₂	na	0.1	0.5	0.8	2.4	6.7	11.5	17.9	19.6	28.1	35.2
土壌抽出物	97.8	97.1	101.0	90.0	79.1	82.0	67.2	55.4	51.5	27.9	35.3
スピネトラム-J	93.2	68.7	52.0	27.4	13.2	7.6	6.3	3.3	3.8	2.8	2.0
N-demethyl-175-J	0.0	21.3	39.7	45.2	41.9	26.5	16.4	7.3	8.8	4.4	6.3
(代謝分解物数) <2%	4	4	3	7	19	51	29	57	18	37	49
2-5%	0	2	3	4	3	4	4	3	9	1	0
5-10%	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0
土壌残渣	0.6	3.1	2.8	6.7	11.9	12.3	22.6	25.0	26.6	37.9	29.0
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	11.2	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	0.8	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	25.9	na
物質収支	98.4	100.3	104.2	98.3	93.4	101.0	101.3	98.4	97.7	93.9	99.5

na : 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし*は1連の値、また代謝分解物数は最大値を示す)

表6 スピネトラム-Lの好氣的土壤(Commerce 壤土)における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	32	61	91	123	186	276	365
揮散 CO ₂	na	0.2	0.4	0.4	1.2	3.4	3.9	6.7	9.9	15.3	18.3
土壤抽出物	99.6	99.7	98.2	94.8	94.1	85.1	85.9	73.7	69.1	52.7	47.3
スピネトラム-L	95.0	84.1	57.3	54.9	35.1	7.1	4.8*	3.4	1.8	0.8	0.7
N-demethyl-175-L	0.0	8.3	23.5	31.0	41.0	27.3	27.3*	26.6	19.5	12.4	9.1
(代謝分解物数) <2%	1	4	9	6	8	47	47*	45	25	49	57
2-5%	1	2	1	1	2	4	6*	5	7	2	2
5-10%	0	0	1	0	0	0	0*	0	1	0	0
土壤残渣	3.2	3.4	4.3	4.4	7.3	11.1	14.4	23.0	21.7	26.2	33.4
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	18.1	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	3.5	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	4.6	na
物質収支	102.7	103.2	102.8	99.5	102.5	99.5	104.2	103.3	100.6	94.2	99.0

na : 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし*は1連の値, また代謝分解物数は最大値を示す)

表7 スピネトラム-Lの好氣的土壤 (Fayetteシルト質壤土) における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	32	61	91	123	186	276	365
揮散 CO ₂	na	0.2	0.3	0.4	1.2	3.3	5.5	7.7	10.6	16.1	17.3
土壤抽出物	96.2	96.6	96.2	90.8	89.3	79.4	71.1	62.3	59.1	53.7	39.7
スピネトラム-L	87.8	72.1	46.0	42.3	27.3	6.1	2.3	2.8	1.6	1.8	0.3
N-demethyl-175-L	0.0	12.5	28.5	25.9	29.3	16.1	8.4	9.3	8.0	3.9	0.8
(代謝分解物数) <2%	1	0	6	4	18	46	44	46	22	33	42
2-5%	2	1	5	5	6	8	9	7	8	7	4
5-10%	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
土壤残渣	4.4	5.1	7.0	8.4	12.5	18.7	21.5	29.5	28.0	31.1	36.6
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	17.4	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	4.9	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	9.3	na
物質収支	100.6	101.8	103.5	99.5	103.0	101.3	98.1	99.5	97.6	100.9	93.5

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし代謝分解物数は最大値を示す)

表8 スピネトラム-Lの好氣的土壤 (Kimberlina/Nord 砂壤土) における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	32	61	91	123	186	276	365
揮散 CO ₂	na	0.1	0.2	0.3	0.6	1.8	2.8	4.3	6.4	12.5	9.5
土壤抽出物	99.6	103.4	97.9	97.2	93.7	84.4	82.6	72.8	69.5	55.4	59.4
スピネトラム-L	96.6	86.2	48.4	54.5	33.2	8.4	3.5	5.8	3.8	2.7	2.0
N-demethyl-175-L	0.0	14.0	26.8	29.2	33.1	19.7	15.9	17.2	14.3	6.8	6.9
(代謝分解物数) <2%	0	0	1	5	8	41	39	52	30	46	51
2-5%	1	2	5	3	6	9	10	8	7	5	7
5-10%	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0
土壤残渣	2.0	3.0	3.7	5.4	9.9	15.5	16.8	28.8	24.4	31.4	34.8
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	17.0	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2.1	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	12.3	na
物質収支	101.6	106.4	101.7	102.8	104.1	101.6	102.3	105.8	100.4	99.2	103.6

