

IX. 動植物および土壌における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁
50	動物体内における代謝	フィッシャー系ラット 雄：7週齢 体重 166~212g (初回投与時) 雌：7週齢 体重 110~148g (初回投与時)	1群あたり3または5匹の雌雄群に ¹⁴ C-スピノシンAを2用量水準で単回経口投与した。また別の雌雄群に非標識体を反復投与後 ¹⁴ C-標識スピノシンAを単回投与した。投与後の尿糞中排泄率、胆汁中排泄率および吸収率、血漿中濃度および組織内分布率の測定ならびに代謝物の分析を行った。	①吸収および排泄：胆汁排泄試験の結果から吸収率は用量、性に関りなく約70~80%であった。主排泄経路は糞であり、投与量の82~87%が糞中に排泄された(胆汁排泄試験の結果からこのうち約20%は未吸収と推定される)。尿中への排泄は投与量の7~10%であった。総排泄率は90%以上であった。 ②組織内分布と蓄積性：血漿中 ¹⁴ C濃度の最高濃度到達時間は、低用量投与群の雌雄で1時間、高用量投与群の雄で6時間、雌で2時間であった。大部分の組織は血漿の最高濃度到達時間に最高濃度を示したが、一部の組織では1/2C _{max} 時に最高濃度を示した。168時間にはすべての組織で1/2C _{max} 時の1/10以下に減少し、速やかに消失する傾向を示した。 ③代謝経路： ④性差、用量および投与回数の影響：スピノシンAの吸収、分布、代謝および排泄に性、用量および投与回数による明らかな差はなかった。	(1995年)	IX 11
51	動物体内における代謝	フィッシャー系雌ラット 体重 124~143g	1群あたり3匹の雌ラットに ¹⁴ C-スピノシンAを5mg/kgの割合で1日1回3日または7日間反復経口投与した。投与後の尿糞排泄率、組織内分布率を測定した。	主排泄経路は単回投与と同様に糞であり、最終投与後7日目までに約80%が排泄された。尿には約5%が排泄された。排泄経路および排泄率は単回投与と同様の傾向を示し投与回数の影響は認められなかった。放射能の回収率は総投与量(3または7回)の約90%であった。組織内濃度は大部分の臓器で投与回数が増加すると増加したが、いずれも速やかに消失する傾向を示した。これら臓器のなかでは甲状腺、腎臓および脾臓からの消失が最も緩慢であった。	(1996年)	IX 32
52	動物体内における代謝	フィッシャー系ラット 雄：体重 190~205g 雌：体重 117~124g	1群あたり5匹の雌雄に ¹⁴ C-スピノシンDを1用量(高用量)水準で単回経口投与した。投与後の尿糞排泄率、組織内分布率の測定および代謝物の分析を行った。	①排泄および体内残存率：主排泄経路は糞であり、投与量の84%(雄)および92%(雌)が糞中に排泄された。尿中には投与量の5%(雄)および3%(雌)が排泄された。168時間後の組織およびカーカスには雌雄とも投与量の<1%が残存した。 ②代謝経路： ③性差：スピノシンDの吸収、排泄経路、排泄率および代謝には性差がないことが示された。	(1995年)	IX 39
53	動物体内における代謝	フィッシャー系雄生ラット 体重 160~180g	1群あたり3匹の胆管カニューレ処置した雄ラットに ¹⁴ C-スピノシンDを1用量(高用量)水準で単回経口投与した。投与後の尿、糞、胆汁中排泄率、体内残存率および代謝物の分析を行った。	①吸収、排泄および体内残存率：投与後24時間までに投与量の86%が胆汁中に、34%が糞中に、3%が尿中に排泄された。体内残存率は21.4%(24時間)であった。この結果から吸収率は66%と推定された。 ②代謝物：	(1995年)	IX 46

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関(報告年)	記載頁
54		キャベツ (品種: Wakamine) 茎葉処理	¹⁴ C-スピノシンAおよび ¹⁴ C-スピノシンDを用いた。 ①作物調製場所: 米国 Mississippi州 Wayside研究農場 ②施用: 1区画16個のキャベツにスピノシンAについては予定慣行施用量 (500g ai/ha) の3.1倍, スピノシンDについては12.3倍に相当する量をハンディースプレイヤーで1回散布した。	下記の試料を採取, 分析した。 葉中総残留放射能 (TRR) は処理当日の74~89ppm から34日後には0.8~0.9ppmに低下した。結球部のTRRは0.04ppm を越えなかった。時間の経過に伴ない, 水層および抽出性放射能の割合が増加した。	(1995年)	IX-50
55	植物体内における代謝	キャベツ (品種: 初秋) 土壌処理	を用いた。 ①施用: を土壌濃度0.5ppm (慣行施用量の500g ai/haに相当) になるように添加した。この土壌をプラスチック製ポットの上部に充填し, ここへキャベツ苗を移植した ②栽培条件: 屋外の温室で栽培した。気温は東京地方の平均気温に準じた。各ポットに50g の化成肥料を施肥した。灌水は上水道を自動散水した。	①土壌: 69日後の放射能濃度は0.42ppm であった。この時点で抽出可能な放射能は53%, 抽出残渣中の放射能は31%であった。 ②植物: 地上部から中間採取時 (移植13日後) に施用量の0.008%に相当する放射能が検出された。最終収穫時 (移植69日後) には有意な放射能は検出されなかった。	(1996年)	IX-61
56		カブ 茎葉処理	およびを用いた。 ①作物調製場所: 米国 California州 Plant Science 社 ②施用: 0.76×0.91×0.06m の区画にスピノシンAについては予定慣行施用量 (500g ai/ha) の1.6倍, スピノシンDについては3.4倍に相当する量をハンディースプレイヤーで1回散布した。 ③採取試料: 施用後0, 3, 10, 19, 34日に葉部および根部を採取した。 ④分析: 各試料をアセトニトリル/水 (80/20) で抽出後, ジクロロメタンおよび酢酸エチルで液-液分配した。水相は酵素処理, 酸処理後, 同様に液-液分配した。抽出後, 各画分の放射能を測定した。有機層画分中の代謝物をTLCで分析した。抽出残渣はアセトニトリル/水, 塩酸で懸濁抽出したのち, 繊維を強酸で加水分解, 誘導体化などして特性を検討した。	0~48日の総残留放射能 (TRR) はスピノシンA施用の葉で0.3~39ppm, 根で0.18~3.5ppm, スピノシンD施用の葉で0.3~20ppm, 根で0.09~1.7ppmであった。TRRは48日間で葉で1/70~1/100に, 根で1/20に減少した。48日後の試料を除き, いずれも大部分 (TRRの50~90%) が有機層に分配され, 水層の放射能は少量であった。48日後の試料では, 抽出残渣の割合が増加した。	(1995年)	IX-68

資料 No	試験の 種類	供 試 動植物等	試 験 項 目 ・ 試 験 方 法 等	試 験 結 果 の 概 要	試 験 機 関 (報 告 年)	記 載 頁
57		リンゴ (品種: レッド デリシャス 果実の分析	^{14}C -スピノシンAおよび ^{14}C -スピノシンDを用いた。 ①作物調製場所: 米国 California州 Plant Science 社 ②施用: リンゴの木1本にスピノシンAについては予定慣行施用量 (500g ai/ha) の1.5倍, スピノシンDについては2.3倍に相当する量をハンディースプレーヤーで1回散布した。 ③試験群: 処理群 (NOR群) のほかに移行性検討群 (TRANS群: 非散布の枝) および光分解対照群 (PHOTO群: 遮光処理) を設置した。 ④採取試料: NORは処理0, 3, 7, 14, 28, 42日後に, PHOTOは3, 7日後に, TRANSは0, 42日後に果実を採取した。採取した果実を有機溶媒で数回洗浄後果皮と果肉に分離し分析試料とした。	NORの総残留放射能 (TRR) はスピノシンA施用群で1.3~3.2ppm, スピノシンD施用群で0.5~1.2ppmであった。42日後の試料では0日の試料の半分の濃度に減少した。残留の主要部分は果実の洗液であった (TRRの60~90%)。果皮にはTRRの3~30%, 果肉には1~10%の放射能が残留した。3日後の試料中のスピノシンAはTRRの35%, スピノシンDは11%で速やかに代謝されることが半明した。残留物の主要部分が複数の極性物質であることが抽出残渣や水層の酸処理, アルカリ処理, グルコサノン分析の結果から示された。スピノサドの分解は光分解が大きな影響を与えることが, PHOTOの分析から示された。処理部から少量の放射能の移行が観察された。	(1995年)	IX 80
58	植物 体内に おける 代謝	リンゴ (品種: レッド デリシャス 葉の分析	および を用いた。 ①作物調製場所: 米国 California州 Plant Science 社 ②施用: リンゴの木1本にスピノシンAについては予定慣行施用量 (500g ai/ha) の1.5倍, スピノシンDについては2.3倍に相当する量をハンディースプレーヤーで1回散布した。 ③試験群: 処理群 (NOR群) のほかに移行性検討群 (TRANS群: 非散布の枝) および光分解対照群 (PHOTO群: 遮光処理) を設置した。 ④採取試料: NORとTRANSは施用0, 3, 7, 10, 28日後にPHOTOは3, 7日に葉を採取した。採取した葉を有機溶媒で数回洗浄して分析試料とした。	NORの総残留放射能 (TRR) はスピノシンA施用群で128~217ppm, スピノシンD施用群で43~89ppmであった。28日後の試料では0日の試料の半分の濃度に減少した。	(1995年)	IX 100

資料 No.	試験 の 種類	供試 動植物等	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記 載 頁
64	植 物 体 内 運 命	水 稻 (品 種 : Japonica M202.)	お よ び を 用 いた。 ① 施 用 : 苗 を 移 植 す る 前 の 植 穴 部 (各 ポットにつき5穴) に 処 理 し た。スビ ノ シ ン A に つ い て は 予 定 慣 行 施 用 量 (75 g a. i./ha) の 3.1 倍、スビノシ ン に つ い て は 17.8 倍 に 相 当 す る 量 を ア セ ト ン 溶 液 で 添 加 し た。 ② 採 取 試 料 : 施 用 1, 2 日 後 は 水 試 料、 7, 15, 28 日 に は 水 試 料 お よ び、穂 ば ら み 期 に は 水 試 料 及 茎 葉 部、収 穫 期 に は 穀 粒 及 び 稲 わ ら を 試 料 と し て 採 取 し た。	スビノシン A 及びスビノシン D は土壌から根を經由 して容易に吸収され、植物の地上部へ移行した。最 高残留濃度は移植後 1 週間以内に認められた。植物 全体の残留濃度はその後減少したが、スビノシン A, D とも処理後 1 ヶ月間を通して取り込まれ続けた。 1 ヶ月以降は、スビノシン A, D とも取り込まれる量 は極端に減少した。茎葉期試料が採取された時点ま でに、植物全体の残留濃度は成長による希釈効果に よって 1.0 μg/g 未満に低下した。 残留物の穂先への移行は極めて少なかった。穂先へ 移動した残留物の大部分は、籾殻に集中し、玄米(脱 穀した穀粒)中の残留は検出限界の約 0.004 μg/g 以 下であった。	(2001 年) GLP	IX- 115
65	好 気 的 湛 水 土 壌 中 運 命	2 種 水 田 土 壌 (福 岡 鉾 質 埴 土 及 び 茨 城 火 山 灰 埴 土)	湛水条件: 土壌深が 1cm になるように土 壌 15.76 g[鉾質土壌]または 16.71 g[火 山灰土壌](乾土換算)を バイオメーターフラス コに入れ、水深 1cm になるように水を加え た。暗所 25℃で 11 日間プレインキュベーション した。 薬剤の施用: プレインキュベーション後の土壌 に 乾 土 あ た り 10.6ppm[スビノシン A] または 11.2ppm[スビノシン D] になるように [¹⁴ C]-ス ビノシン A または [¹⁴ C]-スビノシン D を 試 験 土 壌の水面に添加した。 インキュベーション: 薬剤施用後の土壌は、暗 所 25℃で最長 100 日間インキュベートした。 インキュベート期間中、 ¹⁴ CO ₂ を 捕 集 し た。 試料採取時点: 添加直後、3, 7, 21, 35, 49, 71, 84, 100 日	スビノシン A: 添加放射能の平均総回収率は、約 94% であ っ た。添 加 100 日 後 ま で に 生 成 し た ¹⁴ CO ₂ は 20%(福岡土壌) 及び 8%(茨城土壌)であった。 有機溶媒抽出性の放射能は時間の経過にともなって減 少した。添加0日目で 89%(福岡) 及び 77%(茨城) 抽 出されたものが、100 日後ではそれぞれ 28% 及び 40% に減少した。 非抽出性残留放射能は時間の経過にともなって増加し 0 日目の処理量に対する 1.5%(福岡) 及び 10%(茨城) から試験終了時の 39% 及び 52 % に増加した。 表面水中の ¹⁴ C 成分は、福岡土壌では 0 日目の処理 量に対する 15 % から 3 日目には 1.5% に減少したが、 代謝の進行に伴い 100 日目では 9% に増加した。一方 茨城土壌では、3 日目以降は少量であった(0.4~ 2.3%)。 スビノシン A の半減期は 28 日(福岡及び茨城)、スビノ シン B は半減期 20 日(福岡) 及び 7.5 日(茨城) で 分 解 した。 スビノシン D: 添加放射能の平均総回収率は、約 95% であ っ た。添 加 100 日 後 ま で に 生 成 し た ¹⁴ CO ₂ は 15% (福岡土壌) 及び 3%(茨城土壌)であった。 有機溶媒抽出性の放射能は時間の経過にともなって減 少した。添加0日目で 91%(福岡) 及び 82%(茨城) 抽出されたものが、100 日後ではそれぞれ 36% 及び 42% に減少した。		IX- 129

資料 No	試験 の 種類	供試 動植物等	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記 載 頁
65 (続)				<p>非抽出性残留放射能は時間の経過にともなって増加し0日目の処理量に対する1.2% (福岡) 及び9% (茨城) から試験終了時の33%及び45%に増加した。 表面水中の¹⁴C成分は、福岡土壌では0日目の処理量に対する10%から3日目には2.7%に減少したが、代謝の進行に伴い100日目では11%に増加した。一方茨城土壌では、3日目以降は少量であった(0.4~3.8%)。</p>		
59	土壌中 分解試 験	2種畑土壌 (Commerce シルト質 壤土 および Hanford 砂壤土)	<p>畑地条件: 土壌100g[スピノシンA]または50g[スピノシンD] (乾土換算) を500mL容三角フラスコに入れ、土壌水分を0.33barにおける含水量の75%になるように蒸留水を加え、暗所25℃でスピノシンAについては1~4日間、スピノシンDについては12日間ブレインキュベーションした。 滅菌畑地条件: 畑地条件と同様に調製した土壌試料をオートクレーブ(121℃, 15分間)で滅菌した。 薬剤の施用: ブレインキュベーション後の土壌に乾土あたり0.4ppm[スピノシンA]または0.2ppm[スピノシンD]になるように¹⁴C-スピノシンAまたは¹⁴C-スピノシンDを試験土壌に添加した。 インキュベーション: 薬剤施用後の土壌は、暗所25℃で最長1年間インキュベートした。インキュベート期間中、揮発性¹⁴C化合物および¹⁴CO₂を捕集した。 試料採取時点: 土壌試料 スピノシンA添加土壌 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56, 91, 140, 182, 273, 364日 スピノシンD添加土壌 0, 1, 7, 10, 14, 28, 56, 91, 182日 スピノシンA添加滅菌土壌 0, 5, 28, 93, 183, 240, 365日 スピノシンD添加滅菌土壌 0, 28日, 3, 6ヶ月</p>	<p>スピノシンA: スピノシンAの半減期は17日 (Commerce土壌) および9日 (Hanford土壌) と算出された。添加1年後の残留量は0.9~1.5%であった。 土壌に添加した放射能の物質収支は一部の例外を除き1年後まで90%以上であった。添加1年後までに生成した¹⁴CO₂は20% (Commerce土壌) および15% (Hanford土壌) であった。 有機溶媒抽出性の放射能は時間の経過にともなって減少した。添加0日目で88~95%抽出されたものが、6ヵ月後では38~41%、1年後では16~27%に減少した。 非抽出性残留放射能は時間の経過にともなって増加した。1年後には43~51%に達した。主な代謝物としてスピノシンBを質量分析(MS)により同定した。スピノシンBは添加14~28日後に56~61%に達したが、1年後には3~6%に減少した。その他に5種類の少量代謝物(代謝物2~6)を液体クロマトグラフィ質量分析法(LC-MS)で確認した。代謝物2はCommerce土壌で6ヵ月後に最高値の8%を示したがその後減少し、1年後では3%であった。その他の代謝物はいずれも添加量の5%を越えなかった。 スピノシンD: スピノシンDの半減期は15日 (Commerce土壌) と算出された。添加3ヵ月以降は検出されなかった。土壌に添加した放射能の物質収支は6ヵ月後まで90%以上であった。添加1年後までに生成した¹⁴CO₂は3% (Commerce土壌) であった。 有機溶媒抽出性の放射能は時間の経過にともなって減少した。添加0日目で96%抽出されたものが、3ヵ月後では65%、6ヵ月後では49%に減少した。 非抽出性残留放射能は時間の経過にともなって増加した。6ヵ月後には42%に達した。 滅菌土壌: スピノシンAの半減期は128日 (Commerce土壌) および240日 (Hanford土壌) と算出された。スピノシンDの半減期は177日 (Commerce土壌) であった。</p>	(1994年)	IX- 141

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁																													
60	土壌吸着性試験	土壌	「OECDのガイドライン106 吸着/脱着」に基づき、本試験を実施した。 スピノシンDでは、1以外の3土壌については土壌吸着性が強く、残存する水層の濃度は最高濃度区において検出限界値の3~4倍程度で、以降の高次試験の実施が不可能であった。	4種の土性の異なる土壌を用いて、「OECDのガイドライン106 吸着/脱着」に従って、温度25℃で試験を実施したところ、以下の様な結果になった。 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">土壌の種類</th> <th colspan="2">スピノシンA</th> <th colspan="2">スピノシンD</th> </tr> <tr> <th>K</th> <th>Koc</th> <th>K</th> <th>Koc</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>12.6</td> <td>570</td> <td>29.1</td> <td>1320</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>50.3</td> <td>1200</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>47.0</td> <td>4230</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>25.2</td> <td>1890</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> </tbody> </table> Koc=436 (スピノシンA)	土壌の種類	スピノシンA		スピノシンD		K	Koc	K	Koc	1	12.6	570	29.1	1320	2	50.3	1200	—	—	3	47.0	4230	—	—	4	25.2	1890	—	—	(1996年)	IX-157
土壌の種類	スピノシンA		スピノシンD																																
	K	Koc	K	Koc																															
1	12.6	570	29.1	1320																															
2	50.3	1200	—	—																															
3	47.0	4230	—	—																															
4	25.2	1890	—	—																															
61	水中光分解試験	光 (緩衝液)	pH7の緩衝液に ¹⁴ C-スピノシンAまたは ¹⁴ C-スピノシンDを溶解し、各々について2μg/mlの水溶液(アセトニトリル濃度0.5%)を調製した。25℃で米国Indiana州の自然光下に2日間曝露した。HPLCにより分解率および光分解物を測定した。	緩衝液(pH7)で自然太陽光に曝露した場合、擬一次反応速度に基づいて算出したスピノサドの半減期はスピノシンAおよびスピノシンDで以下の様になる。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>試料</th> <th>照射</th> <th>暗所</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>スピノシンA</td> <td>0.93日</td> <td>30.3日</td> </tr> <tr> <td>スピノシンD</td> <td>0.82日</td> <td>59.1日</td> </tr> </tbody> </table>	試料	照射	暗所	スピノシンA	0.93日	30.3日	スピノシンD	0.82日	59.1日	(1994年)	IX-161																				
試料	照射	暗所																																	
スピノシンA	0.93日	30.3日																																	
スピノシンD	0.82日	59.1日																																	
62	水中光分解試験	光 (自然水)	米国Indiana州の農業用貯水池から採取した自然水(pH8)にスピノシンAまたはスピノシンDを溶解し、それぞれ2.0μg/mlまたは0.2μg/mlの水溶液(アセトニトリル濃度0.5%)を調製した。25℃で米国Indiana州の自然光下に2日間曝露した。HPLCにより分解率を測定した。	自然水(pH8)で自然太陽光に曝露した場合、擬一次反応速度に基づいて算出したスピノサドの半減期はスピノシンAおよびスピノシンDで以下の様になる。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>試料</th> <th>照射</th> <th>暗所</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>スピノシンA</td> <td>0.18日</td> <td>安定</td> </tr> <tr> <td>スピノシンD</td> <td>0.18日</td> <td>安定</td> </tr> </tbody> </table>	試料	照射	暗所	スピノシンA	0.18日	安定	スピノシンD	0.18日	安定	(1996年)	IX-167																				
試料	照射	暗所																																	
スピノシンA	0.18日	安定																																	
スピノシンD	0.18日	安定																																	
63	水中加水分解試験	水	¹⁴ C-スピノシンAおよび ¹⁴ C-スピノシンDを用いて実施した。pH5, 7, 9の緩衝液に ¹⁴ C-スピノシンAまたはDを2μg/mlの割合で添加し、25℃で最長30日間インキュベートした。HPLCで濃度を測定し、半減期を算出した。主要分解物をLC-MSで同定した。	pH5および7では、スピノシンAおよびDの加水分解はほとんど認められなかった。pH9では両成分とも徐々に加水分解された。スピノシンAから2種、スピノシンDから1種の加水分解物を同定した。その他に単独で処理量の10%を越える分解物は検出されなかった。	(1994年)	IX-171																													
64	生物濃縮	ニジマス	¹⁴ CスピノシンAの19.0及び5.0 ng/mLを28及び14日間曝露させた後、17及び14日間の排泄期間を設けた。	生物濃縮係数: 19.0及び5.0ng/mLでそれぞれ114及び84	(1994年)	IX-176																													
65	生物濃縮	ニジマス	¹⁴ CスピノシンDの33及び8.2 ng/mLを28及び21日間曝露させた後、それぞれ18及び17日間の排泄期間を設けた。	生物濃縮係数: 33及び8.2 ng/mLでそれぞれ115及び100	(1996年)	IX-180																													

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

<代謝物一覧表>

記号	由来	名称 (略称)	構造式					
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
A	親化合物	スピノシンA	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
D	親化合物	スピノシンD	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

<代謝物一覧表> (続き)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。
<代謝物一覧表> (続き)

—
—

動物代謝 (1)

スピノシンAのラットにおける代謝及び組織内分布

資料No. 50

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

2用量水準で単回経口投与後及び低用量反復投与後のスピノシンAの雌雄ラットにおける吸収、分布、排泄及び代謝を検討することを目的として実施した。

供試標識化合物

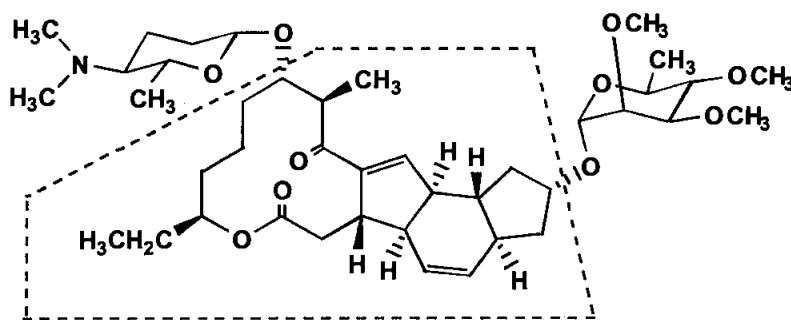
化学名

[^{14}C] スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンノピラノシルオキシ)-13-(4-ジメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテオキシ- β -D-エリスピラノシルオキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテカヒトロ-14-メチル-1H-as-インダゼノ[3, 2-d]オキサシクロペンテン-7, 15-ジオン

Lot 番号	H38-5NN-45-1	B463-25	NEN 3108-155A
比放射能			
放射化学的純度			
標識位置	点線内の炭素原子を均一に ^{14}C で標識した。		
標識位置設定理由	分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。		
標識体合成法			

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ダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

供試動物

7週齢のFischer 344系雌雄ラットを使用した。

投与時体重：雄 166～212g, 雌 110～148g

試験群

雌雄ラットからなる下記の17試験群を設定した。

主試験目的	用量 (mg/kg)	投与回数	屠殺時点 (投与後時間, h)	動物数	
				雄	雌
排泄と 体内残存率	100	単回	168	5	5
	10	単回	168	5	5
	10	反復	168	5	5
血漿中濃度 推移	100	単回	72	3	3
	10	単回	72	3	3
体内分布推移	100	単回	C_{max} 時 : 6♂, 2♀	3	3
			$1/2C_{max}$ 時 : 12♂, 24♀	3	3
	10	単回	C_{max} 時 : 1♂, 1♀	3	3
			$1/2C_{max}$ 時 : 6♂, 12♀	3	3
	10	反復	C_{max} 時 : 1♂, 1♀	3	3
			$1/2C_{max}$ 時 : 6♂, 12♀	3	3
胆汁排泄	100	単回	24	3	3
	10	単回	24	3	3
組織中 代謝物	100	単回	C_{max} 時 : 6♂, 2♀	3	3
			$1/2C_{max}$ 時 : 12♂, 24♀	3	3
	10	単回	C_{max} 時 : 1♂, 1♀	3	3
			$1/2C_{max}$ 時 : 6♂, 12♀	3	3

方 法

①動物飼育及び処置：ラットは使用前約1週間以上実験室環境に馴化させた。

水道水及び市販のげっ歯類用飼料を自由摂取させた。検体投与前にガラス製の代謝ケージに個別収容して、約3日間馴化させた。血漿中 ^{14}C 濃度推移を検討した動物には頸静脈にカニューレを埋め込み、投与前1日間回復させた。胆汁排泄試験群の動物には胆管カニューレ処置をし、約3日間の回復期間を置いた。処置の状態が最も良好なラット3匹を試験に選択した。

②投与液の調製及び投与： $[^{14}C]$ スピノシンAを0.5% METHOCELセルロースエーテル水溶液に懸濁させて、10mg/kg ()及び100mg/kg ()の投与液を調製した。投与液量は5ml/kgとした。低用量群及び高用量群の動物に1回強制経口投与した。反復投与群には、非標識の低用量投与液を14日間反復強制投与し、15日目に標識低用量投与液を1回強制経口投与した。 $[^{14}C]$ スピノシンAの投与前約16時間絶食させ、投与後約4時間に給餌を再開した。ここで低用量は亜急性毒性試験の無毒性に相当し、高用量は同試験におけ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

る毒性発現量の約2倍に相当する。

③試料採取：

尿及び糞：最終屠殺群，胆汁排泄試験及び中間屠殺群から採取した。 [^{14}C] スピノシンA 投与後，ラットを代謝ケージに戻し，試験中に排泄した尿はドライアイス冷却トラップに集めて凍結し，投与後48時間までは12時間毎に，48時間以降は24時間毎に採取した。糞は投与後24時間毎にドライアイス冷却容器に採取した。

呼気中 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ ：1-メトキシ-2-プロパノール：モノエタノールアミン(7:3 v/v)に捕集し，捕集液を24時間毎に交換した。

血液：血漿中濃度推移群の動物から投与後 0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48及び72時間に頸静脈からカニューレを通してシリンジにより0.2ml を採取した。各血液試料0.1ml をヘパリン添加毛細管に移して遠心分離して血漿を得た。

胆汁：各動物から胆汁をドライアイス冷却容器に採取した。採取容器は投与後 2, 4, 6, 8, 12及び24時間に交換した。

組織：最終屠殺及び中間屠殺群について，屠殺時に動物を CO_2 で致死させ，心臓穿刺により放血させ，下記の組織を採取した。

副腎，血液，骨，脳，十二指腸，胃腸管及び内容物，生殖腺，心臓，腎臓，肝臓，肺，リンパ節，腎周囲の脂肪，骨格筋，皮膚，脾臓，胸腺，甲状腺及びカーカス

④放射能測定：尿及び呼気中 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 捕集液，胆汁は直接，糞，脳，カーカス，心臓，腎臓，肝臓，肺，骨格筋，脾臓，胃腸管及び内容物，精巣は水でホモジネートして一部を可溶化し，骨，血液，卵巣，脂肪，甲状腺，リンパ節，副腎，十二指腸，皮膚は直接可溶化して，液体シンチレーション計測 (LSC)により放射能を測定した。

⑤代謝物分析： [^{14}C] スピノシンAの代謝率及び代謝物の検討を行うために，プールした糞，尿，胆汁及び組織試料について，放射能検出器及びUV検出器付HPLCと放射能検出器及び電子スプレーマススペクトロメトリー検出器付HPLCを用いて分析を行った。

抽出法または前処理法

糞：試料1gに0.115%の酢酸アンモニウムを含む水/メタノール/アセトニトリル (5:47.5:47.5 v/v) の混合溶媒 (以下「抽出溶媒」と略す) を5ml 加えて30秒間手で振とうしたのち， $1800\times g$ で10分間遠心分離して抽出液を得た (計3回繰り返し抽出した)。0.2 μm のフィルターでろ過した後濃縮乾固した1ml の抽出溶媒に再溶解した。抽出率は96%であった。

尿：試料を $1800\times g$ で10分間遠心分離した後，0.45 μm のナイロンフィルターでろ過した。ろ過による回収率は98%であった。

胆汁：特に前処理を施さず，直接分析に供した。

組織：肺，肝臓，腎臓のホモジネート，血漿及び甲状腺に抽出溶媒を5ml 加えて30秒間手動

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

で振とうしたのち1800×gで10分間遠心分離して抽出液を得た(計3回繰り返し抽出した)。0.2μmのフィルターでろ過した後濃縮乾固した。0.5または1mlの抽出溶媒で再溶解した。抽出率は94~121%で平均は101%+6%であった。

同定法：各抽出液中の代謝物はLC/MS(高速液体クロマトグラフィー/質量分析計)に供し、標準品との比較により同定した。

結 果

結果の概要を表1~7及び図1に示す。

1. 単回投与後の運命

①排泄及び体内残留：10及び100mg/kgの $[^{14}\text{C}]$ スピノシンAの経口投与後に回収された放射能分布を表1に示す。投与後168時間の最終屠殺時の総平均回収率は90%以上であった。排泄の主要経路は用量、性に関わりなく糞中排泄であり、投与放射能の約82%~87%が糞中に排泄された。尿中排泄は少なく、投与放射能の7~10%であった。呼気中に $^{14}\text{C}\text{O}_2$ として約1%が排泄された。組織及びカーカスには雌雄とも投与放射能の<3%が残留した。ケージ洗浄液では投与放射能の<1%が検出された。

②尿中排泄の推移：放射能の尿中排泄の推移を表2に示す。雌雄とも投与24時間迄に放射能の大部分が排泄された。排泄率は雌雄で同様であった。尿中排泄の推移は二相性を示し $t_{1/2\alpha}$ は低用量、高用量、反復投与でそれぞれ7時間(雄)及び8時間(雌)、8時間(雄)及び15時間(雌)、5時間(雄)及び7時間であった。 $t_{1/2\beta}$ は49時間(雄)及び35時間(雌)、28時間(雄)及び39時間(雌)、38時間(雄)及び25時間(雌)であった。

③胆汁中排泄試験：投与後24時間に回収された放射エネルギーを表3に示す。放射能の胆汁中排泄は高用量及び低用量群で雌雄ラットではほぼ同様(投与量の約40%)であり、糞中排泄量は約20%であった。

呼気、尿及び胆汁中への排泄量と組織及びカーカス中の残留量に基づき24時間迄の吸収率は用量、性に係わりなく約70%と算定された。

④血漿中濃度推移：表4に血漿中 ^{14}C の濃度推移を示す。高用量及び低用量投与群とも放射能は速やかに吸収され、最高濃度到達時間は、低用量投与群の雌雄で1時間、高用量投与群の雄で6時間、雌で2時間であった。投与後36時間後の血漿中放射エネルギーは血漿中 C_{max} と比べて高用量群で1/3~1/7、低用量群で1/6~1/14に低下した。血漿中濃度時間下曲線面積は用量に概ね比例していた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

⑤体内分布の推移：投与後血漿中 ^{14}C 濃度の C_{max} 時点、 $1/2C_{\text{max}}$ 時点及び168 時間における組織及び残余カーカス中の放射能濃度を表5～7に示す。低用量単回投与群、高用量単回投与群及び低用量反復投与群の C_{max} 時点、 $1/2C_{\text{max}}$ 時点のすべての組織に放射能が検出された。大部分の組織で C_{max} 時に放射能最高濃度を示した。いくつかの組織で C_{max} 時より $1/2C_{\text{max}}$ 時のほうが放射能が増加した（特に高用量単回投与群の雌の腎周脂肪で顕著）。このことはスピノシンAがまだ分布相にあったことを示している。一般的に $1/2C_{\text{max}}$ 時と比べて最終屠殺時では、すべての群で放射能は $1/10$ 以下に減少した。高用量単回投与群の雌の腎周脂肪でも $1/14$ に減少した。このように、10及び $100\text{mg}/\text{kg}$ の $[^{14}\text{C}]$ スピノシンA投与のいずれにおいても、放射能は組織に速やかに分布し、投与後168 時間までに殆どの組織から消失する。

⑥代謝物プロファイル

糞中代謝物：投与後0～24時間に採取し、雌雄別にプールした糞試料を抽出後（抽出率：96%）放射能・UV検出器付HPLCを用いて分析したところ、11種のピークが検出された（表8）。すべての群の雌雄で投与量の約6%が未変化体として排泄された。LC/MSにより主要な代謝物として、

胆汁中代謝物：投与後6～8時間に採取し、雌雄別にプールした胆汁試料を分析した結果、2または3つのピークが得られ、スピノシンAと

尿中代謝物：投与後0～12時間に採取し、雌雄別にプールした尿試料を糞試料と同様に分析したところ、17種のピークが検出され主要な8種が同定された（表10）。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

組織中代謝物：各組織からの抽出率は平均で101 % (94~121 %) であった。肝臓で

2. 反復投与後の運命：

反復投与後の運命は単回投与後のそれと明らかな差はなかった。

まとめ

雌雄ラットに懸濁液として経口投与した [^{14}C] スピノシンAの吸収、排泄経路、排泄率及び代謝に性差がないことが示された。投与量の約70~80%が吸収され、約20%が吸収されずに糞中に排泄された。投与48時間以内に投与量の60%以上が糞中及び尿中に回収され、速やかに排泄されることが示された。投与後 168時間に組織及びカーカスに残存する放射エネルギーは非常に少なかった。糞中、尿中及び胆汁中で同定された主要代謝物は、未変化体

スピノシンAの吸収、分布、代謝及び排泄には性、用量及び投与回数による明らかな差はなかった。

推定代謝経路を図1に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 1 経口投与後に回収された放射能分布 (投与量%)

高用量：単回	雄			雌		
	C_{max} (6h)	$1/2C_{max}$ (12h)	168h	C_{max} (2h)	$1/2C_{max}$ (24h)	168h
尿	1.04	2.87	7.27	—	4.51	9.74
糞	—	14.95	85.28	—	40.04	81.64
CO ₂	0.23	0.16	1.00	0.08	0.10	1.32
組織	74.64	62.74	0.65	68.17	32.36	1.12
カーカス	21.80	15.70	0.63	22.19	14.56	1.50
ケージ洗浄液	0.57	0.83	0.25	0.40	1.40	0.12
合計	98.27	97.25	95.09	90.86	92.96	95.42
低用量：単回	雄			雌		
	C_{max} (1h)	$1/2C_{max}$ (6h)	168h	C_{max} (1h)	$1/2C_{max}$ (12h)	168h
尿	—	1.63	9.68	—	5.08	7.89
糞	—	—	83.56	—	32.72	81.74
CO ₂	0.17	0.73	1.39	0.19	0.25	1.34
組織	96.43	80.45	0.38	87.75	49.48	0.32
カーカス	6.22	14.32	0.23	6.88	10.35	0.25
ケージ洗浄液	0.44	1.35	0.70	0.47	0.47	0.31
合計	103.27	98.48	95.94	95.28	99.32	91.85
低用量：反復	雄			雌		
	C_{max} (1h)	$1/2C_{max}$ (6h)	168h	C_{max} (1h)	$1/2C_{max}$ (12h)	168h
尿	—	—	6.68	—	—	7.83
糞	—	—	86.90	—	—	82.29
CO ₂	—	—	1.37	—	—	1.39
組織	81.99	73.05	0.31	77.83	47.29	0.21
カーカス	10.53	15.70	NQ	14.61	9.40	NQ
ケージ洗浄液	—	—	0.34	—	—	0.19
合計	92.52	88.75	95.60	92.44	56.68	91.91

—：試料が得られなかった。

NQ=定量限界以下

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 2-1 経口投与後の尿糞中放射能排泄の推移 (投与量%)

投与後時間 (h)	単回投与								反復投与			
	高用量				低用量				低用量			
	雄		雌		雄		雌		雄		雌	
	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿
0 ~ 12	-	3.38	-	3.44	-	7.01	-	4.75	-	5.05	-	5.13
12 ~ 24	51.60	1.71	28.32	2.36	66.16	1.34	60.59	1.50	76.16	1.13	59.37	1.68
24 ~ 36	-	0.95	-	1.52	-	0.47	-	0.74	-	0.20	-	0.54
36 ~ 48	20.01	0.42	23.37	0.90	11.87	0.29	14.64	0.33	7.41	0.10	17.91	0.22
48 ~ 72	8.16	0.39	17.48	0.96	3.39	0.19	4.05	0.23	2.67	0.07	3.53	0.14
72 ~ 96	3.03	0.20	6.27	0.33	1.13	0.13	1.40	0.17	0.34	0.05	0.85	0.07
96 ~ 120	1.37	0.11	2.43	0.18	0.52	0.11	0.55	0.07	0.16	0.04	0.34	0.03
120 ~ 144	0.68	0.06	1.93	0.13	0.30	0.07	0.29	0.05	0.09	0.02	0.15	0.02
144 ~ 168	0.43	0.04	1.11	0.09	0.19	0.05	0.21	0.04	0.07	0.01	0.15	0.01
合計	85.28	7.27	81.64*	9.74	83.56	9.68	81.74	7.89	86.90	6.68	82.29	7.83

- : 試料を採取しなかった。

* : 96時間までは5匹の平均, 96時間以降および合計は4匹の平均のため各時間の排泄率を合算しても合計 (平均値) と一致しない。

表 2-2 経口投与後の尿糞中放射能排泄の累積値

投与後時間 (h)	単回投与								反復投与			
	高用量				低用量				低用量			
	雄		雌		雄		雌		雄		雌	
	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿
0 ~ 12	-	3.38	-	3.44	-	7.01	-	4.75	-	5.05	-	5.13
12 ~ 24	51.60	5.10	28.32	5.79	66.16	8.36	60.59	6.25	76.16	6.18	59.37	6.81
	(56.70)		(34.11)		(74.42)		(66.84)		(82.34)		(66.18)	
24 ~ 36	-	6.04	-	7.32	-	8.83	-	6.99	-	6.38	-	7.35
	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		(-)	
36 ~ 48	71.61	6.46	51.69	8.22	78.03	9.13	75.23	7.32	83.57	6.48	77.28	7.56
	(78.07)		(59.91)		(87.16)		(82.55)		(90.05)		(84.84)	
48 ~ 72	79.77	6.85	69.17	9.18	81.42	9.32	79.29	7.56	86.24	6.56	80.81	7.70
	(86.62)		(78.35)		(90.74)		(86.85)		(92.80)		(88.51)	
72 ~ 96	82.80	7.06	75.45	9.51	82.55	9.45	80.69	7.73	86.58	6.61	81.67	7.77
	(89.86)		(84.96)		(92.00)		(88.42)		(93.19)		(89.44)	
96 ~ 120	84.17	7.17	78.60	9.53	83.07	9.56	81.24	7.79	86.74	6.65	82.00	7.80
	(91.34)		(88.13)		(92.63)		(89.03)		(93.39)		(89.80)	
120 ~ 144	84.85	7.23	80.53	9.66	83.37	9.63	81.53	7.84	86.83	6.67	82.15	7.82
	(92.08)		(90.19)		(93.00)		(89.37)		(93.50)		(89.97)	
144 ~ 168	85.28	7.27	81.64	9.74	83.56	9.68	81.74	7.89	86.90	6.68	82.29	7.83
	(92.55)		(91.38)		(93.24)		(89.63)		(93.58)		(90.12)	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 3 胆汁排泄試験において回収された放射能分布 (投与量%)

試料	投与後 時間 (h)	高用量		低用量	
		雄	雌	雄	雌
胆汁	0 ~ 2	1.41	0.68	0.52	0.97
	2 ~ 4	3.13	4.19	7.56	4.25
	4 ~ 6	7.28	5.17	7.67	6.06
	6 ~ 8	4.92	4.87	8.13	5.91
	8 ~ 12	9.00	8.21	8.71	8.94
	12 ~ 24	15.33	17.53	11.47	12.20
胆汁 (計)		41.08	40.65	44.05	38.32
糞		21.40	22.61	23.17	19.66
尿		4.25	3.72	11.08	7.39
CO ₂		—	0.08	0.20	0.24
カーカス		25.23	27.62	15.68	23.63
最終ケージ洗浄液		—	0.81	1.90	3.04
合計		91.95	95.49	96.09	92.28
吸収率		70.56	72.07	71.01	69.58

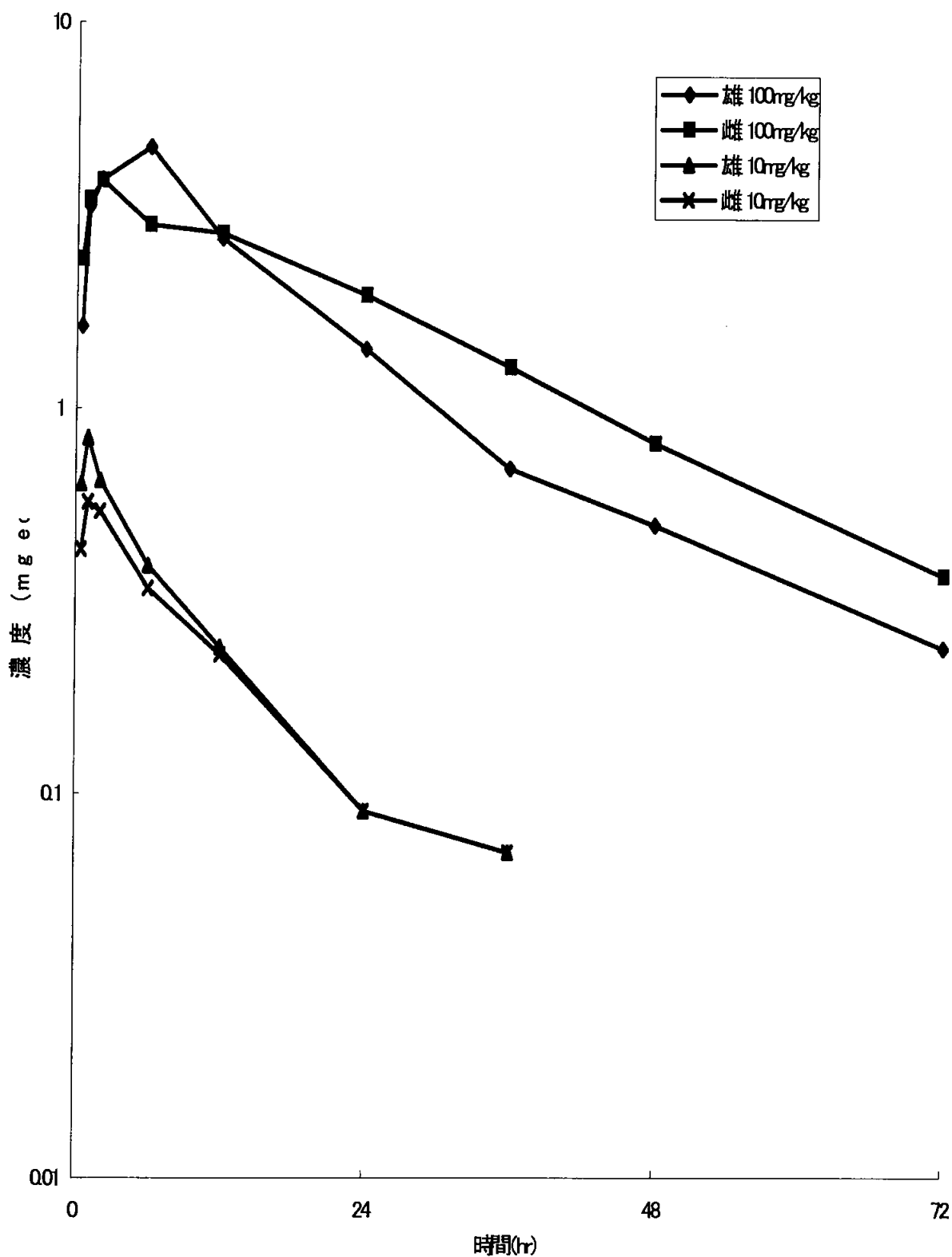
吸収率の計算：胆汁中排泄率，尿中排泄率，呼気中排泄率および組織，カーカスの合計とした。

表 4 単回経口投与後の放射能の血漿中濃度推移 ($\mu\text{g eq/g}$) および薬物動態パラメーター

投与後時間 (h)	高用量		低用量	
	雄	雌	雄	雌
0.5	1.63	2.43	0.64	0.43
1	3.33	3.49	0.84	0.57
2	3.92	3.89	0.65	0.54
6	4.73	2.98	0.39	0.37
12	2.76	2.84	0.24	0.23
24	1.42	1.96	0.09	0.09
36	0.70	1.28	0.07	0.07
48	0.50	0.82	NQ	NQ
72	0.24	0.37	NQ	NQ
血中濃度下面積 (AUC) ($\mu\text{g}\cdot\text{eq}\cdot\text{hr/g}$)	105	124	8.48	7.74
見かけの半減期 (hr) : α 相 ($t_{1/2\alpha}$)	5.53	3.48	0.52	0.59
見かけの半減期 (hr) : β 相 ($t_{1/2\beta}$)	22.6	21.8	9.67	9.60

NQ = 定量限界以下

図1 血漿中放射能の濃度推移



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 5 - 1 経口投与後の組織中放射能分布（投与量%）：高用量－単回