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし代謝分解物数は最大値を示す)

表9 スピネトラム-Lの好氣的土壤 (Slagle 壤土) における放射能の分布および代謝分解

	処理放射能に対する割合 (%)										
	処理後の経過日数 (日)										
	0	3	7	14	32	61	91	123	186	276	365
揮散 CO ₂	na	0.5	1.0	2.4	6.0	12.0	17.8	22.8	24.9	34.9	36.2
土壤抽出物	96.9	97.3	86.1	81.1	71.5	56.4	48.9	35.2	36.4	26.5	21.1
スピネトラム-L	88.7	46.4	16.7	10.2	5.8	4.9	2.4	3.1	3.3*	3.4	2.9
N-demethyl-175-L	0	12.2	10.7	8.0	2.6	0.8	0.6	0.3	0.0*	0.4	0.6
(代謝分解物数) <2%	1	na	22	22	50	60	47	51	16*	32	50
2-5%	1	na	9	12	4	4	4	0	3*	2	0
5-10%	1	na	1	0	1	0	0	0	0*	0	0
土壤残渣	1.3	5.3	11.0	14.9	21.5	31.8	25.6	35.0	26.5	27.3	31.7
フルボ酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	18.8	na
フミン酸	na	na	na	na	na	na	na	na	na	3.8	na
フミン	na	na	na	na	na	na	na	na	na	4.6	na
物質収支	98.2	102.9	98.0	98.4	98.9	100.3	92.3	92.9	87.9	88.7	89.0

na: 実施せず, 数値は2連の平均値で示す (ただし*は1連の値、また代謝分解物数は最大値を示す)

表10 スピネトラム-J および代謝分解物 N-demethyl-175-J の推定半減期

供試土壌	推定半減期		相関係数 (r ²)
	スピネトラム-J	N-demethyl-175-J	
Commerce 壤土	23	253	0.995
Fayette シルト質壤土	29	273	0.980
Kimberlina/Nord 砂壤土	23	156	0.952
Slagle 壤土	8	32	0.962

表11 スピネトラム-L および代謝分解物 N-demethyl-175-L の推定半減期

供試土壌	推定半減期		相関係数 (r ²)
	スピネトラム-L	N-demethyl-175-L	
Commerce 壤土	17	88	0.953
Fayette シルト質壤土	15	18	0.950
Kimberlina/Nord 砂壤土	17	29	0.918
Slagle 壤土	3	5	0.980

図1 スピネトラム-Jの予想土壌代謝分解経路

図2 スピネトラム-Lの予想土壌代謝分解経路

(3) 土壌表面光分解試験

スピネトラムの土壌表面光分解試験

(資料 III-3)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2005年 [GLP 対応]

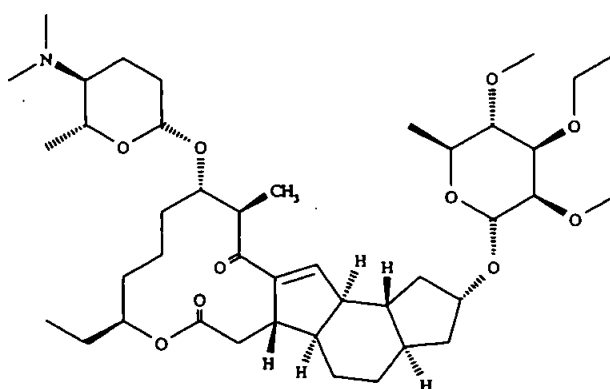
供試標識化合物：

^{14}C -スピネトラム-J、 ^{14}C -スピネトラム-J (D5)、 ^{14}C -スピネトラム-J (D2)の混合物 (約 1:1:1 (w/w/w))

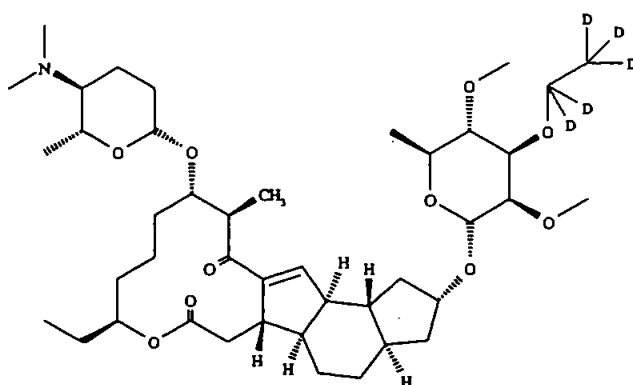
および

^{14}C -スピネトラム-L、 ^{14}C -スピネトラム-L (D5)の混合物 (約 1:1 (w/w))

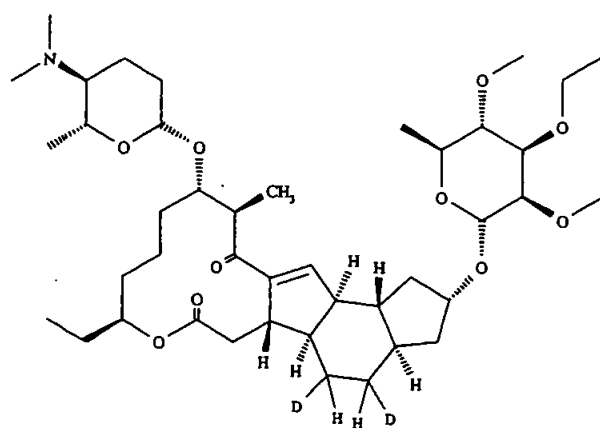
構造式：



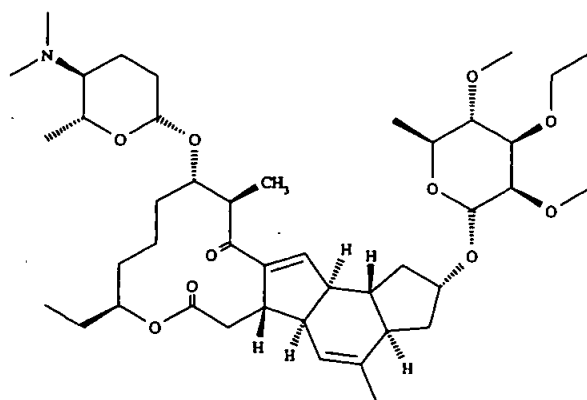
^{14}C -スピネトラム-J



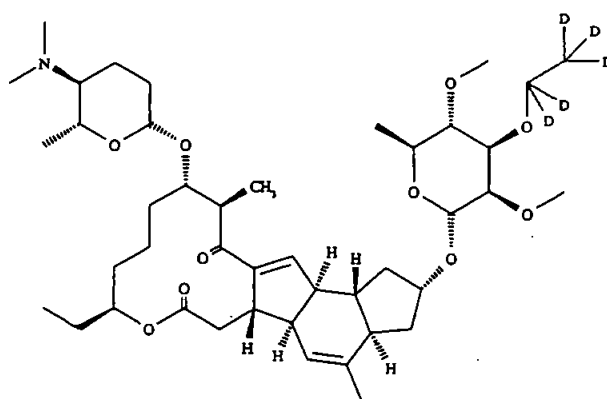
^{14}C -スピネトラム-J (D5)



^{14}C -スピネトラム-J (D2)



^{14}C -スピネトラム-L



^{14}C -スピネトラム-L (D5)

化学名：

スピネトラム-J；

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

および

スピネトラム-L；

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[(2*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl
6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-J (D2)
標識位置			
比放射能			
放射化学的純度			

	¹⁴ C-スピネトラム-L	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		
比放射能		
放射化学的純度		

供試土壌および土性：

供試土壌として、米国ミシシッピ州 Commerce 壤土を使用した。土壌の物理化学的性質を表 1 に示す。

光源：6500W キセノンランプ（290 nm 未満の波長の光を除くために、内部に CIRA フィルターおよび外部に Soda Lime フィルターを装備）を用いて連続照射した。

光強度：44 W/m² (300-400 nm)、399 W/m² (290-800 nm)

試験方法：

処理液の調製：各被験物質をアセトニトリルに溶解して、スピネトラム-J およびスピネトラム-L の濃度がそれぞれ 987 µg/mL および 844 µg/mL の処理液を調製した。