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	0.08	0.07	0.00	0.08	0.05	0.00
血液	0.12	0.09	0.00	0.10	0.05	0.00
骨	0.11	0.04	0.00	0.09	0.03	0.00
脳	0.02	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00
カーカス	21.80	15.70	0.63	22.19	14.56	1.50
十二指腸	0.13	0.07	0.00	0.22	0.05	0.00
胃腸管	53.41	43.82	0.19	52.54	21.85	0.49
生殖腺	0.16	0.16	0.00	0.07	0.06	0.00
心臓	0.10	0.09	0.00	0.14	0.05	0.00
腎臓	0.70	0.59	0.05	0.68	0.38	0.06
肝臓	4.17	2.47	0.07	7.35	1.93	0.08
肺	1.06	0.86	0.00	0.98	0.68	0.01
リンパ節	0.43	0.56	0.01	0.24	0.23	0.01
腎周囲脂肪	0.51	0.51	0.04	0.42	1.35	0.09
骨格筋	0.16	0.17	0.01	0.08	0.18	0.01
皮膚	13.10	12.95	0.27	4.74	5.27	0.34
脾臓	0.18	0.13	0.00	0.16	0.10	0.01
胸腺	0.19	0.14	0.00	0.11	0.10	0.00
甲状腺	0.01	0.01	0.00	0.12	0.00	0.00

表 5 - 2 経口投与後の組織中放射能濃度（ μg 当量/g組織）：高用量－単回

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	269	227	3.10	206	137	4.40
血液	4.47	3.20	0.104	4.46	1.69	0.148
骨	43.1	23.4	0.532	28.1	14.3	0.773
脳	3.02	1.75	0.130	3.53	1.05	0.122
カーカス	49.8	39.1	1.48	58.1	33.6	3.48
十二指腸	72.3	38.1	0.411	164	20.1	0.820
胃腸管	706	507	2.21	986	253	5.97
生殖腺	13.6	14.0	0.424	121	103	5.97
心臓	37.6	29.1	0.346	47.3	16.3	0.857
腎臓	100	82.9	7.10	116	54.8	9.51
肝臓	148	82.2	2.00	318	56.9	2.79
肺	257	227	1.13	241	152	2.37
リンパ節	370	431	7.19	216	228	7.78
腎周囲脂肪	265	372	13.2	181	422	41.0
骨格筋	31.6	28.4	0.723	14.9	26.0	1.91
皮膚	68.7	62.0	1.34	24.6	27.9	1.72
脾臓	98.0	77.0	1.05	88.4	46.0	2.89
胸腺	113	85.9	1.08	68.8	57.6	1.95
甲状腺	134	77.8	7.42	963	45.9	14.2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 6 - 1 経口投与後の組織中放射能分布 (投与量%) : 低用量-単回

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	0.03	0.04	0.00	0.08	0.03	0.00
血液	0.12	0.11	NQ	0.15	0.05	NQ
骨	0.03	0.06	0.00	0.05	0.06	0.00
脳	0.01	0.01	NQ	0.02	0.01	NQ
カーカス	6.22	14.32	0.23	6.88	10.35	0.25
十二指腸	0.86	0.09	0.00	0.61	0.09	0.00
胃腸管	79.26	65.95	0.10	66.58	39.83	0.12
生殖腺	0.03	0.09	NQ	0.06	0.05	0.00
心臓	0.15	0.11	NQ	0.20	0.06	NQ
腎臓	0.71	0.63	0.03	0.97	0.41	0.03
肝臓	9.40	3.03	0.10	11.30	1.52	0.04
肺	0.98	1.59	0.00	1.62	0.95	0.00
リンパ節	0.14	0.27	0.01	0.12	0.18	0.01
腎周囲脂肪	0.09	0.44	0.01	0.18	0.36	0.01
骨格筋	0.05	0.15	NQ	0.06	0.09	NQ
皮膚	4.33	7.56	0.13	5.38	5.54	0.11
脾臓	0.17	0.20	NQ	0.26	0.15	NQ
胸腺	0.05	0.12	0.00	0.10	0.11	0.00
甲状腺	0.01	0.01	NQ	0.01	0.00	NQ

NQ= 定量限界以下

表 6 - 2 経口投与後の組織中放射能濃度 (μg 当量/g組織) : 低用量-単回

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	12.9	13.1	0.184	17.1	7.25	0.165
血液	0.406	0.358	NQ ^a	0.441	0.201	NQ ^a
骨	1.70	2.34	NQ	1.92	1.58	NQ
脳	0.153	0.160	NQ	0.172	0.081	NQ
カーカス	1.31	2.95	0.051	1.44	2.17	0.054
十二指腸	52.8	4.51	NQ	29.1	2.70	NQ
胃腸管	131	71.9	0.115	87.2	40.6	0.120
生殖腺	0.197	0.616	NQ	6.06	6.93	0.121
心臓	3.88	3.02	NQ	4.91	1.51	NQ
腎臓	9.05	7.78	0.520	11.2	4.81	0.375
肝臓	29.4	9.49	0.270	38.1	4.42	0.125
肺	21.4	29.3	NQ	28.4	19.0	NQ
リンパ節	9.58	18.6	0.273	12.1	11.7	0.269
腎周囲脂肪	4.22	18.3	0.416	8.44	17.1	0.610
骨格筋	0.763	3.09	NQ	0.864	1.85	NQ
皮膚	1.77	3.23	0.067	2.25	2.55	0.055
脾臓	7.42	9.96	NQ	9.36	6.72	NQ
胸腺	3.44	8.01	0.122	4.72	5.88	0.074
甲状腺	12.3	5.98	NQ	8.29	3.62	NQ

NQ= 定量限界以下

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 7 - 1 経口投与後の組織中放射能分布 (投与量%) : 低用量-反復

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	0.06	0.04	0.00	0.12	0.04	0.00
血液	0.14	0.07	NQ	0.16	0.05	NQ
骨	0.05	0.05	NQ	0.07	0.04	NQ
脳	0.03	0.02	NQ	0.03	0.01	NQ
カーカス	10.53	15.70	NQ	14.61	9.40	0.00
十二指腸	0.23	0.05	NQ	0.32	0.05	NQ
胃腸管	62.90	59.40	NQ	55.10	38.78	NQ
生殖腺	0.05	0.11	NQ	0.07	0.06	0.00
心臓	0.18	0.09	NQ	0.27	0.05	NQ
腎臓	1.02	0.62	0.03	1.34	0.38	0.03
肝臓	11.55	2.62	0.07	11.82	1.48	0.05
肺	1.37	1.31	NQ	2.03	0.76	NQ
リンパ節	0.16	0.28	0.00	0.18	0.14	0.00
腎周囲脂肪	0.11	0.31	0.01	0.22	0.30	0.01
骨格筋	0.09	0.14	NQ	0.16	0.12	NQ
皮膚	3.72	3.72	0.20	5.44	3.44	0.13
脾臓	0.24	0.22	NQ	0.36	0.14	NQ
胸腺	0.10	0.13	0.00	0.15	0.12	NQ
甲状腺	0.01	0.01	NQ	0.01	0.00	NQ

NQ= 定量限界以下

表 7 - 2 経口投与後の組織中放射能濃度 (μg 当量/g組織) : 低用量-反復

	雄			雌		
	C _{max} (6h)	1/2C _{max} (12h)	168h	C _{max} (2h)	1/2C _{max} (24h)	168h
副腎	16.0	10.5	0.117	25.2	7.17	0.115
血液	0.615	0.376	NQ ^a	0.653	0.162	NQ ^a
骨	2.21	2.47	NQ	2.74	1.28	NQ
脳	0.314	0.203	NQ	0.324	0.107	NQ
カーカス	2.32	3.57	NQ	3.16	2.07	NQ
十二指腸	16.5	3.43	NQ	16.6	2.38	NQ
胃腸管	118	66.8	NQ	102	33.9	NQ
生殖腺	0.356	0.884	NQ	9.56	6.51	0.064
心臓	5.48	2.88	NQ	7.32	1.39	NQ
腎臓	12.7	7.40	0.330	18.2	4.62	0.326
肝臓	36.9	7.72	0.137	42.4	4.14	0.122
肺	29.3	27.0	NQ	40.6	13.9	NQ
リンパ節	15.5	23.5	0.149	23.0	6.29	0.228
腎周囲脂肪	8.50	26.0	0.210	14.0	27.1	0.302
骨格筋	1.46	2.97	NQ	1.85	1.49	NQ
皮膚	1.84	3.60	0.081	2.74	2.32	0.064
脾臓	10.7	10.4	NQ	14.1	6.13	NQ
胸腺	6.08	7.61	0.035	7.66	5.98	0.046
甲状腺	0.709 (4.299)	3.57	NQ	0.827 (8.103)	1.97	NQ

NQ= 定量限界以下

() = 再試験結果

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 8 経口投与後 0 ～ 24 時間の糞中代謝物プロファイル (投与量%)

表 9 経口投与後 6 ～ 8 時間の胆汁中代謝物プロファイル (投与量%)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表10 経口投与後0～12時間の尿中代謝物プロファイル（投与量%）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表11-1 経口投与後 C_{max} および $1/2C_{max}$ 時における腎臓中代謝物プロファイル (投与量%)

表11-2 経口投与後 C_{max} および $1/2C_{max}$ 時における腎臓中代謝物プロファイル (濃度: ppm)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表12-1 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における肝臓中代謝物プロファイル (投与量%)

表12-2 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における肝臓中代謝物プロファイル (濃度: ppm)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表13-1 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における肺中代謝物プロファイル (投与量%)

表13-2 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における肺中代謝物プロファイル (濃度: ppm)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表14-1 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における血漿中代謝物プロファイル (投与量%)

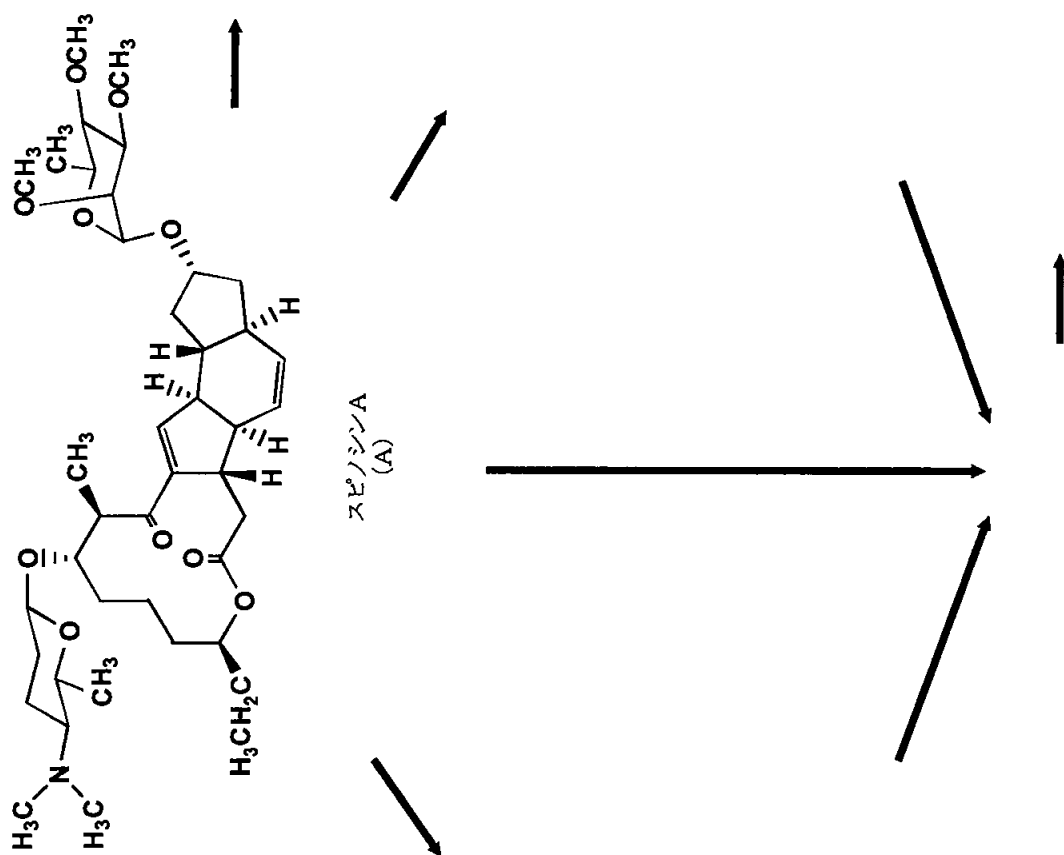
表14-2 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における血漿中代謝物プロファイル (濃度: ppm)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表15-1 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における甲状腺代謝物プロファイル (投与量%)

表15-2 経口投与後C_{max}および1/2C_{max} 時における甲状腺代謝物プロファイル (濃度: ppm)

図1 スピノシンAの推定代謝経路



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

動物代謝 (2)

スピノシンAの雌性ラットにおける生体内蓄積性の検討

資料No. 51

試験機関:

報告書作成年: 1996年

試験目的

[^{14}C]スピノシンAを低用量で1日1回7日間反復投与後のスピノシンAの雌性ラットにおける生体内蓄積性を検討することを目的として実施した。

供試標識化合物

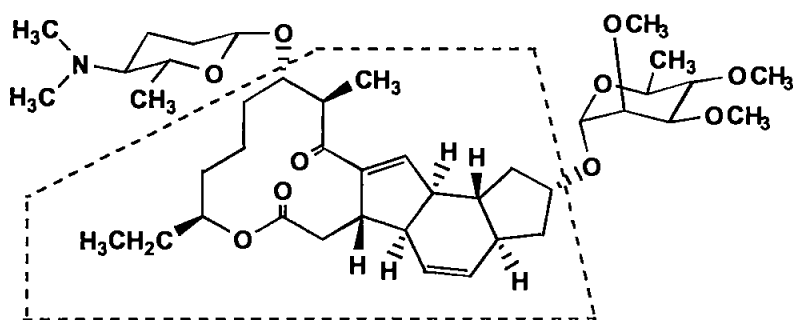
化学名

[^{14}C]スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピラシルオキシ)-13-(4-ジメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテオキシ- β -D-エリスロピラシルオキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテオカヒドロ-14-メチル-1H-as-インダセノ[3, 2-d]オキサシクロペンテン-7, 15-ジオン

Lot 番号	DowElanco (INV1108)
比放射能	
放射化学的純度	
標識位置	点線内の炭素原子を均一に ^{14}C で標識した。
標識位置設定理由	分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。
標識体合成法	

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ダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

供試動物

8週齢のFischer 344系雌性ラットを使用した。

投与時体重：124～143g

試験群

以下のTable Iに示すように、 ^{14}C -Spinosyn Aは、Methocel^R水性懸濁剤として、10mg/kg体重の割合で3あるいは7日間、雌性ラット6群（1群3匹）に投与した。

Table I. 投与回数および採取時間

投与群（3匹/群）	投与回数 ^a	測定時間（最終投与後の日数）
I	3	1
II	3	7
III	7	1
IV	7	7
V	7	14
VI	7	21

^a 1回経口投与/匹/日

方法

①動物飼育及び処置：ラットは使用前約1週間実験室環境に馴化させた。

水道水及び市販のげっ歯類用飼料を自由摂取させた。検体投与前にガラス製の代謝ケージに個別収容して、約3日間馴化させた。

②投与液の調製及び投与： ^{14}C スピノシンAを0.5% METHOCEL水溶液に懸濁させて、10mg/kg（ ）の投与液を調製した。投与液量は5ml/kgとした。標識低用量投与液を1日1回3日または7日間強制経口投与した。 ^{14}C スピノシンAの投与前には絶食させなかった。1回当たりの投与量は単回投与試験における低用量に相当する。

③試料採取：

尿及び糞：最終投与後、ラットを代謝ケージに戻し、試験中に排泄した尿はドライアイス冷却トラップに集めて凍結し、最終投与後7日目まで24時間毎に採取した。糞も同様に投与後24時間毎にドライアイス冷却容器に採取した。

組織：屠殺時に動物をCO₂で致死させ、心臓穿刺により放血させ、下記の組織を採取した。

副腎、血液、骨、脳、十二指腸、胃腸管及び内容物、生殖腺、子宮、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、腎周囲の脂肪、下垂体、骨格筋、皮膚、脾臓、胸腺、甲状腺及びカーカス

④放射能測定：尿は直接、胸腺および皮膚は水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し液体シンチレーション計測により放射能を測定した。糞、脳、カーカス、心臓、腎臓、肝臓、肺、骨格筋、脾臓、胃腸管及び内容物はホモジネートした後、骨、血液、卵巣、脂肪、甲状腺、子宮、リンパ節、副腎、十二指腸は直接燃焼して、液体シンチレーション計測 (LSC)により放射能を測定した。

結 果

結果の概要を表1～3及び図1に示す。

1. 放射能の排泄

1日1回3日または7日間 10mg/kgの [^{14}C] スピノシンAを経口投与後に回収された放射能の分布を表1に示す。

I～VI群の総回収放射能は86.8～92.8%であった。

排泄の主経路は単回投与試験と同様に糞中排泄であった。7日間までの排泄率は80～87%で単回投与試験と同程度であった。尿中排泄は、単回投与試験と同様に少なく5～6%であった。7日目以降の組織及びカーカスの残留放射能の割合も単回投与試験とほぼ同様に投与放射能の<0.4%であった。ケージ洗浄液には投与放射能の<1%が検出された。

2. 体内分布の推移

IおよびIII群（3あるいは7日間投与し、それぞれ最終投与後24時間に致死させた動物）では、消化管試料が最高放射能濃度（それぞれ24.6および20.3ppm）を示した。IおよびIII群のその他の組織における放射能濃度は有意に低かった。III群の腎周辺脂肪および腎臓の総放射能濃度はI群の約2倍を示した。消化管以外の組織では、I群で、リンパ節、腎周辺脂肪、肺、甲状腺、腎臓、副腎および肝臓の順に高い放射能濃度が認められた（それぞれ3.08ppm, 2.93ppm, 2.37ppm, 2.22ppm, 2.05ppm, 2.00ppm, 1.99ppm）。III群では、腎周辺脂肪（5.46ppm）、腎臓（4.90ppm）、リンパ節（4.11ppm）、肺（3.81ppm）、肝臓（2.81ppm）、および甲状腺（2.02ppm）の順に高い放射能濃度が認められた。IおよびIII群の消化管および屍体を除いて、各組織内分布率は平均投与放射能の0.23%以下であった。IおよびIII群の屍体中には平均でそれぞれ投与放射能の2.79%および1.33%が検出された。

II群（3日間投与後168時間に致死させた動物）では、腎臓が最も高い平均放射能濃度0.570ppmを示した。II群のその他の組織における放射能濃度は有意に低かった。II群の腎臓以外の組織では、甲状腺（0.422ppm）、腎周辺脂肪（0.353ppm）、骨（0.301ppm）、心臓（0.139ppm）、およびリンパ節（0.155ppm）、の順に高い濃度が認められた。II群の屍体を除いて、各組織内分布率は平均投与放射能の0.04%以下であった。

IV群（7日間投与後168時間に致死させた動物）では、下垂体が最も高い平均放射能濃度2.04ppmを示した。IV群のその他の組織における放射能濃度は有意に低かった。IV群の下垂体以外の組織では、甲状腺（1.12ppm）、腎臓（1.08ppm）、腎周辺脂肪（0.589ppm）、肝臓（0.518ppm）、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

脾臓 (0.277ppm) , リンパ節 (0.240ppm) , および副腎 (0.238ppm) , の順に高い濃度が認められた。IV群の屍体を除いて, 各組織内分布率は平均投与放射能の0.04%以下であった。

V群 (7日間投与後 336時間に致死させた動物) では, 甲状腺が最も高い平均放射能濃度 0.850ppmを示した。V群のその他の組織における放射能濃度は有意に低かった。V群の甲状腺以外の組織では, 腎臓 (0.350ppm) , 脾臓 (0.256ppm) , 肝臓 (0.205ppm) , 腎周辺脂肪 (0.163ppm) , 副腎 (0.161ppm) , およびリンパ節 (0.152ppm) , の順に高い濃度が認められた。V群の屍体を除いて, 各組織内分布率は平均投与放射能の0.01%以下であった。

VI群 (7日間投与後 504時間に致死させた動物) では, 甲状腺が最も高い平均放射能濃度 0.433ppmを示した。VI群のその他の組織における放射能濃度は有意に低かった。VI群の甲状腺以外の組織では, 腎臓 (0.149ppm) , 副腎 (0.115ppm) , 肝臓 (0.114ppm) , 脾臓 (0.109ppm) , 腎周辺脂肪 (0.101ppm) , およびリンパ節 (0.097ppm) , の順に高い濃度が認められた。VI群の屍体を除いて, 各組織内分布率は平均投与放射能の0.01%以下であった。

まとめ

雌ラットに懸濁液として [^{14}C] スピノシンAを3日または7日間反復経口投与した場合, 排泄経路および排泄率は単回投与と同様の傾向を示し投与回数の影響は認められなかった。組織内濃度は大部分の臓器で投与回数が増加すると増加したが, いずれも速やかに消失する傾向を示した。これら臓器のなかでは甲状腺, 腎臓および脾臓からの消失が最も緩慢であると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表1 経口投与後に回収された放射能分布 (投与量%)

	3日間投与		7日間投与			
	1日後 (I群)	7日後 (II群)	1日後 (III群)	7日後 (IV群)	14日後* (V群)	21日後* (VI群)
尿	4.77	5.85	4.90	4.95	4.88	5.62
糞	73.5	80.1	79.9	83.3	83.3	83.9
組織及びカーカス	13.0	0.33	4.67	0.25	0.17	0.06
ケージ洗浄液	0.28	0.54	0.45	0.42	0.48	0.49
合計	91.5	86.8	89.9	92.8	88.9	90.1

* : 最終投与7日後以降は尿糞の測定を行っていない。

表2 経口投与後の尿糞中放射能排泄の推移 (投与量%)

投与回数/投与後時間(h)	3日間投与				7日間投与							
	1日後 (I群)		7日後 (II群)		1日後 (III群)		7日後 (IV群)		14日後* (V群)		21日後* (VI群)	
	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿
1/ 0~ 24	19.0	1.51	18.8	1.66	7.16	0.68	9.87	0.66	8.35	0.66	8.01	0.50
2/ 0~ 24	26.9	1.69	22.4	1.85	11.1	0.64	11.1	0.66	10.7	0.65	10.3	0.82
3/ 0~ 24	27.6	1.57	23.5	1.85	12.2	0.66	11.2	0.49	11.1	0.66	11.7	0.82
4/ 0~ 24	—	—	—	—	12.4	0.69	12.3	0.65	11.3	0.66	11.4	0.85
5/ 0~ 24	—	—	—	—	12.2	0.84	11.9	0.72	12.0	0.69	12.2	1.02
6/ 0~ 24	—	—	—	—	12.0	0.72	11.4	0.77	12.7	0.68	11.9	0.62
7/ 0~ 24	—	—	—	—	12.7	0.67	12.9	0.74	11.4	0.67	13.0	0.71
最終投与/24~ 48	—	—	11.8	0.31	—	—	4.88	0.12	4.36	0.12	3.87	0.15
48~ 72	—	—	2.56	0.08	—	—	1.09	0.04	0.79	0.03	0.76	0.05
72~ 96	—	—	0.58	0.04	—	—	0.37	0.03	0.23	0.02	0.33	0.04
96~120	—	—	0.23	0.03	—	—	0.16	0.02	0.12	0.01	0.16	0.02
120~144	—	—	0.12	0.02	—	—	0.11	0.01	0.07	0.01	0.09	0.01
144~168	—	—	0.08	0.01	—	—	0.06	0.01	0.04	0.01	0.06	0.01
小計	73.5	4.77	80.1	5.85	79.8	4.90	87.3	4.94	83.3	4.88	83.9	5.62