試験系：試験容器として照射区には石英製の平底円型フラスコ、暗対照区には褐色バイレックスガラスバイアルを使用した。各試験容器に、約 2.5 g（乾土重量）の土壌を秤量し、土壌中濃度が 20 µg/g となるようにピペットを用いて、各処理液を土壌表面上に均一に処理した。CO₂ および揮散性物質を捕集するためのトラップには接続しなかったが、各試料採取時にテフロン加工したセプタムキャップを通して試料の上部の空気を抜き、アルカリ性溶液に CO₂ および揮散性物質を捕集した。試験温度を 25 ± 1℃、土壌水分量を 1/3 bar の 75% に維持し、試験期間は 15 日間（スピネトラム-J）および 18 日間（スピネトラム-L）に設定した。また、試験期間中に試料が受けた光量を定量するために、*p*-ニトロアセトフェノン/ピリジン化学光量計溶液を使用した。光量計データに基づくと、15 日間および 18 日間の連続照射は、それぞれ北緯 40 度における夏の自然太陽光換算で 38 日間および 33 日間の照射に相当した。

試料採取：スピネトラム-J 試料は処理後 0、1、3、6、10、15 日目に、スピネトラム-L 試料は処理後 0、0.25、1、4、8、11、18 日目に、2 連の試料を採取した。

分析方法：各試料採取時には、土壌試料および揮散性物質捕集用のアルカリ性溶液を分析に供した。アルカリ性トラップの一部はLSC分析に供した。土壌試料はメタノール/0.1 N NaOH (90/10) を用いて抽出し、LSC および HPLC 分析に供した。代謝分解物の同定は行わなかった。土壌残渣は風乾後、燃焼分析に供してLSCにより土壌残渣中の放射能を測定した。一部の土壌残渣については、0.5 M NaOH 水溶液で抽出した後、フルボ酸、フミン酸およびフミンに分画することにより化学的特徴付けを行った。代表的な抽出および分析方法の概略図を図1に示す。

分解速度の決定：一次分解反応速度式を用いて、ModelMaker 4.0 を使用して算出した。

結果：

スピネトラム-J およびスピネトラム-L の照射区および暗対照区における放射能分布の経時変化を表2～3に、予想分解経路を図2～3に示す。

- 1) スピネトラム-J：照射区および暗対照区における物質収支はそれぞれ処理放射能の92.9～99.4%および98.0～102.8%であった。暗対照区では試験終了時に処理量の87.8%が親化合物スピネトラム-Jのまま残存していたが、照射区ではスピネトラム-Jは試験終了時には58.2%まで減少し、土壌残渣、揮散性物質および多数の低濃度の分解物（各分解物は処理量の5%未満）となった。試験終了時にアルカリトラップに捕集された揮散性放射能は処理量の1.9%であった。
- 2) スピネトラム-L：照射区および暗対照区における物質収支はそれぞれ処理放射能の92.7～99.6%および98.7～102.6%であった。暗対照区では試験終了時に処理量の82.9%が親化合物スピネトラム-Lのまま残存していたが、照射区ではスピネトラム-Lは試験終了時には25.7%まで減少し、土壌残渣、揮散性物質および多数の低濃度の分解物（各分解物は処理量の7%未満）となった。土壌残渣のアルカリ分画の結果、土壌残渣中の放射能に対して、64.3～66.0%がフルボ酸画分に、5.8～6.9%がフミン酸画分に、12.0～26.6%がフミン画分に結合していることが示された。試験終了時にアルカリトラップに捕集された揮散性放射能は処理量の3.4%であった。
- 3) 推定半減期：照射区および暗対照区におけるスピネトラム-J およびスピネトラム-L の分解半減期（照射区は北緯40度における夏の自然太陽光換算値）および暗対照区での反応速度定数を用いて補正した光分解半減期を表4に示す。

表1 米国ミシシッピ州 Commerce 壤土の物理化学的性質

土壤名		Commerce
採取場所	州	ミシシッピ
	郡	Washington
土性		壤土
	%砂	36
	%シルト	50
	%粘土	14
pH (水)		7.5
有機物含量 (%)		1.3
有機炭素含量 (%)		0.6
バイオマス ($\mu\text{g/g}$) 試験前		92.0
CEC (meq/100 g)		9.1
%容水量 (0.33 bar)		15.7
容積重 (g/cm^3)		1.18