— : 測定せず

* : 最終投与7日後以降は尿糞の測定を行っていない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表3-1 経口投与後の組織中放射能分布 (投与量%)

	3日間投与		7日間投与			
	1日後 (I群)	7日後 (II群)	1日後 (III群)	7日後 (IV群)	14日後 (V群)	21日後 (VI群)
副腎	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
血液	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
骨	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脳	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
カーカス	2.79	0.26	1.33	0.16	0.15	0.05
十二指腸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脂肪	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
生殖腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
心臓	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
腎臓	0.05	0.01	0.05	0.01	0.00	0.00
肝臓	0.23	0.00	0.15	0.03	0.01	0.01
肺	0.04	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
リンパ節	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
骨格筋	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
下垂体	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
胃腸管	9.74	0.04	3.02	0.04	0.01	0.00
皮膚	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
脾臓	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
胸腺	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
子宮	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表3-2 経口投与後の組織中放射濃度 (μg 当量/g組織)

	3日間投与		7日間投与			
	1日後 (I群)	7日後 (II群)	1日後 (III群)	7日後 (IV群)	14日後 (V群)	21日後 (VI群)
副腎	2.00	0.091	1.89	0.238	0.161	0.115
血液	0.054	< 0.016	0.074	< 0.021	< 0.015	< 0.017
骨	0.408	0.301	0.413	0.054	0.026	0.019
脳	0.020	0.020	0.030	< 0.014	< 0.019	< 0.017
カーカス	1.15	0.097	1.25	0.152	0.125	0.041
十二指腸	0.620	0.029	0.710	0.079	0.033	0.024
脂肪	2.93	0.353	5.46	0.589	0.163	0.101
生殖腺	1.16	0.069	1.32	0.170	0.078	0.060
心臓	0.493	0.139	0.468	< 0.086	0.067	< 0.084
腎臓	2.05	0.570	4.90	1.08	0.350	0.149
肝臓	1.99	< 0.014	2.81	0.518	0.205	0.114
肺	2.37	< 0.015	3.81	0.069	0.023	0.017
リンパ節	3.08	0.115	4.11	0.240	0.152	0.097
骨格筋	0.235	0.017	0.359	0.039	0.024	0.018
下垂体	1.60	< 0.409	1.20	2.04	< 0.391	< 0.372
胃腸管	24.6	0.111	20.3	0.148	0.036	0.018
皮膚	0.500	< 0.040	0.587	0.106	0.048	< 0.036
脾臓	1.41	0.088	1.76	0.277	0.256	0.109
胸腺	1.26	0.104	0.721	0.168	0.126	< 0.168
甲状腺	2.22	0.422	2.02	1.12	0.850	0.433
子宮	0.409	0.024	0.758	0.051	0.028	0.019

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

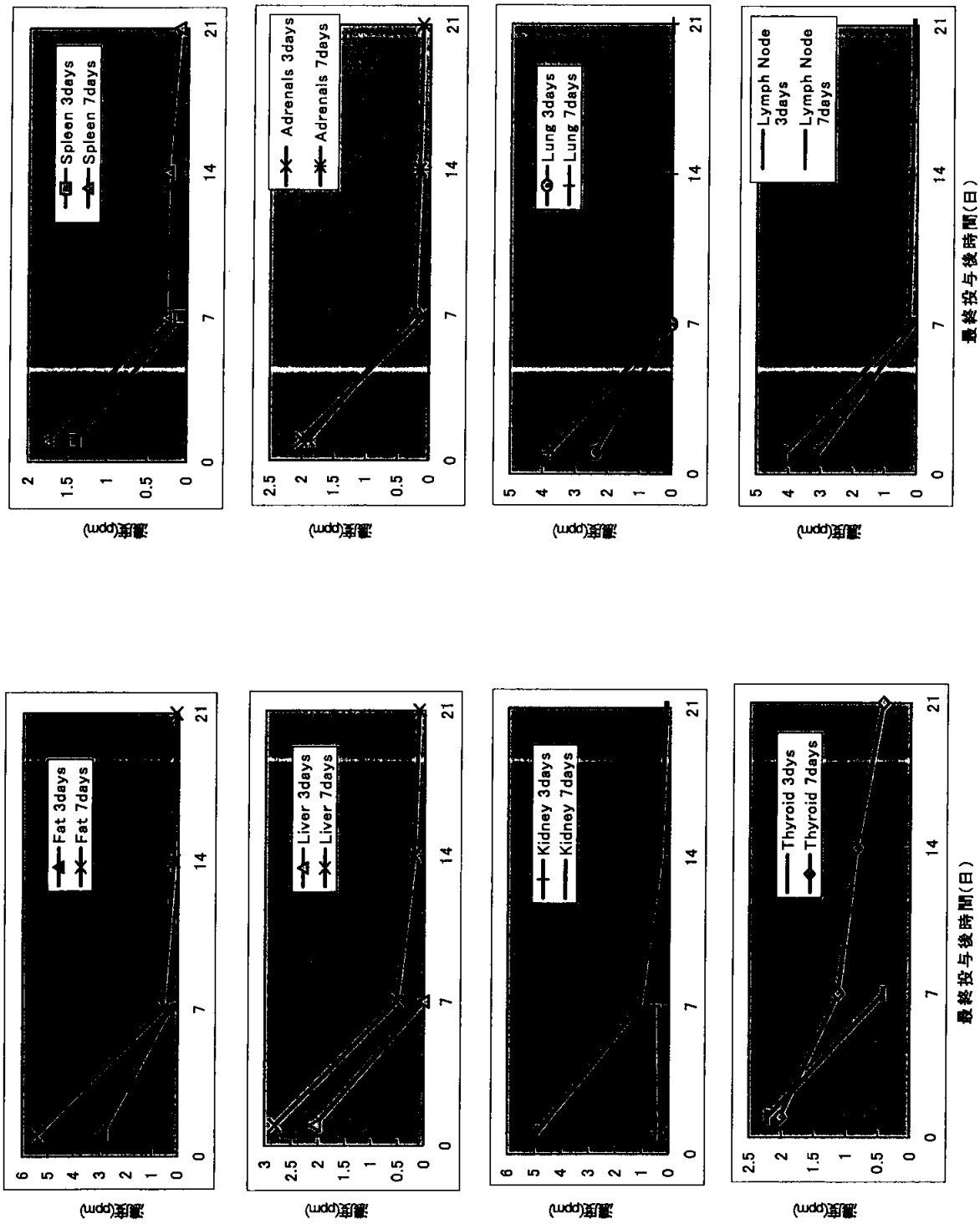


図1 主要臓器からの放射能の消失

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

動物代謝 (3)

スピノシンDのラットにおける代謝及び組織内分布

資料No. 52

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

単回経口投与後のスピノシンDの雌雄ラットにおける吸収, 分布, 排泄及び代謝を検討することを目的として実施した。

供試標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピ^oラニルオキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラニルオキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^o- ρ -4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oセノ[3, 2-d]オキサシクロ^oテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

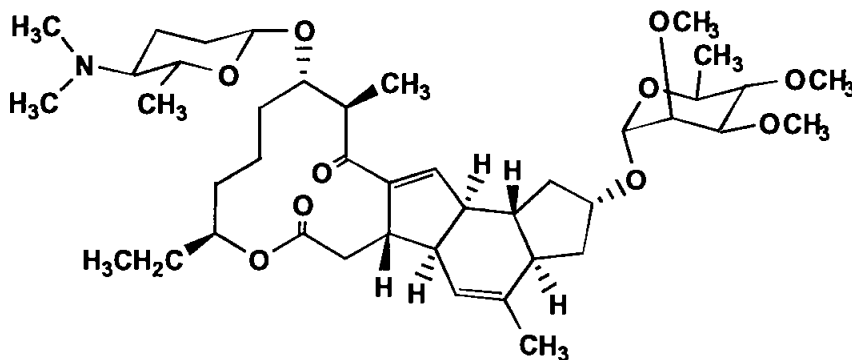
比放射能

放射化学的純度

標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法



供試動物

Fischer 344 系雌雄ラットを使用した。

投与時体重: 雄 190~205g, 雌 117~124g

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

試験群

雌雄ラットからなる下記の1試験群を設定した。

主試験目的	用量 (mg/kg)	投与回数	屠殺時点 (投与後時間, h)	動物数	
				雄	雌
排泄, 体内残存率 および尿, 糞中代謝物	100	単回	168	5	5

方 法

①動物飼育：ラットは使用前約1週間以上実験室環境に馴化させた。

水道水及び市販のげっ歯類用飼料を自由摂取させた。検体投与前にガラス製の代謝ケージに個別収容して、約3日間馴化させた。

②投与液の調製及び投与： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンDを0.5% METHOCELセルロースエーテル水溶液に懸濁させて、投与液量5g/kgで100mg/kg (約411 $\mu\text{Ci/kg}$) を1回強制経口投与した。この投与量は亜急性毒性試験における毒性発現量の約2倍に相当する。投与前の16時間は絶食させ、投与後約4時間に給餌を再開した。

③試料採取：

尿及び糞： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンD投与後、ラットを代謝ケージに戻し、試験中に排泄した尿はドライアイス冷却トラップに集めて凍結し、投与後48時間までは12時間毎に、48時間以降は24時間毎に採取した。糞は投与後24時間毎にドライアイス冷却容器に採取した。

呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ ：1-メトキシ-2-プロパノール：モノエタノールアミン(7:3 v/v)に捕集し、捕集液を24時間毎に交換した。

組織：投与後7日に動物を CO_2 で致死させ、心臓穿刺により放血させ、下記の組織を採取した。

骨、脳、腎周囲の脂肪、生殖腺、心臓、腎臓、肝臓、肺、骨格筋、脾臓、皮膚、胸腺、甲状腺、腸間膜リンパ節、副腎、十二指腸、残りの胃腸管及び内容物、血液及び残部カーカス

④放射能測定：尿及び呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ 。捕集液は直接、糞、腎臓、肝臓及びカーカスは水でホモジネートして一部を可溶化し、血液、脂肪、脳、皮膚、筋肉、骨、生殖腺、心臓、肺、脾臓、胸腺、甲状腺、腸間膜リンパ節、副腎、十二指腸、残りの胃腸管の試料は直接可溶化して、液体シンチレーション計測(LSC)により放射能を測定した。

⑤代謝物分析： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンDの代謝率及び代謝物の検討を行うために、プールした糞及

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

び尿試料について、放射能検出器及びUV検出器付HPLCと放射能検出器及び電子スプレームススペクトロメトリー検出器付HPLCを用いて分析を行った。

結 果

結果の概要を表1～4及び図1に示す。

①排泄及び体内残存： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンD経口投与後168時間に回収された放射能分布を表1に示す。総平均回収率は92%以上であった。排泄の主要経路は糞であり、投与放射能の約84%（雄）及び92%（雌）が糞中に排泄された。尿中排泄は少なく、投与放射能の約5%（雄）及び3%（雌）が排泄された。呼気中に $^{14}\text{CO}_2$ として<0.05%が排泄された。組織及びカーカスには雌雄とも投与放射能の<1%が残存した。ケージ洗浄液では投与放射能の<3%が検出された。

②尿中排泄の推移：放射能の尿中排泄の推移を表1に示す。投与後12時間に排泄された放射能は雌雄で同様であった（約2%）。尿中排泄の推移は二相性の減少を示し、雌雄とも α 相の半減期は約5時間、 β 相の半減期は約33時間でありスピノシンAとほぼ同程度であった。

③体内分布：投与後168時間における組織及び残部カーカス中の放射能濃度を表2に示す。総回収率は投与量の<1%であった。脂肪組織を除くすべての組織での濃度は1g当たり投与量の $\leq 0.02\%$ であった。脂肪組織は1g当たり投与量の0.05%（雄）及び0.09%（雌）を含み、血液の>100倍であった。肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節では血液と比べ10～30倍であった。

④糞中代謝物：

⑤尿中代謝物：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

まとめ

雌雄ラットに懸濁液として経口投与した [^{14}C] スピノシンDの吸収、排泄経路、排泄率及び代謝に性差がないことが示された。投与24時間以内に投与量の71~76%が糞中及び尿中に回収され、速やかに排泄されることが示された。組織及びカーカスには非常に低レベルの放射能（投与量の<1%）しか検出されず、スピノシンDは生体内蓄積性が低いことを示している。

スピノシンDの推定代謝経路を図1に示す。

スピノシンDとスピノシンAの吸収、排泄経路、排泄率及び代謝はほぼ同様であった。

表 1 100mg/kg経口投与後168時間に回収された放射能分布 (投与量%)

投与後時間 (h)	雄		雌	
	糞	尿	糞	尿
0 ~ 12	67.59	1.75	73.28	1.62
12 ~ 24		1.71		0.68
24 ~ 36	9.48	0.45	12.96	0.17
36 ~ 48	3.19	0.28	2.93	0.09
48 ~ 72	1.35	0.35	1.47	0.08
72 ~ 96	0.88	0.17	0.94	0.05
96 ~ 120	0.56	0.11	0.54	0.04
120 ~ 144	0.77	0.08	0.36	0.02
144 ~ 168		0.04		0.02
小計	83.83	4.94	92.48	2.76
呼気中CO ₂	0.03		0.04	
組織	0.50		0.47	
カーカス	0.36		0.31	
ケージ洗浄液	2.56		0.11	
合計	92.23		96.17	

表 2 100mg/kg経口投与後168 時間に回収された放射能の組織中分布

組 織	雄		雌	
	濃度	割合	濃度	割合
副腎	NQ	NQ	NQ	NQ
血液	0.092	0.03	0.099	0.04
骨	0.090	<0.01	0.128	<0.01
脳	NQ	NQ	NQ	NQ
カーカス	0.642	0.36	0.531	0.31
十二指腸	0.237	<0.01	0.233	<0.01
脂肪	11.140	0.03	10.684	0.04
胃腸管	1.611	0.19	1.572	0.21
心臓	0.137	<0.01	0.110	0.02
腎臓	2.619	0.02	2.029	0.05
肝臓	1.795	0.09	1.059	0.01
肺	0.492	<0.01	1.120	0.01
リンパ節	3.121	0.01	1.977	<0.01
筋肉	0.237	<0.01	0.494	<0.01
卵巣	—	—	3.031	<0.01
皮膚	0.523	0.13	0.331	0.08
脾臓	0.702	<0.01	0.504	<0.01
精巣	0.219	<0.01	—	—
胸腺	0.401	<0.01	0.343	<0.01
甲状腺	NQ	NQ	NQ	NQ

NQ=定量限界以下

濃度: μg 当量/g組織

割合: 対投与量%/全組織

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 3 100mg/kg経口投与後0～24時間にプールした糞試料の放射能プロファイル (投与量%)

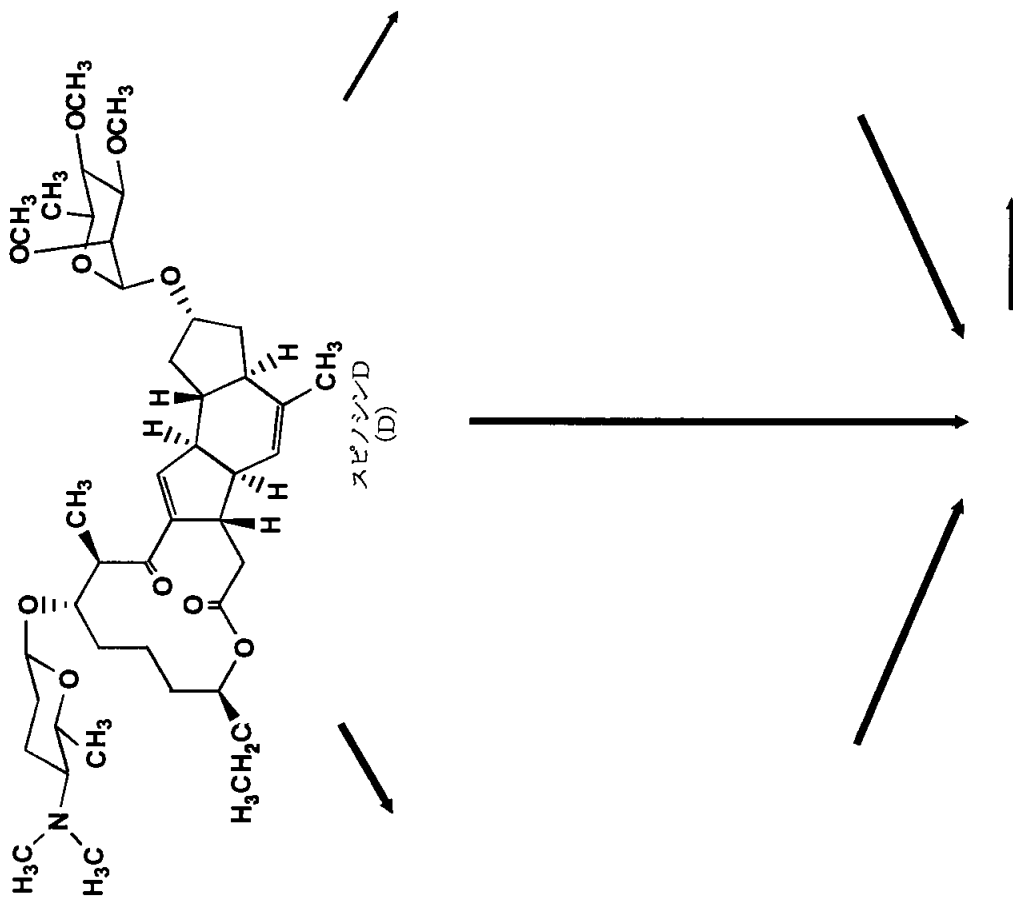
記号	ピーク	雄	雌

表 4 100mg/kg経口投与後0～12時間にプールした尿試料の放射能プロファイル (投与量%)

記号	ピーク	雄	雌

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

図1 スピノシンDの推定代謝経路



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

動物代謝 (4)

スピノシンDのラットにおける胆汁中排泄

資料No. 53

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

単回経口投与後のスピノシンDの雄ラットにおける胆汁中排泄を検討することにより吸収及び代謝を明らかにすることを目的として実施した。

供試標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-デ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-

マンピ^oラシ^oル^oキシ)-13-(4-ジ^oメチル^oア^oミノ-2, 3, 4, 6-テトラ^oデ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラシ^oル^oキシ)-9-エチル-

2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサ^oデ^oカ^oヒ^oロ-4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oゼノ

[3, 2-d]オキサシク^oロ^oデ^oシ^oン-7, 15-ジ^oン

比放射能

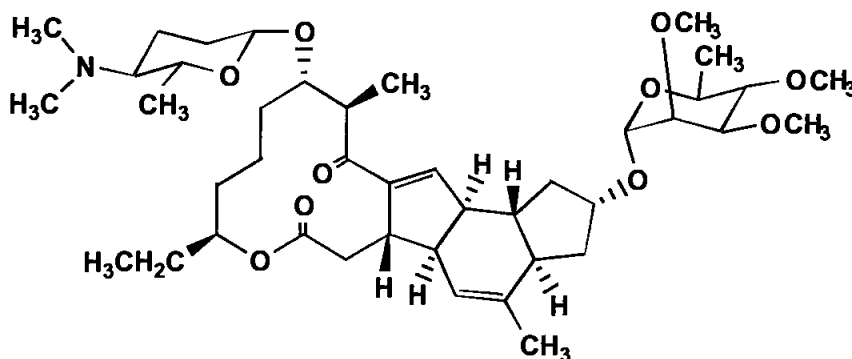
放射化学的純度

標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

構造式



供試動物

Fischer 344 系雄ラット 3匹を使用した。

投与時体重 160~180g

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

方 法

①動物飼育及び胆管カニューレ処置：ラットは使用前約1週間実験室環境に馴化させた。水道水及び市販のげっ歯類用飼料を自由摂取させた。ラットに胆管カニューレを埋め込み、術後約3日間の回復期間を置き、検体投与前にガラス製の代謝ケージに個別収容し、馴化させた。カニューレ処置の状態が最も良好なラット3匹を試験に選択した。

②投与液の調製及び投与： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンDを0.5% METHOCELセルロースエーテル水溶液に懸濁させて、投与液量5g/kgで100mg/kg ()を1回強制経口投与した。この投与量は亜急性毒性試験における毒性発現量の約2倍に相当する。投与前の16時間は絶食させ、投与後約4時間に給餌を再開した。

③試料採取：

尿及び糞： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンD投与後、ラットを代謝ケージに戻し、試験中に排泄した尿はドライアイス冷却トラップに集めて凍結し、投与後24時間目に1回採取した。糞は投与後24時間目にドライアイス冷却容器に採取して凍結した。

呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ ：1-メトキシ-2-プロパノール：モノエタノールアミン(7:3 v/v)に捕集した。

胆汁：投与後2, 4, 6, 8, 12及び24時間にドライアイス冷却採取用容器を交換して胆汁を採取した。6時間の採取後、胆汁組成の変化を最小限にするために、約1mlの対照胆汁を十二指腸を通して動物に補給した。

皮膚、カーカス及び血液：投与後24時間に動物を CO_2 で致死させ、心臓穿刺により放血させ、皮膚、カーカス及び最終の血液を採取した。

④放射能測定：尿、胆汁及び呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ 捕集液は直接、糞及びカーカスは水でホモジネートして可溶化し、血液及び皮膚は直接可溶化して、液体シンチレーション計測(LSC)により放射能を測定した。

⑤代謝物分析：プールした胆汁試料について、放射能検出器及びUV検出器付HPLCと放射能検出器及び電子スプレーマスマスペクトロメトリー検出器付HPLCを用いて、 $[^{14}\text{C}]$ スピノシンDの胆汁中代謝物の検討を行った。

結 果

結果の概要を表1～3に示す。

①排泄及び体内残存： $[^{14}\text{C}]$ スピノシンD経口投与後24時間に回収された放射能分布を表1に示す。総平均回収率は95%以上であった。投与後24時間に投与放射能の約36%が胆汁中に、約34%が糞中に排泄された。組織及びカーカスには21.4%が残存していた。尿中に約3%が

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

排泄され、呼気中にCO₂として<0.1 %が排泄された。ケージ洗浄液では<1 %が検出された。

経口投与量の約60%が吸収されたと推定された。

②胆汁中代謝物：

まとめ

胆管カニューレ処置したラットに経口投与した [¹⁴C] スピノシンDは、投与量の約60%が吸収され、ほぼ同量の放射能が糞中（約34%）及び胆汁中（約36%）に排泄された。

スピノシンDとスピノシンAの吸収率および胆汁排泄率はほぼ同程度であり、胆汁中から検出された代謝物も同様の代謝反応による生成物であった。

表 1 100mg/kg経口投与後24時間までに回収された放射能分布 (投与量%)