表2 スピネトラム-Jの土壌表面光分解における放射能の分布

試験化合物		処理放射能に対する割合 (%)					
スピネトラム-J		処理後の経過日数 (日)					
		0	1	3	6	10	15
光 照 射 区	スピネトラム-J	97.1	88.7	87.3	73.9	82.3	58.2
	未同定分解物 ^{a)}	0.3	4.8	2.8	14.4	11.9	25.9
	抽出 ¹⁴ C 合計	97.4	93.5	90.1	88.3	94.2	84.1
	アルカリ性トラップ	na	0.1	0.3	0.6	1.0	1.9
	土壌残渣	1.7	2.7	3.0	5.1	4.2	7.0
	物質収支	99.1	96.3	93.4	94.0	99.4	92.9
暗 対 照 区	スピネトラム-J	97.1	94.9	94.2	93.0	93.7	87.7
	未同定分解物 ^{a)}	0.3	2.3	2.9	4.0	6.8	8.0
	抽出 ¹⁴ C 合計	97.4	97.2	97.1	97.0	100.5	95.7
	アルカリ性トラップ	na	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	土壌残渣	1.7	2.0	2.2	2.3	2.3	2.3
	物質収支	99.1	99.2	99.3	99.2	102.8	98.0

na: 分析せず

a) 多数の分解物から成る。各分解物は処理放射能の<5%

表3 スピネトラム-Lの土壌表面光分解における放射能の分布

試験化合物		処理放射能に対する割合 (%)						
スピネトラム-L		処理後の経過日数 (日)						
		0	0.25	1	4	8	11	18
光 照 区	スピネトラム-L	93.2	83.7	61.0	54.9	42.9	30.6	25.7
	未同定分解物 ^{a)}	3.6	11.1	30.7	34.2	41.9	51.2	48.0
	抽出 ¹⁴ C合計	96.8	94.7	91.7	89.1	84.8	81.8	73.7
	アルカリ性トラップ	na	0.1	0.3	1.1	2.4	2.5	3.4
	土壌残渣	1.9	3.8	7.3	9.5	10.7 ^{b)}	13.8 ^{c)}	15.5
	物質収支	98.7	98.7	99.3	99.6	97.9	98.2	92.7
暗 対 照 区	スピネトラム-L	93.2	94.2	93.9	93.9	92.4	87.4	82.9
	未同定分解物 ^{a)}	3.6	3.6	3.2	5.3	7.8	9.3	15.6
	抽出 ¹⁴ C合計	96.8	97.8	97.1	99.1	100.2	96.6	98.5
	アルカリ性トラップ	na	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	土壌残渣	1.9	1.8	1.9	2.2	2.3	2.5	3.0
	物質収支	98.7	99.6	99.0	101.4	102.6	99.1	101.6

na: 分析せず

a) 多数の分解物から成る。各分解物は処理放射能の<7%

b) アルカリ分画の結果 (土壌残渣¹⁴Cに対する割合): フルボ酸 66.0%、
フミン酸 6.9%、フミン 26.6%

c) アルカリ分画の結果 (土壌残渣¹⁴Cに対する割合): フルボ酸 64.3%、
フミン酸 5.8%、フミン 12.0%

表4 スピネトラム-Jおよびスピネトラム-Lの光分解半減期

供試土壌	試験化合物	推定半減期		光分解半減期**
		光照射区'	暗対照区	
米国ミシシッピ 州 Commerce 壤土	スピネトラム-J	63 日 ($r^2=0.784$)	139 日 ($r^2=0.703$)	116 日
	スピネトラム-L	15 日 ($r^2=0.772$)	99 日 ($r^2=0.722$)	18 日

r^2 : 相関係数

*: 化学光量計データに基づく、北緯 40 度における夏の自然太陽光換算値

** : 暗対照区における反応速度定数を用いて補正した値

申請者注 : 使用したキセノンランプ光源の光強度は 44 W/m^2 (300-400 nm) であることから、東京 (北緯 35 度)、春におけるスピネトラムの光分解半減期は次のように求められる。

スピネトラム-J: 170 日

スピネトラム-L: 63 日

図1 抽出および分析方法の概略図

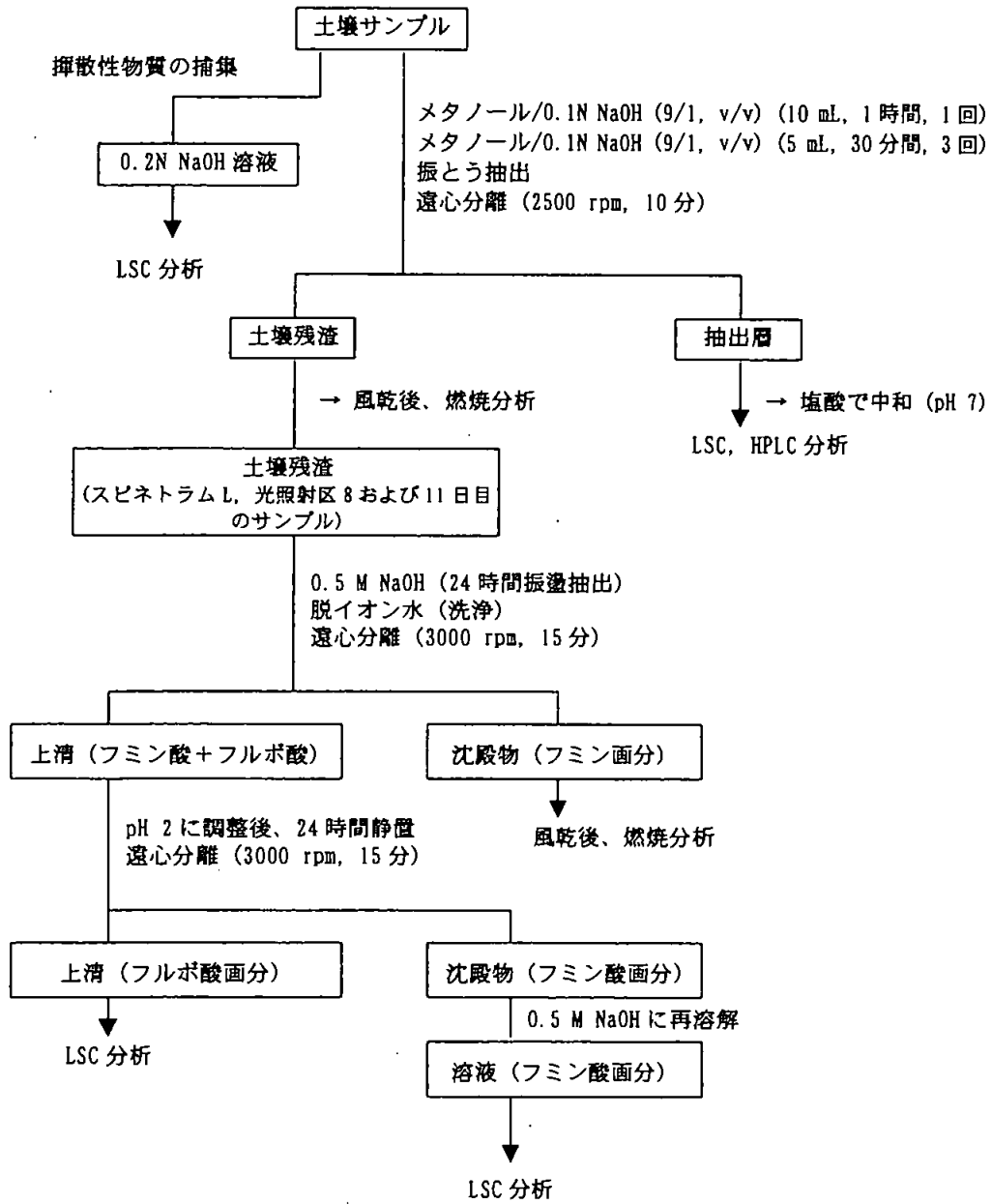


図2 スピネトラム-Jの予想土壌表面光分解経路

図3 スピネトラム-Lの予想土壌表面光分解経路

4. 水中運命に関する試験

(1) スピネトラムの加水分解運命試験

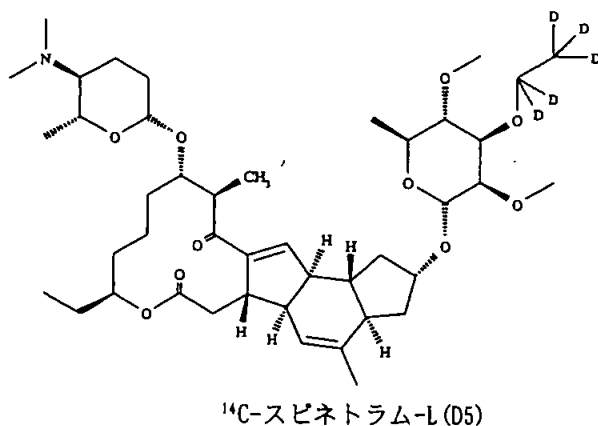
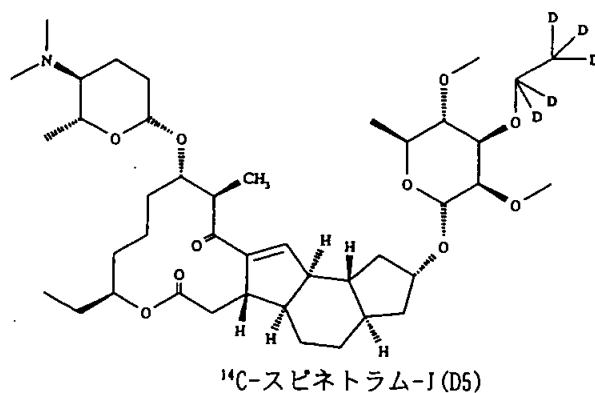
(資料 IV-1)

試験機関：Dow AgroSciences LLC

報告書作成年：2005年 [GLP対応]

供試化合物：¹⁴C-スピネトラム-J(D5) および ¹⁴C-スピネトラム-L(D5)

構造式：



化学名：

(2*R*, 3*aR*, 5*aR*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bR*)-13-[[*(2S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-14-methyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 4, 5, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-octadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl

6-deoxy-3-*O*-ethyl-2, 4-di-*O*-methyl-β-*L*-mannopyranoside

および

(2*S*, 3*aR*, 5*aS*, 5*bS*, 9*S*, 13*S*, 14*R*, 16*aS*, 16*bS*)-13-[[*(2S*, 5*S*, 6*R*)-5-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy]-9-ethyl-4, 14-dimethyl-7, 15-dioxo-2, 3, 3*a*, 5*a*, 5*b*, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16*a*, 16*b*-hexadecahydro-1*H*-as-indaceno[3, 2-*d*]oxacyclododecin-2-yl