試料	投与後時間 (h)	投与量%
胆汁	0 ~ 2	3.34
	2 ~ 4	8.76
	4 ~ 6	5.41
	6 ~ 8	3.42
	8 ~12	5.22
	12 ~24	9.56
小計		35.72
糞		34.27
尿		3.27
組織及びカーカス		21.41
呼気中CO ₂		0.09
ケージ洗浄液		0.81
合 計		95.56
吸収率		60.49

吸収率の計算：胆汁中排泄率，尿中排泄率，呼気中排泄率，
組織及びカーカスの合計とした。

表 2 100mg/kg経口投与後 2～4 時間及び 6～8 時間にプールした胆汁試料の放射能プロファイル (投与量%)

記号	ピーク	2～4 時間胆汁	6～8 時間胆汁

作物代謝 (1)

茎葉処理後のキャベツにおける代謝運命

資料No. 54

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

茎葉処理後のスピノサドのキャベツへの吸収、分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。

^{14}C -標識化合物

化学名

[^{14}C] スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピ^oラノシ^oキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラノシ^oキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^o-14-メチル-1H-as-インダ^oゼノ [3, 2-d]オキサシクロ^oテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[^{14}C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピ^oラノシ^oキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラノシ^oキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^o-4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oゼノ [3, 2-d]オキサシクロ^oテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[^{14}C] スピノシンA

[^{14}C] スピノシンD

比放射能

放射化学的純度

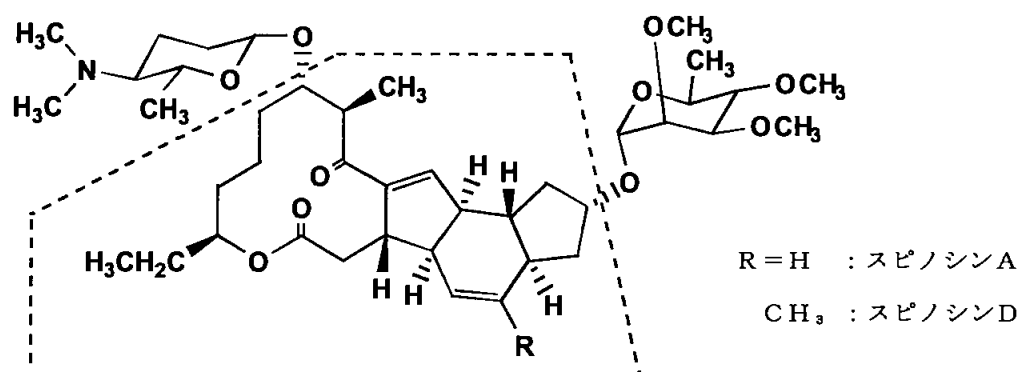
標識位置 点線内の炭素原子を均一に ^{14}C で標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

構造式



供試作物

キャベツ (品種: Brassica oleracea var. Wakamine) を使用した。

作物調製場所

米国Mississippi州 Wayside, Wayside研究圃場

作物調製期間

1992年2月28日～1992年6月16日

処理区の設定

2畝(幅5m)を1区画とした。畝の間は約0.6m, 区画間は約5.5m離して設定した。3区画設置し第1区画をスピノシンA, 第2区画をスピノシンD, 第3区画を無処理区とした。

方法

① 施用

1区画16個のキャベツに予定慣行施用量(500g a. i. /ha)の3.1倍に相当する量を乳剤として加圧式ハンディースプレイヤーで散布した。

	スピノシンA	スピノシンD
成分量	505 mg	505 mg
比放射能		
乳剤量	6 ml	6 ml
水	400 ml	400 ml

② 気象データ

栽培期間中の最高気温, 最低気温, 土壌温度, 降水量, 照度等は処理圃場から13kmに位置する国立気象サービスセンターで毎日測定した。降水量については, 処理圃場においても測定し

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

た。

③ 試料採取

施用当日，施用3，10，19および34日に下記の試料を採取した。

採取時点	試料数	採取試料
0日 (2.5 時間)	2	茎葉部，根部
3日	2	茎葉部，根部
10日	2	茎葉上部，茎葉下部，根部
19日	2	茎葉上部，茎葉下部，根部
34日	2	結球部，茎葉下部，根部

植物試料は地際から切り取り，根は移植ごとで採取した。試料は保冷剤と共に梱包し，ダウ・エランコ研究所へ空輸した。試料は一時的に冷蔵または冷凍して分析時まで保管した。10日以後の試料は地上部を茎葉上部と茎葉下部に分離した。根は流水で洗浄し，土壌をよく落した。それぞれの試料を液体チッ素で凍結させ，ミルで粉碎して抽出時まで冷凍保管した。

④ 分 析

茎葉部および根部は図1のフローシートに従って分析した。すなわち，試料はそれぞれアセトニトリル：水（80：20）を加え，ホモジナイズおよび濾過，続いてアセトニトリルで還流後濾過して残渣画分と抽出液画分に分離した。抽出液はアセトニトリルを留去し，ジクロロメタン，続いて酢酸エチルで抽出した（ジクロロメタン1画分）。水相（水相-1画分）は更に， β -グルコシダーゼとセルラーゼで酵素加水分解，続いて2N塩酸水溶液中で1時間還流，放冷したのち，それぞれ酢酸エチル抽出し，2つの酢酸エチル画分と水相-2画分に分画した。抽出液，各有機溶媒画分，水相画分，および抽出残渣を放射能測定するとともに有機溶媒画分をTLCで代謝物分析した。抽出残渣は，アセトニトリル：水で還流，さらに0.1N塩酸で還流して洗浄した。得られた精製植物繊維を酸で加熱加水分解したのち，フェニルヒドラジンと反応させグルコースをグルコサゾンに誘導体化した。

⑤ 放射能測定

液体試料は直接，抽出残渣など固体試料は自動燃焼装置で酸化燃焼処理したのち，いずれも液体シンチレーション計測(LSC)法で ^{14}C -放射能を定量した。HPLCでは放射能検出器を用いるかフラクションコレクターで分取後LSCで ^{14}C を定量した。TLC上の放射能はイメージスキャナーで定量した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

⑥ 代謝物の検出、定量および同定

代謝物はTLC およびHPLC上での合成標品（
 ）とのクロマトグラフィーで同定した。TLC プレート上の放射性代謝物等はオートラジオグラフィー法で検出し、非放射性物質はUV照射によるクエンチングで検出した。また分析に十分な量を得られた代謝物については、LC-MS を用いて質量分析を行ない、合成標品と比較して同定した。

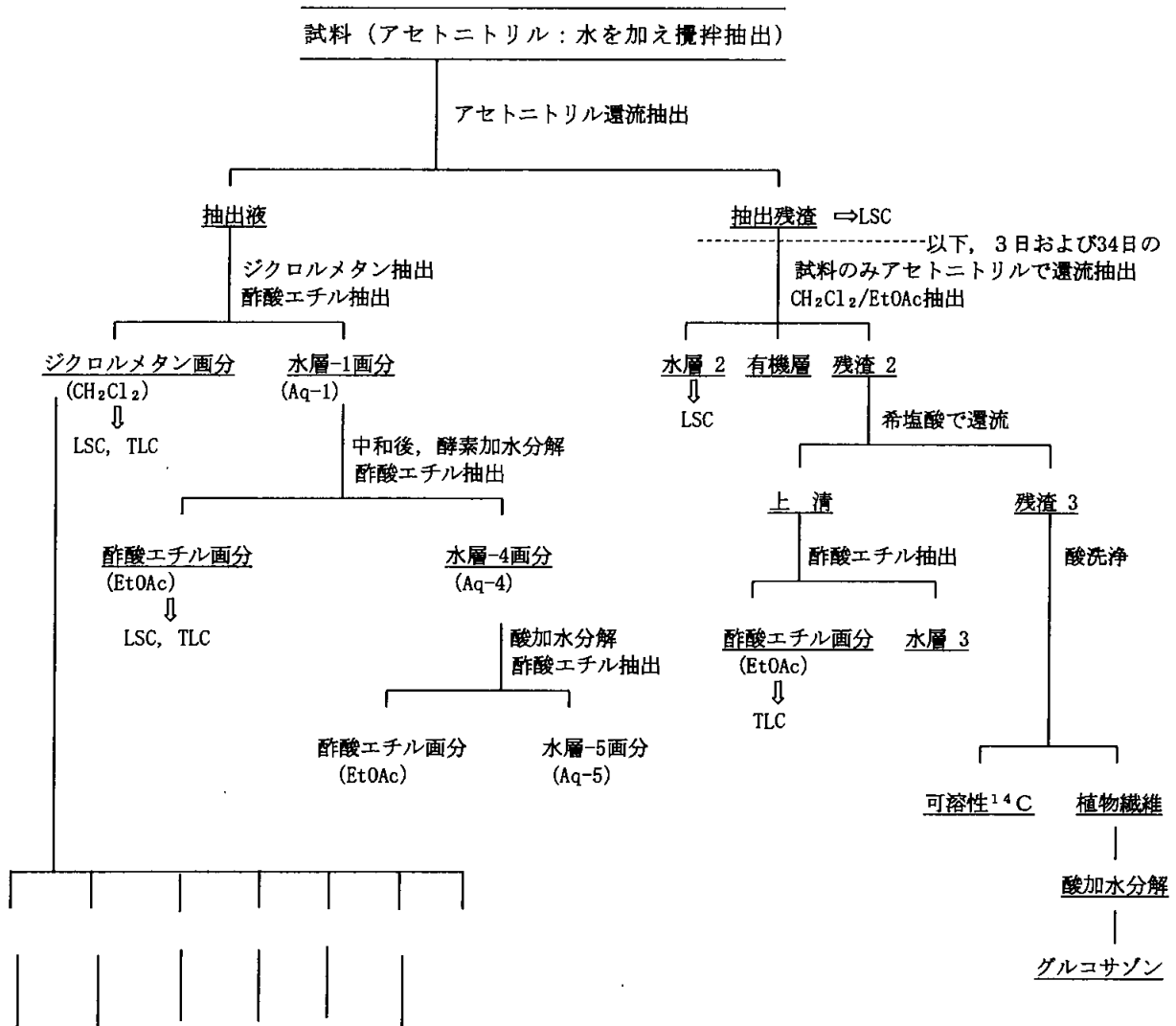


図 1 分析フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

結 果：結果の概要を表1～5に示す。

[¹⁴C] スピノシンA処理当日の葉中残留総放射能 (TRR) は74ppm であり、34日後には 0.8 ppm に低下した。 [¹⁴C] スピノシンD処理でも同様に、処理当日の葉中のTRRは 89ppmであり、34日後には0.9ppmに低下した。成熟期における下葉部のTRRはスピノシンA、スピノシンDいずれの処理でも約2.5ppmであったが、結球部のTRRは 0.04ppmを超えなかった。作物の成長および風雨の影響が低残留量の原因と考えられる。処理当日の試料では96%以上が抽出され、その大部分が有機層に分配された。10日後の試料 (70%が抽出された) の分析結果から、スピノシンA、Dの急速な分解が示唆された。

処理当日の試料を分析したところ、2.5時間後という短時間にもかかわらずスピノシンAおよびDいずれもTRRの50%未満(40.6および48.0%)に減少しており、光分解の影響が大きいことが示唆された(表3)。

3日後では親化合物はTRRの約10%(A:10.2%, D:13.4%)であった(表3)。スピノシンA処理3日後の試料の

スピノシンDについては、市販される製品中での混合比が低いことから、同様の残留物が生成するもののその濃度は低いものと予想される。

また3日後およびその以降の試料のTLCおよびHPLCのクロマトグラムを観察したところ、数多くの極性少量残留物の存在が示唆された。表4(3日後)および5(34日後)に示すような水層画分および抽出残渣放射能の特性検討の結果の比較では、34日目には難抽出性の物質が増加し、特に洗浄後の植物繊維のTRRは1.5%から9.5%へ増加した。

スピノシンAおよびスピノシンD処理3日後の試料中残留物の比較の結果、両成分の代謝分解様式は類似であることが示唆された。

表1 スピノサド処理キャベツ中の残留放射能濃度 (PPM*)

	スピノシンA					スピノシンD				
	0日	3日後	10日後	19日後	34日後	0日	3日後	10日後	19日後	34日後
葉										
作物 No.1										
上部	29.413	19.204	1.070	0.187	0.030	89.143	25.419	6.097	0.054	0.017
下部			4.884	4.334	2.445 ^d				2.683	2.481 ^d
葉(計) ^c	<u>29.413</u>	<u>19.204^d</u>	<u>3.766</u>	<u>2.182</u>	<u>0.778</u>	<u>89.143^d</u>	<u>25.419^d</u>	<u>6.097</u>	<u>1.409</u>	<u>0.891</u>
作物 No.2										
上部	74.356	17.149	4.338 ^d	0.085	0.037	52.317	17.495	6.519	0.126	0.020
下部				3.933 ^d	2.099				5.278 ^d	2.039
葉(計) ^c	<u>74.356^d</u>	<u>17.149</u>	<u>4.338</u>	<u>1.923</u>	<u>0.727</u>	<u>52.317</u>	<u>17.495</u>	<u>6.519^d</u>	<u>2.945</u>	<u>0.717</u>
根										
作物 No.1	0.026	0.241	0.198	0.162	0.444	0.089	0.399	0.763	0.103	0.267
作物 No.2	0.045	0.147	0.285	0.148	0.384	0.204	0.166	0.309	0.268	0.247

作物はスピノシンA用、スピノシンD用、別々に準備し各時点毎に2株ずつ採取した。
 a PPM値はそれぞれスピノシンAまたはスピノシンD換算で表示した。比放射能は、スピノシンAが 2775dpm/μg, スピノシンDが1110dpm/μgであった。

b 上部とは結球部を指す。区別がつかないほどの幼苗の場合は完全に地面から離れている部分のことである。

c 葉(計)は試料総重量と分析試料重量の比から算出した。

d 抽出試料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表2 放射性残留物の分画

	スピノシンA		スピノシンD	
	% T R R ^a	PPM	% T R R	PPM
葉				
0日				
ジクロルメタン	94.1	69.936	95.7	85.334
水層	2.0	1.470	1.7	1.504
抽出残渣	4.0	2.950	2.6	2.305
計	100	74.356	100	89.143
3日後				
ジクロルメタン	70.6	13.550	74.7	18.998
水層	14.2	2.733	11.2	2.837
抽出残渣	15.2	2.921	14.1	3.584
計	100	19.204	100	25.419
10日後				
ジクロルメタン	48.8	2.119	57.3	3.732
水層	18.3	0.795	16.3	1.063
抽出残渣	32.8	1.425	26.4	1.724
計	100	4.338	100	6.519
19日後 (下部葉)				
ジクロルメタン	45.8	1.801	50.0	2.637
水層	12.8	0.503	15.9	0.838
抽出残渣	41.4	1.629	34.2	1.803
計	100	3.933	100	5.278
34日後 (下部葉)				
ジクロルメタン	38.8	0.950	43.5	1.079
水層	15.9	0.389	15.2	0.378
抽出残渣	45.3	1.107	41.3	1.024
計	100	2.445	100	2.481
根 : 34日後				
ジクロルメタン	26.8	0.119	38.0	0.102
水層	30.9	0.137	21.9	0.058
抽出残渣	42.3	0.188	40.1	0.107
計	100	0.444	100	0.267

a (% T R R) : 試料中残留総放射能に対する割合

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表3 スピノシンAおよびスピノシンDの残留量(%TRR)

	0日	3日後	10日後	19日後	34日後
スピノシンA処理					
ジクロルメタン画分	94.1	70.6	48.8	45.8	38.8
シカガ [®] カラム精製の主画分*	-	-	-	42.6	37.2
ジクロルメタン画分又はシカガ [®] カラム精製の主画分のTLC分析					
スピノシンA	40.6	10.2	2.3	1.1	0.6
スピノシンB+K	19.9	15.2	10.4	6.0	1.2
濃度 (ppm)	30.157	1.952	0.102	0.042	0.015
スピノシンD処理					
ジクロルメタン画分	95.7	74.7	57.3	50.0	43.5
シカガ [®] カラム精製の主画分*	-	-	-	45.6	41.9
ジクロルメタン画分又はシカガ [®] カラム精製の主画分のTLC分析					
スピノシンD	48.0	13.4	5.3	4.3	4.5
N-脱メチルスピノシンD	19.1	12.5	6.2	4.6	4.1
濃度 (ppm)	42.826	3.418	0.347	0.229	0.112

*: 19日後と34日後の試料については妨害物質を除去するため、シカガ[®]カラムクロマトグラフィーで精製した。

表4 3日後試料を徹底抽出した結果

スピノシンA			スピノシンD			
	試料中 ¹⁴ Cに対する%	各画分の%TRR	PPM	試料中 ¹⁴ Cに対する%	各画分の%TRR	PPM
アセトニトリル						
ジクロルメタン*		74.7	14.340		80.2	20.375
[シリカゲルカラム画分A]		[7.3]				
(スピノシンA)		(6.7)				
[シリカゲルカラム画分B]		[7.3]				
(スピノシンA)		(0.3)				
(スピノシンB)		(2.7)				
(N-formyl B)		(1.5)				
[シリカゲルカラム画分C]		[12.5]				
(スピノシンK)		(5.3)				
[シリカゲルカラム画分その他]		[45.5]				
水層-1		10.8	2.083		8.8	2.233
抽出残渣		14.5	2.781		11.1	2.811
アセトニトリル/水						
ジクロルメタン	31.5	4.6	0.876	31.0	3.4	0.875
水層	8.7	1.3	0.241	10.8	1.2	0.305
抽出残渣	58.6	8.5	1.631	62.7	7.0	1.769
0.1N塩酸						
酢酸エチル	11.2	0.9	0.182	14.7	1.0	0.260
水層	17.9	1.5	0.293	16.9	1.2	0.299
抽出残渣	61.8	5.2	1.008	61.2	4.3	1.082
植物繊維の洗浄						
精製植物繊維	28.1	1.5	0.283	37.6	1.6	0.407
洗液	71.9	3.8	0.724	62.4	2.7	0.675

*: ジクロルメタン画分はシリカゲルカラムで分画し、A-Cの画分を濃縮しTLCで定量した。鉤括弧内に画分の量(%TRR)を、括弧内に画分中の代謝物の量(%TRR)を示した。

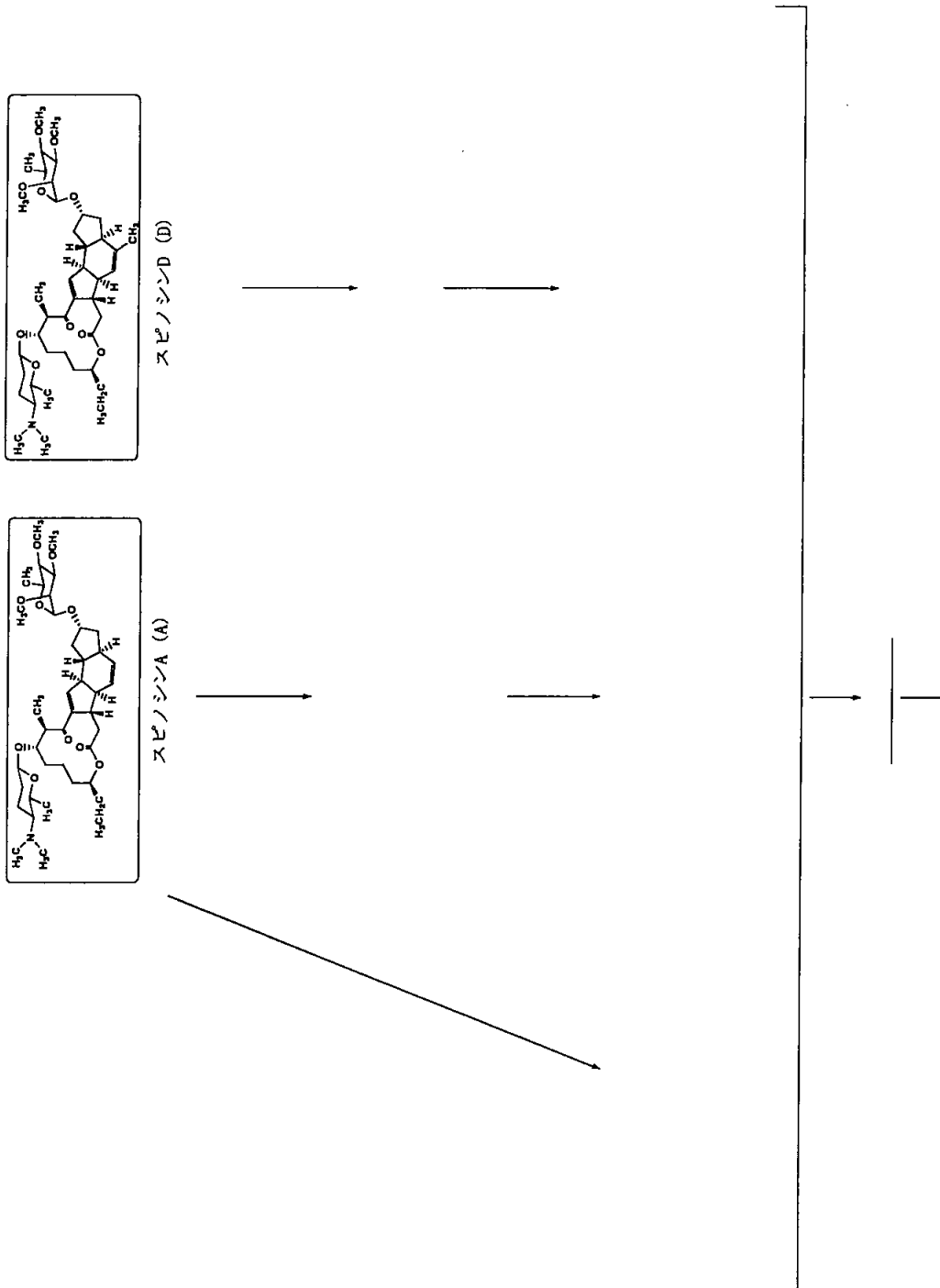
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 5 34日後試料を徹底抽出した結果

	試料中 ¹⁴ Cに対する%	各画分の% T R R	P P M
アセトニトリル			
ジクロルメタン		42.0	1.028
水層-1		16.3	0.398
抽出残渣		41.7	1.019
アセトニトリル/水			
ジクロルメタン	17.2	7.2	0.176
酢酸エチル	0.5	0.2	0.005
水層	10.8	4.5	0.110
抽出残渣	70.0	29.2	0.714
0.1N塩酸			
酢酸エチル	7.6	2.2	0.054
水層	26.8	7.8	0.191
抽出残渣	57.9	16.9	0.413
植物繊維の洗浄			
精製植物繊維	56.5	9.5	0.233
洗液	43.5	7.4	0.180

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

(代 謝)



()内は代謝物一覧表の記号を示す。

天然成分への固化
高毒性残留物への変換

図1 茎葉処理後のキャベツにおけるスピノサドの主要代謝経路

作物代謝 (2)

土壌処理後のキャベツにおける代謝運命

資料No. 55

試験機関:

報告書作成年: 1996年

試験目的

土壌処理後のスピノサドのキャベツへの吸収、分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。

¹⁴C-標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシン A

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ⁺オキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル-
α-L-マンノピ⁺ラノシ⁺オキシ)-13-(4-ジ⁺メチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ⁺オキシ-β-D-エリスロピ⁺ラノシ⁺オキシ)-9-エチル-
2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ⁺カヒド⁺ロ-14-メチル-1H-as-インダ⁺ゼノ
[3, 2-d]オキサシクロ⁺テ⁺シ⁺ン-7, 15-ジ⁺オン