6-deoxy-3-O-ethyl-2,4-di-O-methyl-β-L-mannopyranoside

	¹⁴ C-スピネトラム-J (D5)	¹⁴ C-スピネトラム-L (D5)
標識位置		

比放射能
放射化学的純度

供試水：

以下の3種類の緩衝液を使用した。各緩衝液は HPLC グレードの水を用いて調製した。各緩衝液は、調製後、121℃で20分間、オートクレーブ滅菌した。

pH 5 (0.01M 酢酸緩衝液)

0.82g 酢酸ナトリウムに水を加え 1L に僅かに満たない溶液を調製し、濃塩酸を添加して pH 5 に調整後、水を加えて溶液の最終容量を 1L とした。

pH 7 (0.01M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液)

1.21g トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンに水を加え 1L に僅かに満たない溶液を調製し、濃塩酸を添加して pH 7 に調整後、水を加えて溶液の最終容量を 1L とした。

pH 9 (0.01M ホウ酸緩衝液)

3.81g 四ホウ酸ナトリウムに水を加え 1L に僅かに満たない溶液を調製し、濃塩酸を添加して pH 9 に調整後、水を加えて溶液の最終容量を 1L とした。

試験方法：

各被験物質のアセトニトリル溶液(濃度 50 μg/mL) 150 μL を 15mL の各緩衝液に添加し、被験物質濃度が 0.5 μg/mL の試験水を調製した(試験水中におけるアセトニトリル濃度は 1%)。各試験水の入った試験容器を、25℃で 30 日間、暗条件下でインキュベートした。処理後 0、2、7、14、21 および 30 日目に試料を採取し、各試料にアセトニトリル/メタノール (1/1) を添加して溶解助剤濃度を 20% とした。pH 5 および pH 9 の試料については保存安定性の確保のために中和した後、各試料を LSC および HPLC 分析に供し、スピネトラム-J およびスピネトラム-L の残存量を測定した。さらに LC/MS を用いて、分析用標品とのクロマトグラフィーにおける保持時間およびマススペクトルを比較することにより、分解物の同定を行った。スピネトラム-J およびスピネトラム-L の半減期は、一次反応速度式によって求めた分解速度定数を基に算出した。

試験結果：

1) ¹⁴C 分布：スピネトラム-J およびその分解物の分布の経時変化を表 1 に示す。試験

期間中の平均物質収率は、pH 5、7 および 9 において、添加放射エネルギーに対してそれぞれ 96.3~99.2%、94.8~98.6%、93.0~98.2%の範囲であった。スピネトラム-J は、25℃において pH 5 および pH 7 緩衝液中で加水分解的に安定であった。pH 9 においては、N-demethyl-175-J が微量分解物として認められ、インキュベーション 30 日目に最大で添加放射エネルギーの 6.7%に達した。

スピネトラム-L およびその分解物の分布の経時変化を表 2 に示す。試験期間中の平均物質収率は、pH 5、7 および 9 において、添加放射エネルギーに対してそれぞれ 92.7~95.7%、96.2~97.4%、95.3~98.5%の範囲であった。スピネトラム-L は、25℃において pH 5 および pH 7 緩衝液中で加水分解的に安定であった。pH 9 においては、N-demethyl-175-L が主要分解物として認められ、インキュベーション 30 日目に最大で添加放射エネルギーの 11.9%に達した。その他の微量分解物は検出されなかった。

- 2) 加水分解経路：スピネトラム-J およびスピネトラム-L は、いずれも pH 5 および pH 7 において加水分解は認められなかった。pH 9 においては、図 1 に示すように、いずれの化合物も N-脱メチル化反応が認められた。
- 3) 推定半減期：スピネトラム-J の pH 9 における分解速度は、計算過程で誤差により分解速度に 0 が含まれるため*、算出することができなかった。スピネトラム-L の分解速度定数は 0.0045/日であり、半減期 154 日と算出された。

温度	pH	半減期 (日)	
		スピネトラム-J	スピネトラム-L
25℃	5	安定	安定
	7	安定	安定
	9	算出不能*	154

* 申請者注：分解が遅いために、算出した結果は誤差より分解速度の方が小さく、信頼のおける数値が得られなかった。

表1 25℃、pH 5, 7, 9 緩衝液中におけるスピネトラム-J およびその分解物の分布の経時変化

添加放射能に対する割合 (%)						
温度	pH	経過 日数	スピネトラ ム-J	N-demethyl -175-J	未同定 放射能	物質収支
25℃	5	0	94.3	-	2.1	96.3
		2	95.4	-	3.0	98.4
		7	98.2	-	0.5	98.7
		14	97.4	-	1.7	99.0
		21	96.3	-	2.9	99.2
		30	96.1	-	2.7	98.7
	7	0	91.5	-	3.3	94.8
		2	93.8	-	4.1	97.8
		7	95.4	-	2.7	98.1
		14	97.0	-	1.7	98.6
		21	94.5	-	3.5	97.9
		30	95.3	-	3.3	98.5
	9	0	90.8	2.2	0.0	93.0
		2	94.2	2.1	1.3	96.6
		7	89.1	5.9	2.3	97.2
		14	93.0	3.9	0.7	97.5
		21	91.4	5.4	1.4	98.2
		30	89.1	6.7	1.6	97.4

(数値は2連の平均値)

表2 25℃、pH 5, 7, 9 緩衝液中におけるスピネトラム-L およびその分解物の分布
の
経時変化

添加放射能に対する割合 (%)						
温度	pH	経過 日数	スピネト ラム-L	N-demethyl -175-L	未同定 放射能	物質収支
25℃	5	0	93.0	-	2.4	95.3
		2	93.3	-	2.5	95.7
		7	88.0	-	4.7	92.7
		14	89.3	-	4.1	93.3
		21	90.5	-	3.5	93.9
		30	88.5	-	4.8	93.3
	7	0	92.7	-	4.0	96.6
		2	96.0	-	1.2	97.2
		7	91.5	-	4.7	96.2
		14	91.8	-	5.6	97.4
		21	93.3	-	3.8	97.1
		30	91.9	-	5.1	97.0
	9	0	92.1	3.2	0.0	95.3
		2	93.5	3.9	0.9	96.3
		7	88.4	8.3	0.8	97.4
		14	88.4	9.7	0.0	98.1
		21	83.5	11.8	3.3	98.5
		30	81.6	11.9	3.1	96.5

(数値は2連の平均値)

図1 スピネトラム-J およびスピネトラム-L の pH9 緩衝液中における予想加水分解経路