比放射能

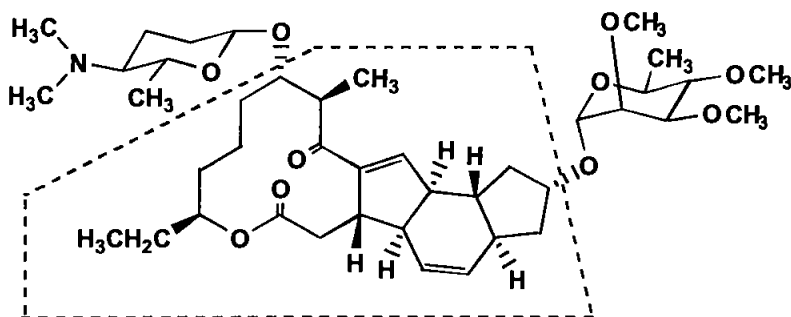
放射化学的純度

標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

構造式



供試作物

キャベツ (品種: 初秋) を使用した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

土 壤

東京都農業試験場（東京都立川市）から採取した。特性は以下の通りであった。

pH (H ₂ O)	6.3
有機炭素	4.44%
陽イオン交換用量	33.7 me/100g
土性分類	LiC(軽埴土)

試験前に市販の園芸用消石灰（粒状）を加えて中和処理を行った。

方 法

① 施 用

[¹⁴C] スピノシンAを土壌濃度0.5ppmになるように添加した。（慣行施用量の500g a. i./haに相当する。）この土壌を底部内径約23cm，上部内径約36cmのプラスチック製ポットに充填し，ここへあらかじめ予備栽培したキャベツ苗を移植した。処理土壌とキャベツ体地上部との接触するため表層に非処理の土壌を敷いた。処理土壌の4ポットをキャベツ栽培に使用し，他の1ポットは土壌中残留物分析に使用した（キャベツ非栽培）。

② 栽培条件

屋外の温室で栽培した。温室内温度は東京地方の月別平年気温を参考に決定した。5月31日～7月10日は日中23℃，夜間18℃とし，7月11日～8月8日は日中27℃，夜間22℃に設定した。湿度は70%に設定した。各ポットには50gの緩効性化成肥料を施肥した。灌水は自動散水装置を用いて上水道水を散水した。

③ 試料採取

土壌は1ポットから施用当日，施用13日後および69日後に1部ずつを採取した。キャベツは13日後の間引き試料（各ポットから2本）を中間採取試料とし，最終収穫試料は69日後に採取した。中間採取試料は地上部および根部に，最終収穫試料は結球部，外葉および根部に分割した。

④ 分 析

土 壤

土壌にアセトン：メタノール（1：1）を加えて，振とう抽出した後，濾過して抽出液を抽出残渣に分割した。抽出液はLSCで放射能を測定後BOND ELUT C₁₈カートリッドカラムで精製したのち，HPLCおよびTLCで分析した。抽出残渣は乾燥し，燃焼後LSC

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

で放射能を測定した。

植物試料

試料にアセトニトリル：水（8：2）を加え、ポリトロンホモジナイザーを用い磨砕抽出した後、濾過して抽出液と抽出残渣に分割した。抽出液はLSCで放射能を測定し、抽出残渣は燃焼法後LSCで放射能を測定した。

⑤ 放射能測定

液体試料は直接、抽出残渣など固体試料は自動燃焼装置で酸化燃焼処理したのち、いずれも液体シンチレーション計測(LSC)法で ^{14}C -放射能を定量した。HPLCでは放射能検出器で検出後フラクションコレクターで分取後LSCで ^{14}C を定量した。

⑥ 代謝物の検出、定量および同定

代謝物はTLCおよびHPLC上での合成標品（スピノシンA, B, K）とのクロマトグラフィーで同定した。TLCプレート上の放射性代謝物等はオートラジオグラフィー法で検出し、非放射性物質はUV照射によるクエンチングで検出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

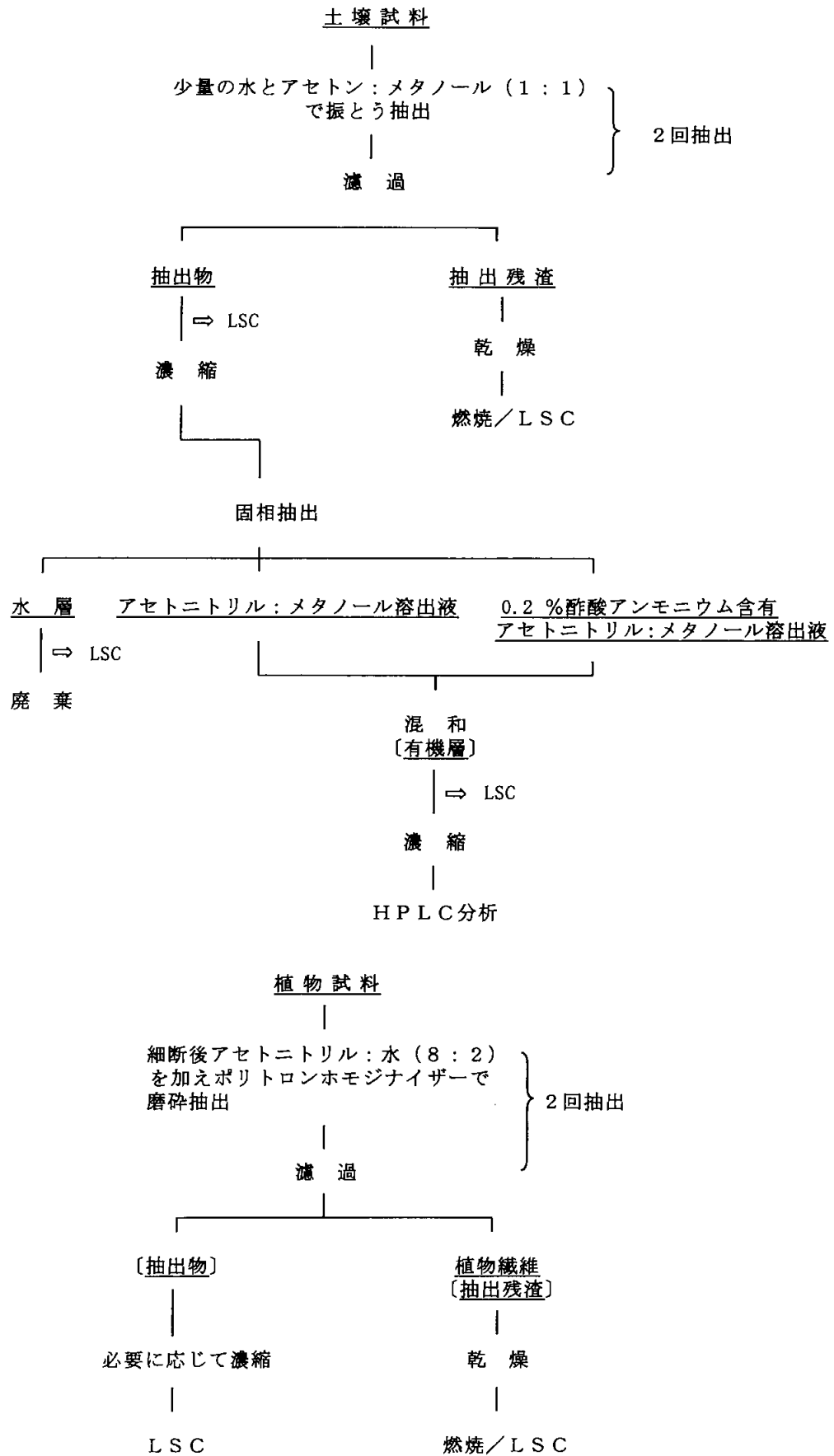


図1 分析フローシート

結 果

土壌中の放射性残留物とそのレベル

1. 約0.50ppm の濃度で施用した [^{14}C] XDE-105土壌中の全 ^{14}C レベルの減衰速度は比較的遅く、69日後でも約0.42ppm eq. (施用放射能の約85%) の放射能が残留していた。土壌中に残留する ^{14}C のうち、有機溶媒 (アセトン; メタノール=1:1, v/v) で抽出可能な放射能は経時的に減少し、施用69日後で施用放射能の約53%となった。それに伴って抽出残渣中の ^{14}C が経時的に増加し、69日後で施用放射能の約31%となった。
2. 土壌抽出液中の放射性成分は、BOND ELUT C_1 。カラムを用いた固相抽出で精製したのち、HPLC分析に供した。未変化のスピノシンAのほかに、主代謝分解物として
HPLC分析およびTLC分析で認められた。
3. スピノシンAの土壌中の残留レベルは比較的速やかに減衰し、13日後には0.14ppm (施用量の約29%)、69日後には0.08ppm (施用量の約17%) となった。

キャベツ体各組織中の放射性残留物レベル

1. [^{14}C] スピノシンA処理土壌に移植したキャベツ体を中間採取時 (移植13日後) と成熟期 (移植69日後) の2時点で採取し、各組織中に吸収移行した ^{14}C -濃度 (湿重量当たり) を抽出法により調べた。
2. 中間採取時のキャベツ体は地上部と根部に分けて分析した。地上部からは約2ppb eq. (施用量の0.008%)、根部からは60ppb eq. (施用量の0.006%) の放射能が認められた。地上部に検出された放射能は抽出残渣中のみに認められたが、根部では抽出液から47ppb eq. の放射能が検出された。中間採取時では対照区 (非放射性スピノシンA処理区) 地上部の抽出残渣中からも低レベルの放射能が検出された (4ppb eq.)。この放射能は、[^{14}C] スピノシンAの土壌中での微生物分解により発生した $^{14}\text{CO}_2$ が、炭酸同化作用でキャベツのC1プールに取り込まれた放射性物質 (天然成分) である可能性が高いと考えられる。
3. 最終収穫期 (成熟期) のキャベツ体は結球部、外葉+莖部と根部に分けて分析した。いずれの組織でも、抽出液中および抽出残渣からは放射能は検出されなかった。また対照区キャベツ体からも放射能は認められなかった。
4. 中間採取時と成熟期のキャベツ体中放射能の分析結果から、施用後初期 (13日後) では、[^{14}C]スピノシンA (およびその土壌中の代謝分解物) の一部は土壌に比較的弱い吸着

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

状態で存在し、これがキャベツ根部に微量吸収されるが、土壌中残留物は時間の経過と共に次第に強く土壌に吸着され、キャベツに吸収され難くなると考えられた。また、初期（13日後まで）に吸収された [^{14}C]スピノシンA（およびその土壌中の代謝分解物）は地上部へは移行し難く、地上部に移行したとしても肥大生長による希釈効果により、可食部である結球部では放射能は検出されないレベルに低下するものと推定された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表1 土壤中放射能の分析

画分	施用後日数		
	0	13	69
	処理量に対する割合 (%)		
抽出物	94.50 (0.465)	71.36 (0.351)	53.43 (0.263)
抽出残渣	7.80 (0.038)	21.48 (0.106)	31.11 (0.153)
回収率	102.30 (0.503)	92.84 (0.457)	84.53 (0.416)

括弧内の数字はmg eq/kg土壌を示す。

表2 キャベツ中放射能の分析

試料	抽出部	抽出残渣	計
	mg/kg eq.		
<u>13日後</u>			
¹⁴ C-処理群			
地上部	<0.005 (<0.019)	0.002 (0.008)	0.002 (0.008)
根部	0.047 (0.005)	0.013 (0.001)	0.060 (0.006)
対照群			
地上部	<0.005	0.004	0.004
根部	<0.013	<0.006	N. D.
<u>69日後</u>			
¹⁴ C-処理群			
結球部	<0.008 (<0.186)	<0.001 (<0.013)	N. D. (N. D.)
外葉部および基部	<0.007 (<0.079)	<0.003 (<0.035)	N. D. (N. D.)
根部	<0.007 (<0.006)	<0.005 (<0.004)	N. D. (N. D.)
対照群			
結球部	<0.008	<0.001	N. D.
外葉部および基部	<0.007	<0.003	N. D.
根部	<0.008	<0.007	N. D.

括弧内の数字は施用量に対する割合 (%) を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

作物代謝 (3)

茎葉処理後のかぶにおける代謝運命

資料No. 56

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

茎葉処理後のスピノサドのかぶへの吸収, 分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。

¹⁴C-標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル-
α-L-マンノピ^oラノシ^oオキシ)-13-(4-シ^oメチ^oアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ-β-D-エリスロピ^oラノシ^oオキシ)-9-エチル-
2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-14-メチル-1H-as-インダ^oセ^o
[3, 2-d]オキサシクロ^oテ^oシン-7, 15-シ^oン

[¹⁴C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル-α-L-
マンノピ^oラノシ^oオキシ)-13-(4-シ^oメチ^oアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ-β-D-エリスロピ^oラノシ^oオキシ)-9-エチル-
2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-4, 14-シ^oメチル-1H-as-インダ^oセ^o
[3, 2-d]オキサシクロ^oテ^oシン-7, 15-シ^oン

[¹⁴C] スピノシンA

[¹⁴C] スピノシンD

比放射能

放射化学的純度

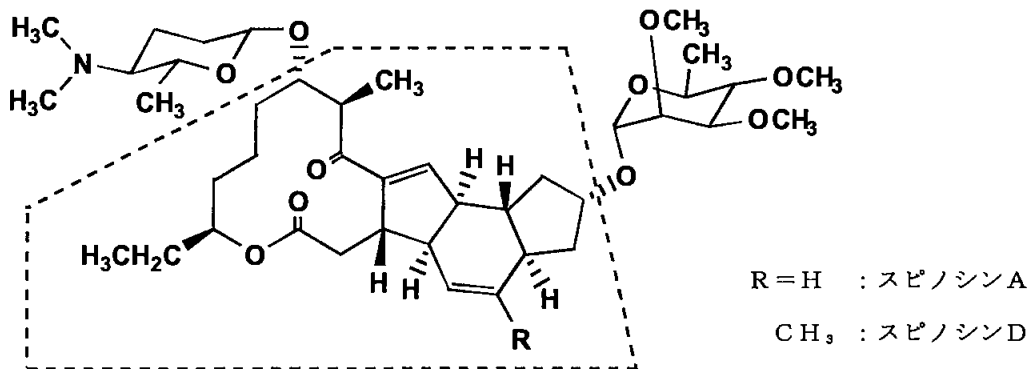
標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

構造式



供試作物

かぶ (Brassica rapa) を使用した。

土 壤

下記特性の土壌を使用した。

pH	6.5
有機炭素	2.6 %
陽イオン交換用量	18.8 me/100g
土性分類	SL(砂壤土)

作物調製場所

米国California州Watsonville

Plant Science 社

作物調製期間

1992年6月26日～1992年10月5日

処理区的设计

0.76m×0.91m×0.06mの木箱にポリエチレンのフィルムを内貼りをしてここへ1.25cmのふるいを通した土壌を上から2.5cmまで充填した。2つの箱を処理区とし、別の1つの箱を対照区とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

方 法

① 施 用

1区画のカブにスピノシンAについては予定慣行施用量(500g a.i./ha)の1.6倍に相当する量を、スピノシンDについては3.4倍に相当する量を乳剤として加圧式ハンディースプレーヤーで散布した。

	スピノシンA	スピノシンD
濃 度	977 ppm	511 ppm
比放射能		
散布量	200 ml	200 ml

② 栽培条件および気象データ

ビニールハウス内で栽培した。薬剤散布前は葉面へスプリンクラーで2~7 lの水を週3回灌水した。散布後は5~6.5 lの水を週2回土壌に灌水した。最高・最低温度、降水量、湿度および照度を測定した。

③ 試料採取

スピノシンA、スピノシンDおよび対照区いずれも処理当日、10、24日後および収穫期(48日後)に根および茎葉部を採取した。

④ 分 析

0日の試料を除いて、ダウ・エランコへの送付前にPlant Science社でドライアイス凍結して粉碎した後、燃焼法で放射能を測定した。0日の試料のみ添加直後に採取し、そのまま凍結してダウ・エランコへ送付した。

0日の試料

0日の試料は葉を直径1.5cmの円形に20枚くりぬいて、ここへメタノールまたはアセトニトリル/メタノール/水(4/4/1)を加えて攪拌抽出して放射能を測定した。抽出液は濃縮してTLCで分析した。抽出残渣は燃焼法で放射能を測定した。

10日後以降の試料

茎葉部および根部は図1のフローシートに従って分析した。すなわち、試料はそれぞれアセトニトリル:水(80:20)を加え、ホモジナイズおよび濾過、続いてアセトニトリル(ACN)で還流後濾過して残渣画分と抽出液画分に分離した。抽出液はアセトニトリルを留去し、ジクロロメタン(DCM)、続いて酢酸エチルで抽出した(ジクロロメタン1画分)。水相(水相

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

— 1 画分) は更に, pHを変えてACN/DCM で抽出したのち, β -グルコシダーゼで酵素加水分解, 続いて 2 N 塩酸水溶液中で 1 時間還流, 放冷したのち, それぞれACN/DCM で抽出した。抽出液, 各有機溶媒画分, 水相画分, および抽出残渣を放射能測定するとともに有機溶媒画分をTLCで代謝物分析した。抽出残渣は, アセトニトリル:水で還流, さらに 0.1N 塩酸で還流して洗浄した。得られた精製植物繊維を酸で加熱加水分解したのち, フェニルヒドラジンと反応させグルコースをグルコサゾンに誘導体化した。

⑤ 放射能測定

液体試料は直接, 抽出残渣など固体試料は自動燃焼装置で酸化燃焼処理したのち, いずれも液体シンチレーション計測(LSC)法で ^{14}C -放射能を定量した。HPLCでは放射能検出器を用いるかフラクションコレクターで分取後LSCで ^{14}C を定量した。TLC上の放射能はイメージスキャナーで定量した。

⑥ 代謝物の検出, 定量および同定

代謝物はTLC およびHPLC上での合成標品 ()とのコクロマトグラフィーで同定した。TLC プレート上の放射性代謝物等はオートラジオグラフィー法で検出し, 非放射性物質はUV照射によるクエンチングで検出した。また分析に十分な量を得られた代謝物については, LC-MS を用いて質量分析を行ない, 合成標品と比較して同定した。

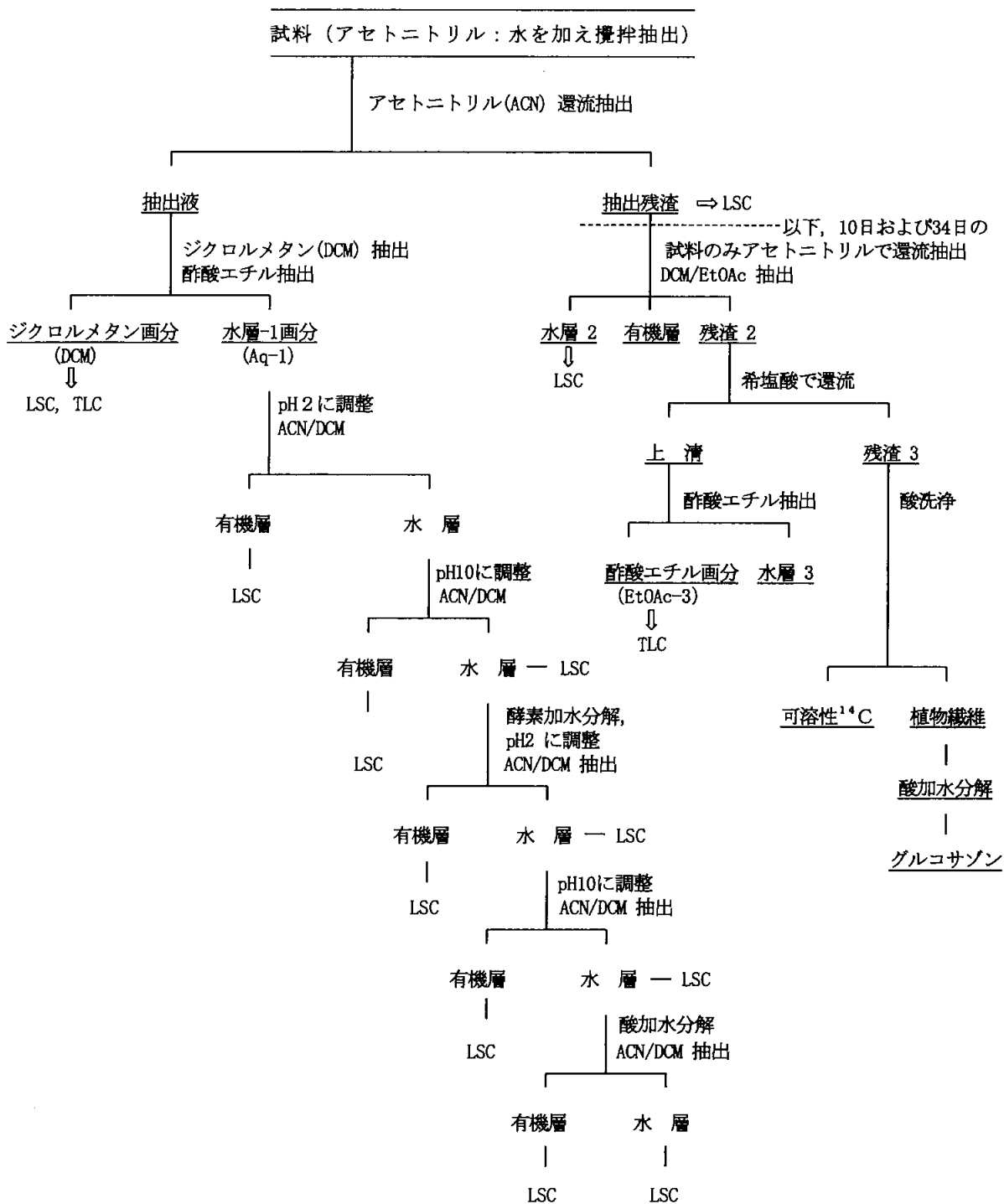


図 1 分析フローシート

結 果

0, 10, 24および48日後の総残留放射能 (TRR) はスピノシンA処理の葉で 0.333~38.939 ppm, 根で 0.177~3.517ppmであった。スピノシンD処理の葉では 0.298~20.341ppm, 根で 0.094 ~1.691ppmであった。残留放射能濃度は48日間で葉では1/70~1/100 に, 根では約1/20に減少した。残留放射能濃度低下の原因は作物の成長によるものである。

表2に示すように、48日後の試料を除き、葉、根いずれも有機溶媒抽出画分に大部分の放射能が分画された (TRRの50~99%)。水層画分の放射能は少量であった。(スピノシンA: TRRの0.1~28%, スピノシンD: TRRの1~38%)。48日後の試料では、抽出残渣画分の割合が他の試料に比較して増加 (38~50%) しており、これは、さらに分解が進行し、より極性で結合性の強い残留物の生成が示唆された。

表5に示すように抽出残渣の放射能を洗浄したところ大部分は植物繊維に存在し、天然の成分であるセルロース等まで変換されていることが示唆された。植物繊維を強酸で加水分解し、フェニルヒドラジンと反応させ、グルコサゾンの結晶を生成させ、¹⁴C濃度が低下しないことから¹⁴Cがスピノサドの炭素がセルロースの一部に取り込まれていることを確認した(表6)。

スピノシンAおよびスピノシンDはかぶの葉中で速やかに代謝され、10日後の試料ですでにTRRの2.1%および0.6%に減少した(表3)。根では土壌と葉により光の影響を受けないため48日後でもTRRの26.4%および19.2%が親化合物として検出された(表4)。

可食部である48日後の根部を分析したところ、スピノシンA処理試料からはスピノシンAがTRRの26.4%、
検出され、スピノシンD処理試料からはスピノシンDがTRRの19.4%、
検出された。その他に0.01ppm を超える未同定代謝物は
検出されなかった(表4)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 1 各試料中の残留総放射能

		スピノシン A	スピノシン D
		濃 度 (ppm) ^a	濃 度 (ppm) ^b
0日	葉	38.939	20.341
0日	根	3.527	1.691
10日	葉	21.638	12.594
10日	根	1.382	0.431
24日	葉	5.752	4.682
24日	根	0.384	0.212
48日	葉	0.333	0.298
48日	根	0.177	0.094

a: スピノシン A 換算濃度 (スピノシン A の比放射能 9124 dpm/ μ g から算出した。)

b: スピノシン D 換算濃度 (スピノシン D の比放射能 9479 dpm/ μ g から算出した。)

表 2 放射性残留物の分画

		スピノシン A			
		T R R (ppm)	ジクロルメタン %	水 層 %	抽出残渣 %
葉					
0日		38.939	99.0	0.1	0.8
10日後		21.638	69.9	13.6	16.5
24日後		5.752	50.6	20.5	28.9
48日後		0.333	22.5	27.9	49.6
根					
0日		3.527	96.5	0.2	3.3
10日後		1.382	62.3	6.3	31.4
24日後		0.384	52.1	13.8	34.1
48日後		0.177	52.5	10.8	36.7
		スピノシン D			
		T R R (ppm)	ジクロルメタン %	水 層 %	抽出残渣 %
葉					
0日		20.341	98.6	0.6	0.8
10日後		12.594	75.4	15.4	9.2
24日後		4.682	58.0	22.6	19.4
48日後		0.298	35.7	26.1	38.2
根					
0日		1.691	97.8	0.3	1.9
10日後		0.431	63.2	7.1	29.7
24日後		0.212	50.9	11.3	37.8
48日後		0.094	49.8	12.4	37.9

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表3 葉から抽出したジクロルメタン画分のTLC分析
(スピノシンA処理については抽出物を酸加水分解後の分析を併記した)

スピノシンA：葉

スピノシンD：葉

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表4 根から抽出したジクロルメタン画分のTLC分析
(スピノシンA処理については抽出物を酸加水分解後の分析を併記した)

スピノシンA：根

スピノシンD：根

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表5 徹底抽出後の抽出残渣(粗植物繊維)および精製植物繊維中¹⁴C残留量

日/試料	スピノシンA処理				スピノシンD処理			
	粗植物繊維		精製植物繊維		粗植物繊維		精製植物繊維	
	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm
10日/葉	2.7	0.590	2.0	0.438	1.9	0.237	1.3	0.168
10日/根	11.6	0.160	-	-	8.7	0.037	-	-
48日/葉	17.2	0.057	11.4	0.038	12.0	0.036	8.4	0.025
48日/根	12.8	0.023	9.5	0.017	14.1	0.013	10.8	0.010

表6 スピノシンAを処理10日後の葉から得た精製植物繊維と繊維を強酸加水分解後、フェニルヒドラジンと反応させて生成させたグルコサゾンの¹⁴C濃度の比較

精製植物繊維	スピノシンA処理		スピノシンD処理	
	グルコサゾン 理論値	グルコサゾン 実測値	グルコサゾン 理論値	グルコサゾン 実測値
DPM/g	DPM/g	DPM/g	DPM/g	DPM/g
84613	41515	42562	43708	21986

グルコサゾンの理論値は、ブドウ糖の分子量180とグルコサゾンの分子量358の比から繊維1gから1.988gのグルコサゾンが生成する(358/180=1.988)ことから精製植物繊維の¹⁴C濃度を1.988で除して算出した(84613/1.988 = 42562)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

ジクロルメタン抽出物
(67.8%, 14.679ppm)

シリカゲル
カラムクロマト

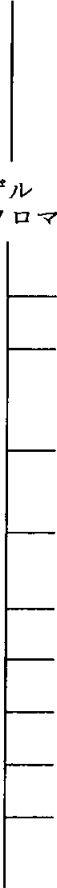


図2 スピノシンA処理10日後の葉部の詳細分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

(代 謝)

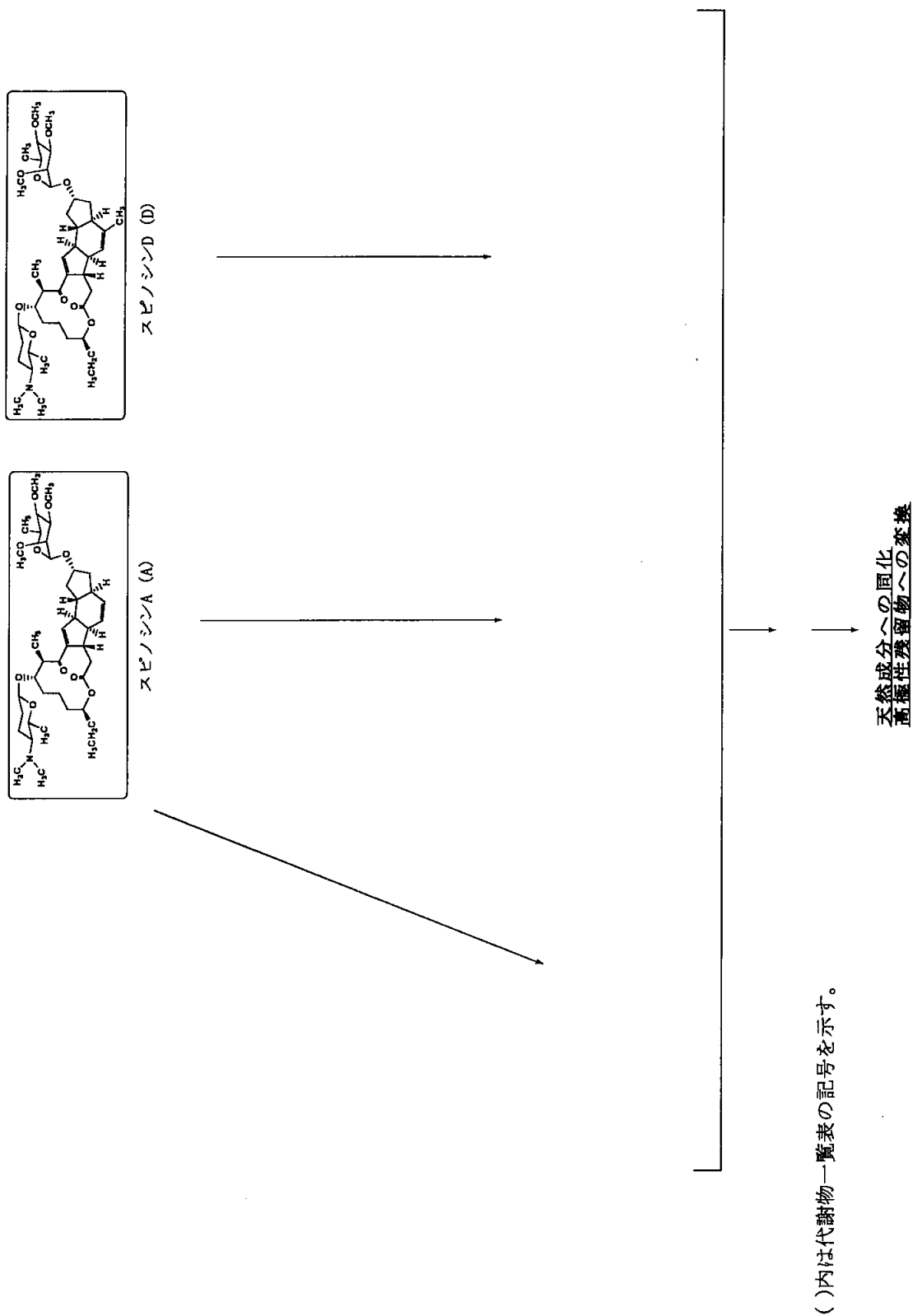


図2 茎葉処理後のカブにおけるスピロシノサドの主要代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

作物代謝 (4)

茎葉処理後のリンゴ果実における代謝運命

資料No. 57

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

茎葉処理後のスピノサドのリンゴ果実への吸収, 移行, 分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。あわせて光による分解の影響を調べた。

¹⁴C-標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル-
α-L-マンノピ^oラノシ^oオキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ-β-D-エリスロピ^oラノシ^oオキシ)-9-エチル-
2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-14-メチル-1H-as-インダ^oゼノ
[3, 2-d]オキサシクロテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[¹⁴C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル-α-L-
マンノピ^oラノシ^oオキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ-β-D-エリスロピ^oラノシ^oオキシ)-9-エチル-
2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oゼノ
[3, 2-d]オキサシクロテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[¹⁴C] スピノシンA

[¹⁴C] スピノシンD

比放射能

放射化学的純度

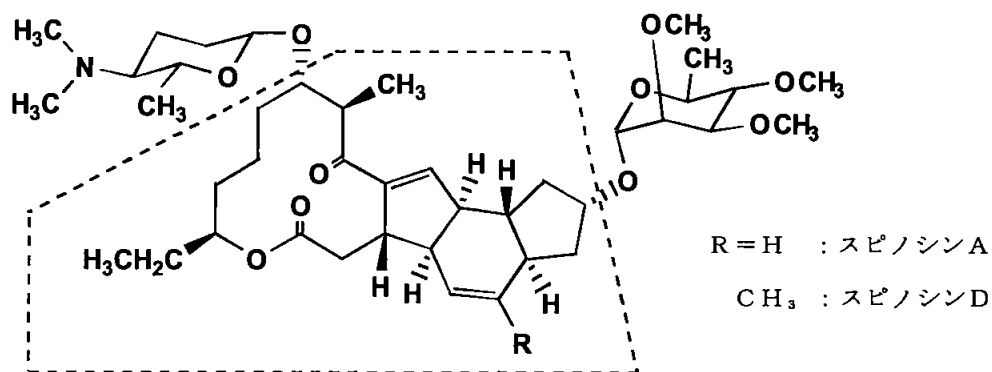
標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

構造式



供試作物

リンゴ（品種：レッド デリシャス：矮性）を使用した。

土 壤

下記特性の土壌を使用した。

pH (H ₂ O)	6.0
有機炭素	3.19%
陽イオン交換用量	19.3 me/100g
土性分類	SC(砂質埴土)

作物調製場所

米国California州 Watsonville
Plant Science 社

薬剤散布日

1993年 8月16日

最終収穫日

1993年 9月27日

処理区的设计

80~100 個の果実をつけた木3本を選び1つをスピノシンA用、他の1つをスピノシンD用とし、残りの1つを無処理対照区とした。木のまわりには板で塀を作り、内側にポリエチレンの膜を貼り、上部は黒色のポリエチレン製屋根で覆った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

方 法

① 施 用

リンゴの木1本あたりスピノシンAについては予定慣行施用量(500g a. i./ha)の1.5倍に相当する量を、スピノシンDについては2.3倍に相当する量を乳剤として散布した。移行性を調べるために1本の枝には散布時にビニール袋で覆って、散布液がかからないようにした。また光による分解の影響を調べるため、散布後1本の枝を白色のビニール袋で覆って栽培した。

	スピノシンA	スピノシンD
濃 度	885 ppm	349 ppm
比放射能		
散布量	1500 ml	1500 ml

② 栽培条件および気象データ

42mmの降雨以外に特に灌水しなかった。最高・最低温度、降水量、湿度および照度を測定した。

③ 試料採取

処理部試料(NORと略す)は処理当日、施用3, 7, 14, 28および42日後に、光分解対照用試料(PHOTOと略す)は処理3および7日後に、移行性検討試料(TRANSと略す)は処理当日および42日後に果実を採取した。

④ 分 析

採取したリンゴ果実を図1のフローシートに従って分析した。まず果実をアセトニトリル/メタノール/2%酢酸アンモニウム水溶液(4:4:1)、続いてヘキサン/ジクロロメタン(1:1)およびメタノールで洗浄した。洗浄後のリンゴは果皮をむいた。果皮は液体窒素で凍結して粉碎した。果肉には少量の水を加えブレンダー用いて濃厚な懸濁液にした。次に粉碎した果皮にアセトニトリルを加えブレンダーで磨砕したのち、丸底フラスコに移して還流抽出した。放冷後濾過し、濾液と抽出残渣を得た。抽出残渣はフード内で風乾した。各画分の放射能をLSCで測定した。洗液およびシリカゲル Sep-pakで分画したアセトニトリル抽出画分をTLCおよびHPLCで分析した。

スピノシンA処理14日および42日後のアセトニトリル還流抽出後の残渣については図1~10のフローシートに従いがい、さらに詳細な分析を行った。すなわちアセトニトリル/水(50/50)を加え1時間攪拌後濾過した。濾液はジクロロメタンおよび酢酸エチルで液-液分配した。残渣には1N塩酸を加え1時間還流後放冷、中和、遠心分離、さらにメタノールを加えて濾過して緩和条件での酸抽出を行った。メタノールを含む濾液をメタノール留去後、0.1N塩酸抽出上清と合して酸抽出画分とし酢酸エチルで液-液分配して分画した。酢酸エチル画分に十分な放

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

射能が検出されたNOR試料についてはTLCおよびHPLCで分析した。NOR試料の水層については濃縮、遠心分離後の上清をC₁₈ Sep-pak カラムにより分画して、その性質を検討した。酸抽出後の残渣には0.1N水酸化ナトリウムを加え18時間加温（37℃）抽出した。濾液はジクロルメタンおよび酢酸エチルで液-液分配した。残渣にはさらに1N水酸化ナトリウムを加え1時間還流抽出したのち濾液を酢酸エチルで液-液分配した。また別途、酵素（セルラーゼおよびペクチナーゼ）処理により組織結合性の放射能の特徴を調べた。

果 肉

果肉の懸濁液にアセトニトリル/水（80/20）を加えて磨砕後濾過した。残渣にはアセトニトリルを加え還流抽出した。残渣はさらにアセトニトリル/水（80/20）で抽出後ジクロルメタンおよび酢酸エチルで抽出した。有機層は合して濃縮後TLCで分析した。水層はフェニルヒドラジンと反応させてグルコサゾン合成し、放射能およびマススペクトルを測定して¹⁴Cの天然成分への取り込みについて検討した。

洗 液

洗液は2分割し、半分は濃縮しそのままTLCで分析した。残りの半分は酸加水分解したのち、酢酸エチル抽出して濃縮後TLCで分析した。

結 果

NOR（処理部）試料の残留総放射能（TRR）はスピノシンA処理試料で1.251~3.226ppm、スピノシンD処理試料で0.513~1.209ppmであった。42日後の試料では0日後の試料の濃度の約半分に減少した（表1）。果実の肥大が濃度減少の要因と考えられる。スピノシンA処理、スピノシンD処理いずれにおいても残留の主要部分は果実の洗液であった（60~90%）（表1）。果皮および果肉部分の放射能は少量であった（それぞれ3~30%および1~10%）（表1）。この結果から放射性残留物の大部分は有機溶媒抽出性の物質として果実表面に留まることを示唆している。洗液のTLCおよびHPLCの分析結果からスピノシンA、スピノシンDいずれも速やかに代謝されることが示唆された。3日後の試料でスピノシンAはTRRの33.4および34.2%、スピノシンDは10.2および9.3%であった（表5）。

0日以外のNOR試料をさらに詳細に分析したところ残留物の主要部分は複数の極性物質であることが示唆された。（参考資料参照）

図11に14日後の洗液試料の詳細分析を示した。シリカゲルカラム分画のTLCで明確なスポットの単離を試みたが、

酸加水分解の結果（図10）から14日後の試料では加水分解前の

図1~10に示すような、抽出分画、抽出残渣部分の酸処理、アルカリ処理の結果より、洗浄後の作物の残留物の多くは、複数の水溶性物質もしくは非抽出性の物質であることが示唆され、それぞれの成分はTRRの10%を超えないことが確認された。

42日後の果実については、糖への¹⁴Cの取り込み確認するため、ジクロロメタン抽出後の水層にフェニルヒドラジンを反応させ、オサゾンを生じさせ、結晶中の放射能を測定した。スピノシンA処理果実でTRRの1.0% (図5)、スピノシンD処理果実でTRRの1.2% (図9)と少量であったが、放射能が確認された。オサゾンに放射能が検出されたということはアグリコン部分の炭素が糖の一部へ取り込まれたと考えられる。

光分解対照用 (PHOTO) 試料を分析したところ、洗液の放射能はNOR試料より10~15%高い残留を示した (表1および2の比較)。またHPLCおよびTLC分析により代謝物の生成も少ないことが判明した (表5および6の比較)。この結果から光分解がスピノサドの分解に大きな影響を与えることが示唆される。

移行性検討用 (TRANS) 試料から検出された放射能は42日後で洗液、果皮および果肉にそれぞれTRR (0.017ppm) の11, 25および65%であった (表3)。処理部から少量の移行が観察された。

スピノサドの分解には光分解の大きい。スピノサドは処理部から他の部分へ少量であるが移行する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 1 処理部試料 (NOR) における放射能の分布

スピノシンA処理群

日	計		洗液		果皮		果肉	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	2.694	100.0	2.555	94.8	0.115	4.3	0.024	0.9
3	3.226	100.0	2.775	86.0	0.425	13.2	0.026	0.8
7	2.290	100.0	1.858	81.2	0.397	17.3	0.035	1.5
14	1.845	100.0	1.471	79.8	0.318	17.2	0.056	3.0
28	1.570	100.0	0.851	54.2	0.402	25.6	0.317	20.2
42	1.251	99.8	0.801	63.9	0.331	26.4	0.119	9.5

スピノシンD処理群

日	計		洗液		果皮		果肉	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.981	100.0	0.908	92.5	0.031	3.2	0.042	4.3
3	1.158	100.1	0.883	76.3	0.248	21.4	0.027	2.4
7	1.209	100.0	0.894	73.9	0.190	15.7	0.125	10.4
14	0.842	100.0	0.592	70.3	0.217	25.8	0.033	3.9
28	0.741	100.0	0.438	59.1	0.254	34.3	0.049	6.6
42	0.513	100.0	0.301	58.6	0.168	32.8	0.044	8.6

TRR: Total Radioactive Residue (試料中残留総放射能)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表2 光分解対照用試料 (PHOTO) における放射能の分布

スピノシンA処理群

日	計		洗液		果皮		果肉	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
3	1.768	100.1	1.681	95.2	0.079	4.5	0.008	0.4
7	1.873	100.1	1.681	89.8	0.172	9.2	0.020	1.1

スピノシンD処理群

日	計		洗液		果皮		果肉	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
3	0.840	99.9	0.805	95.8	0.027	3.2	0.008	0.9
7	0.828	99.9	0.747	90.1	0.070	8.5	0.011	1.3

TRR: Total Radioactive Residue (試料中総残留放射能)

表3 移行性検討用試料 (TRANS) における放射能の分布

日	計		洗液		果皮		果肉	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.002	100.1	0.002	100.1	0.000	0.0	0.000	0.0
42	0.017	99.9	0.002	10.7	0.004	24.5	0.011	64.7

TRR: Total Radioactive Residue (試料中総残留放射能)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表4 処理部試料（NOR）の果皮および果肉中残留放射能の分画

スピノシンA処理群—果皮

日	アセトリル抽出		抽出残渣	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.086	3.2	0.027	1.0
3	0.210	6.5	0.184	5.7
14	0.149	8.1	0.172	9.3
42	0.134	10.7	0.139	11.1

スピノシンA処理群—果肉

日	有機層		水層		抽出残渣	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.016	0.6	0.003	0.1	0.000	0.0
3	0.010	0.3	0.010	0.3	0.003	0.1
14	0.011	0.6	0.035	1.9	0.007	0.4
42	0.021	1.7	0.081	6.5	0.008	0.6

スピノシンD処理群—果皮

日	アセトリル抽出		抽出残渣	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.021	2.1	0.005	0.5
3	0.130	11.2	0.090	7.8
14	0.080	9.5	0.104	12.4
42	0.072	14.1	0.066	12.8

スピノシンD処理群—果肉

日	有機層		水層		抽出残渣	
	ppm	% TRR	ppm	% TRR	ppm	% TRR
0	0.034	3.5	0.000	0.0	0.000	0.0
3	0.029	2.5	0.005	0.4	0.003	0.3
14	0.013	1.6	0.022	2.6	0.005	0.6
42	0.012	2.4	0.033	6.5	0.004	0.7

TRR: Total Radioactive Residue (試料中総残留放射能) の略

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表5 処理部試料（NOR）から得た洗液中成分の分析^a

スピノシンA処理群

スピノシンD処理群

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 6 光分解対照試料 (PHOTO) から得た洗液中成分の分析

スピノシン A 処理群

スピノシン D 処理群

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

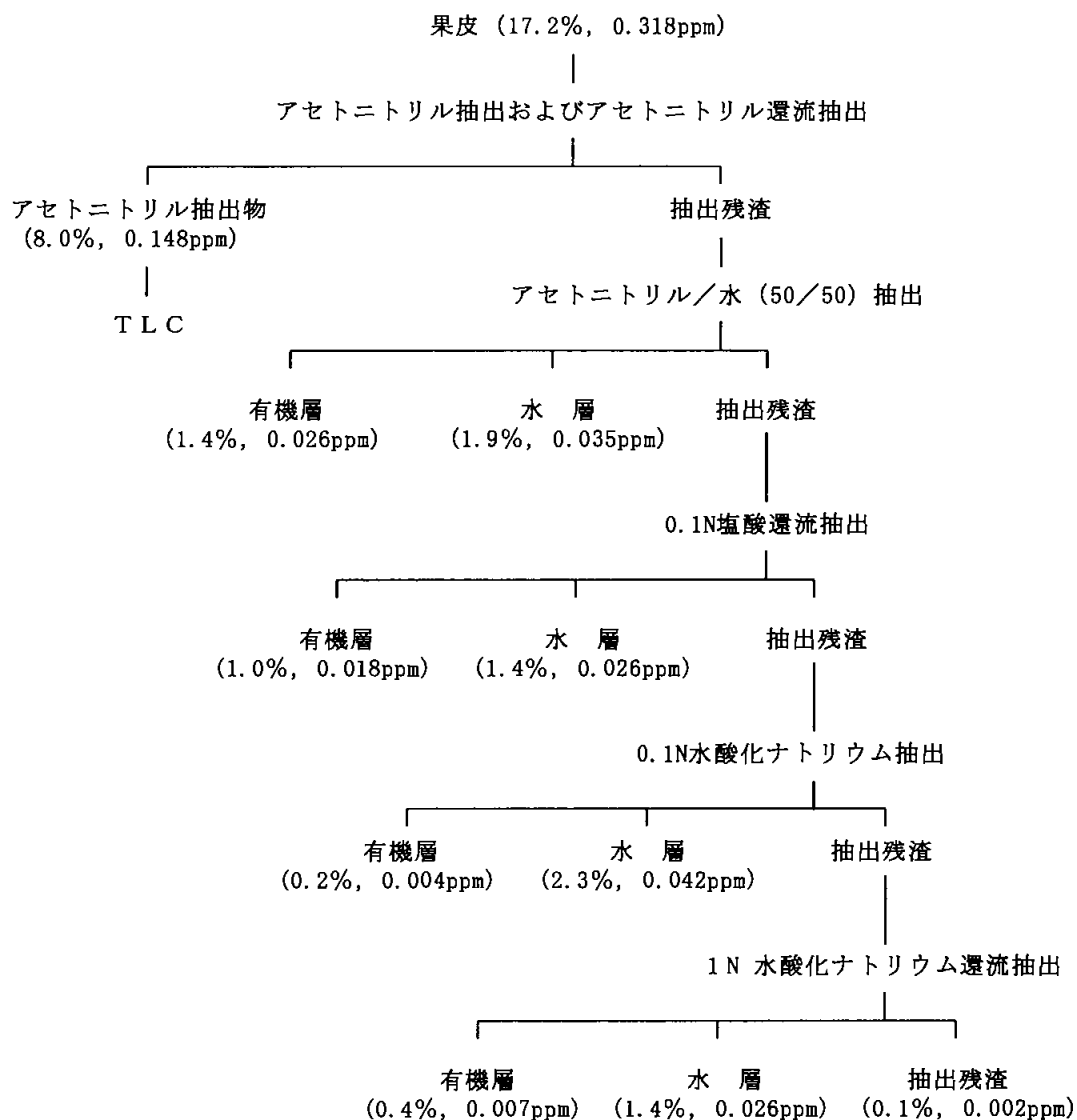


図1 スピノシンA処理14日後の処理群 (NOR) 果皮の分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

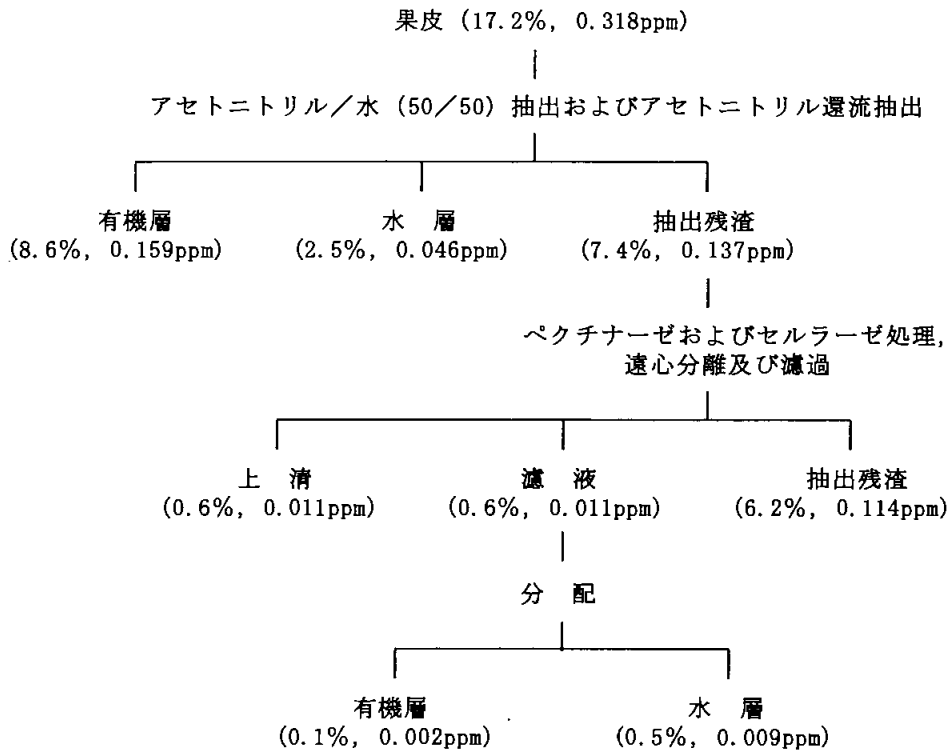


図2 スピノサドA処理14日後の処理部 (NOR) 果皮の酵素処理分析

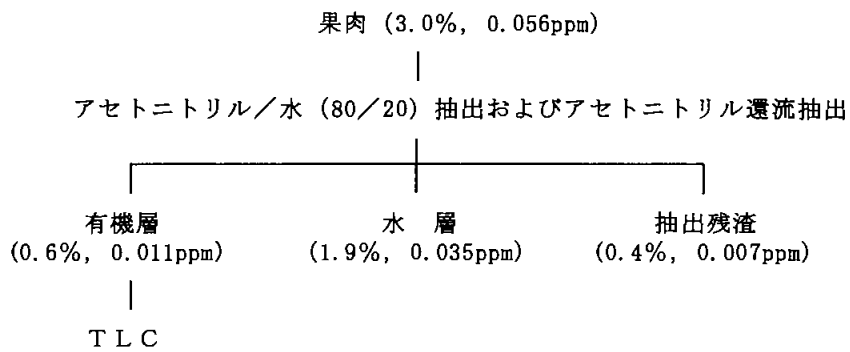
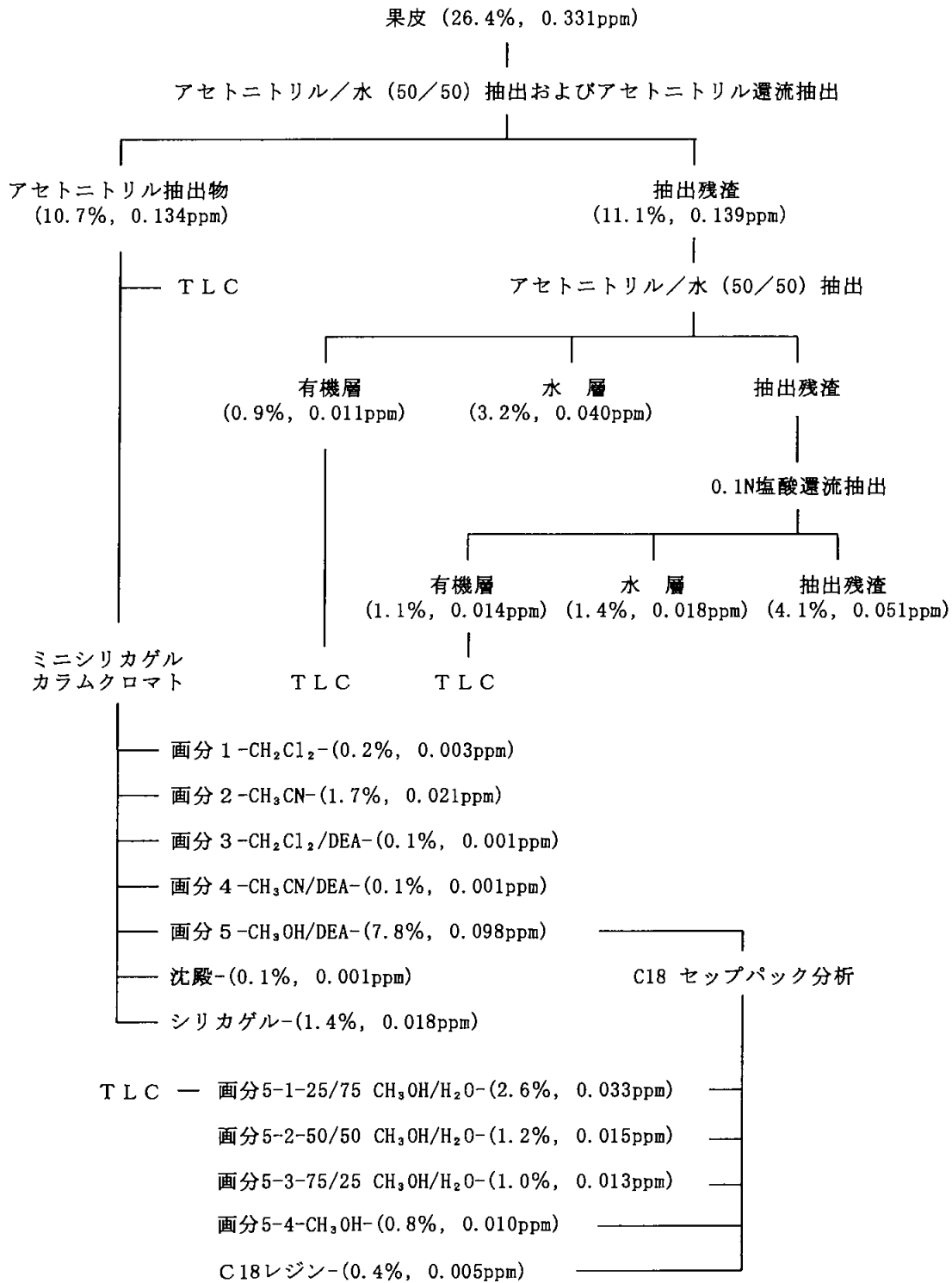


図3 スピノシンA処理14日後の処理部 (NOR) 果実の分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

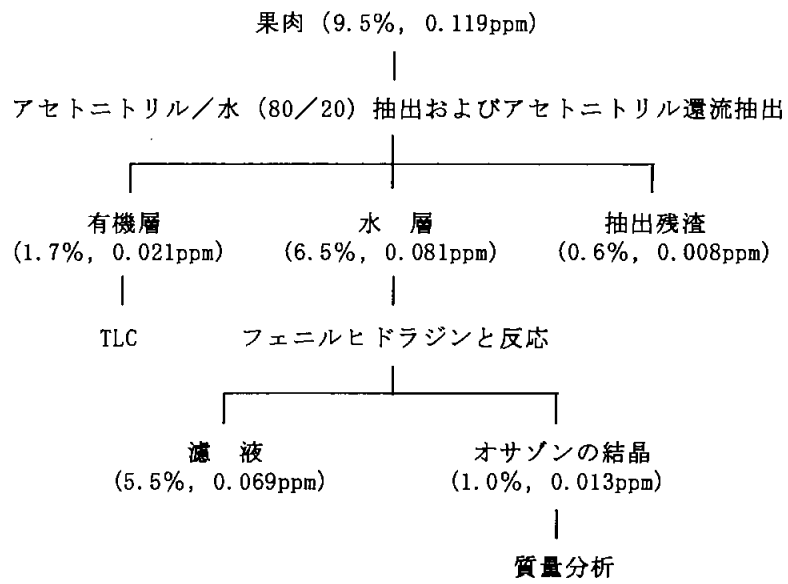
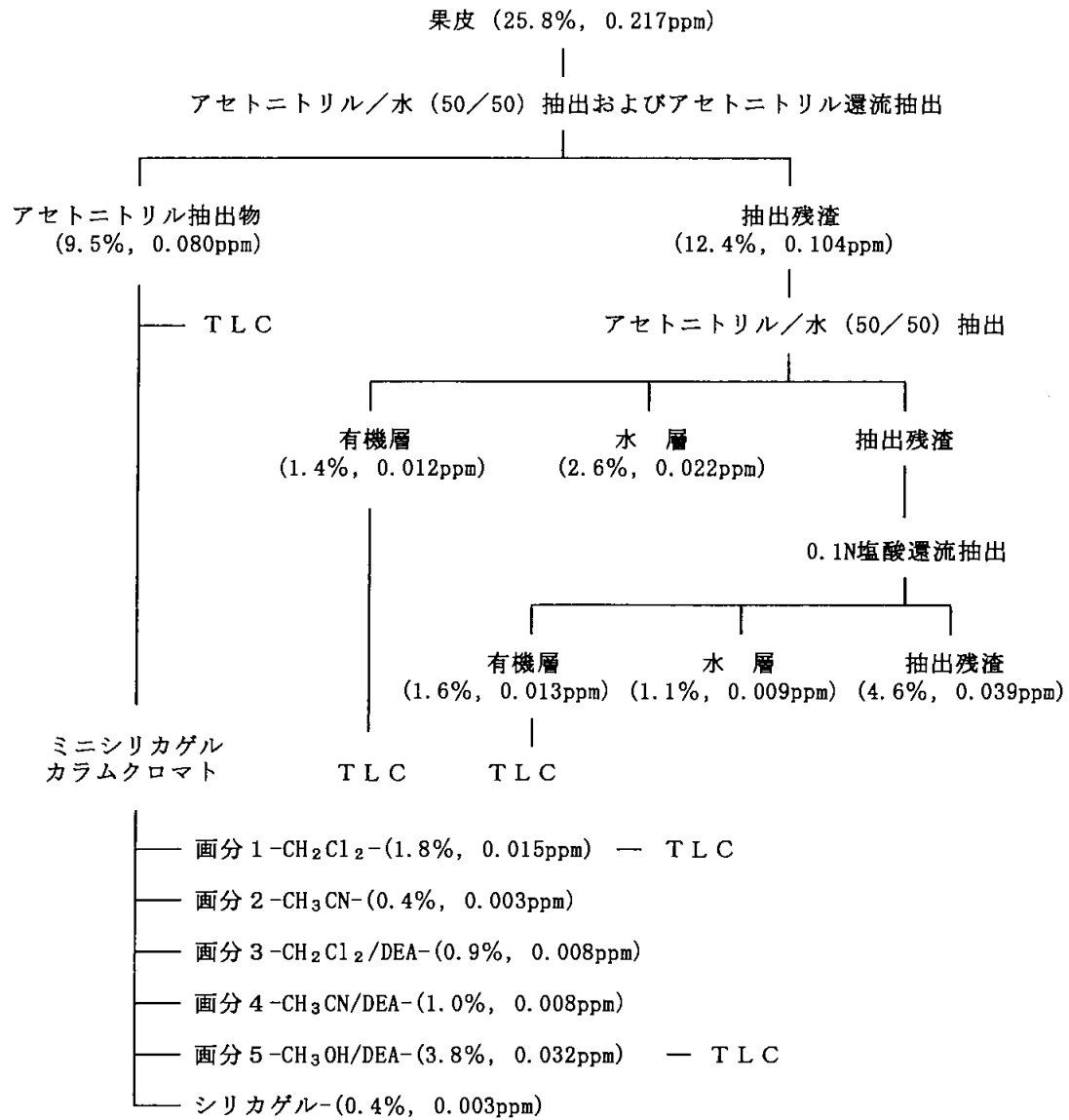


図5 スピノシンA処理42日後の処理部 (NOR) 果肉の分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。



DEA: 0.5% ジエチルアミン

図6 スピノシンD処理14日後の処理部 (NOR) 果皮の分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

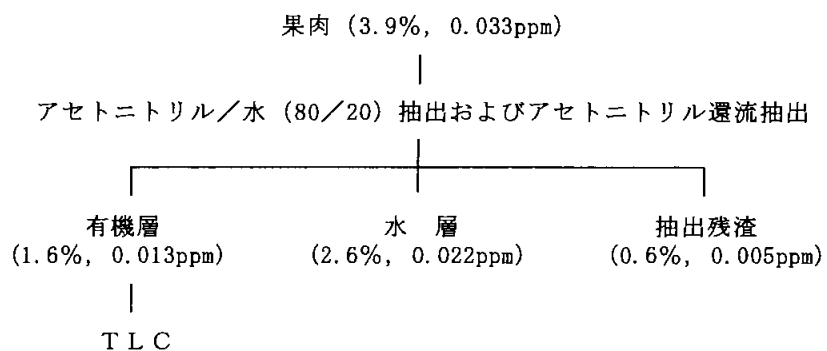


図7 スピノシンD処理14日後の処理部 (NOR) 果実の分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

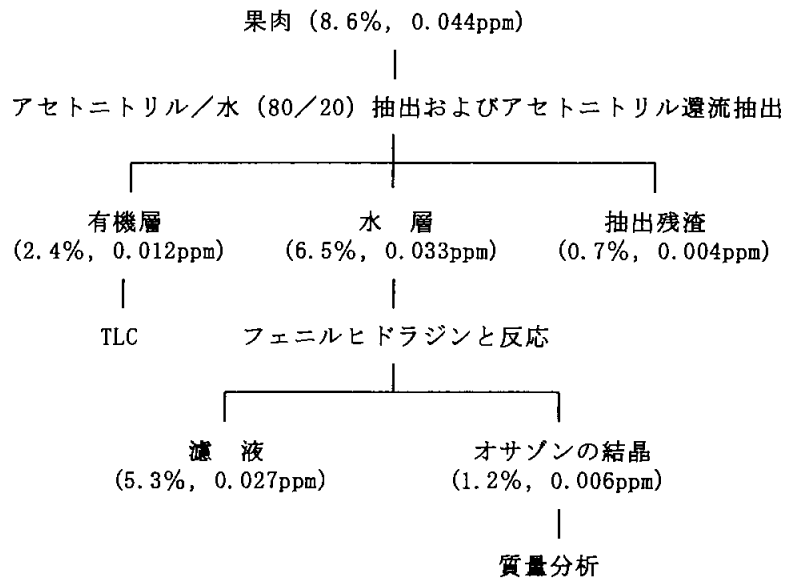


図9 スピノシンD処理42日後の処理部 (NOR) 果実の分析

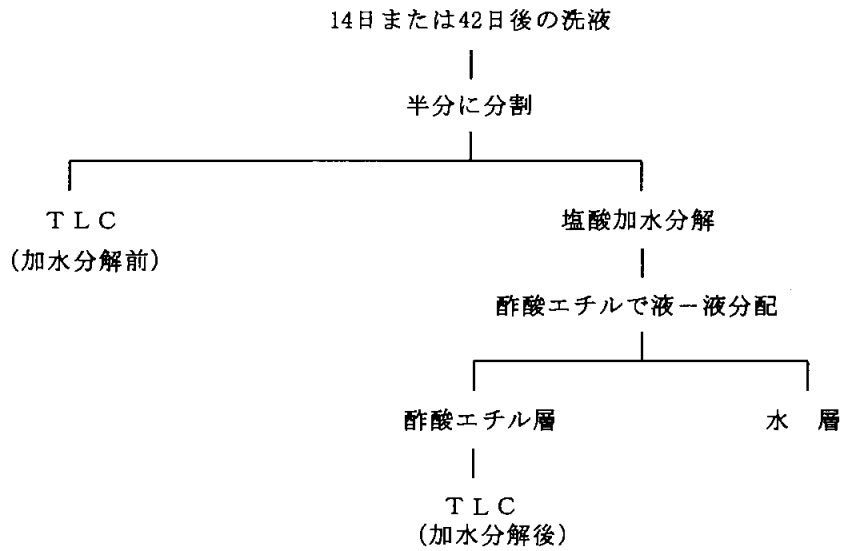


図10 スピノシンA処理14および42日後の酸加水分解による分析法

アセトニトリル抽出物
(10.7%, 0.134ppm)

シリカゲル
カラムクロマト

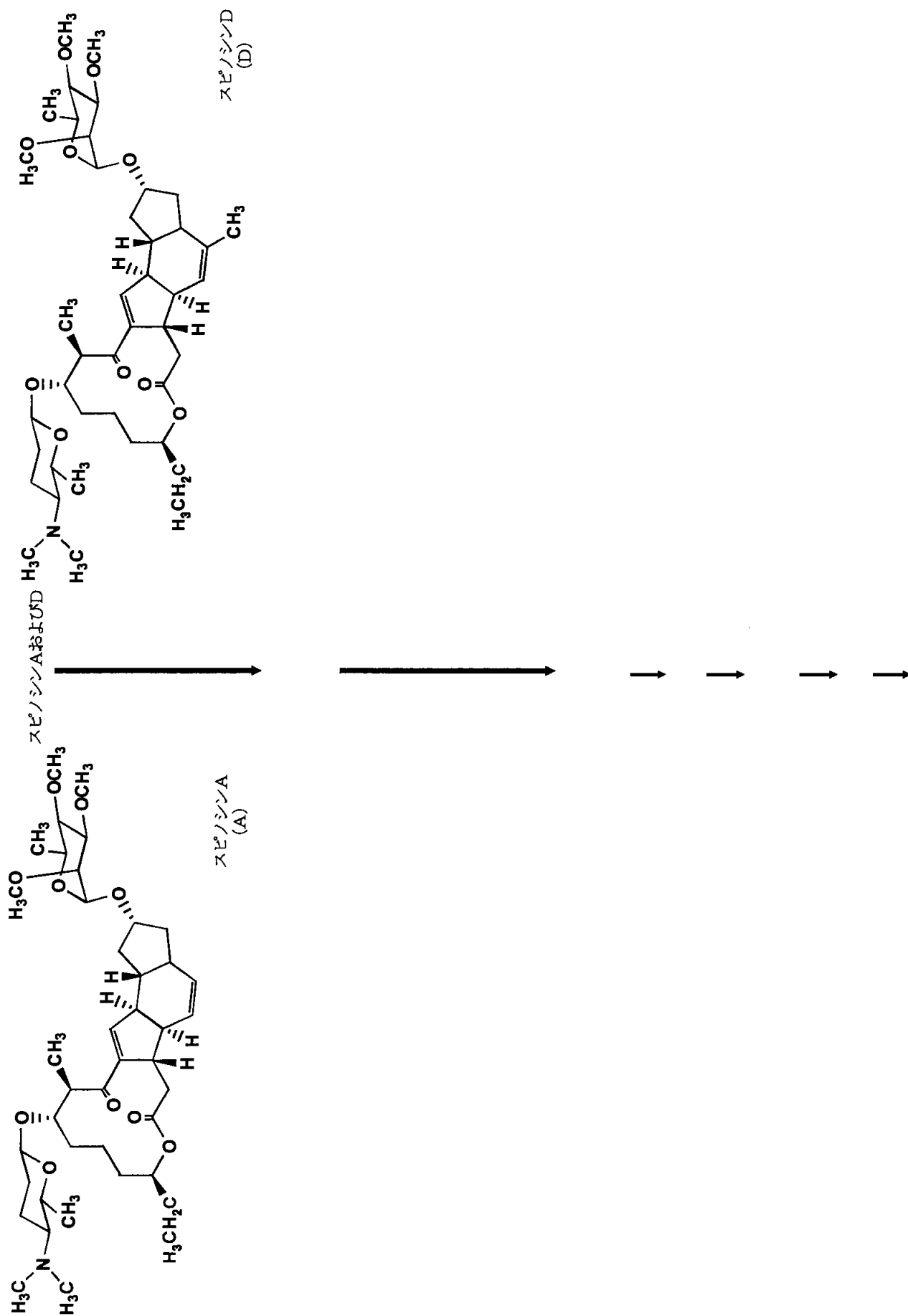
—	画分 1 - hex/DEA, hex/tol/DEA (0.5%, 0.0009ppm)
—	画分 2 - hex/tol/DEA, tol/DEA (8.4%, 0.155ppm) →TLC zone8 (7.5%, 0.138ppm) →MS (ストノシンA)
—	画分 3 - tol/DEA, tol/EtOAc/DEA (3.3%, 0.061ppm) →TLC zone11 (2.2%, 0.041ppm) →MS (ストノシンA)
—	画分 4 - tol/EtOAc/DEA (3.0%, 0.055ppm)
—	画分 5 - tol/EtOAc/DEA (1.7%, 0.031ppm) →TLC (画分4+5) zone7 (1.7%, 0.031ppm) →MS (ストノシンB)
—	画分 6 - tol/EtOAc/DEA, EtOAc/DEA (7.1%, 0.131ppm) →TLC zone6 (0.9%, 0.017ppm) →MS (2個の水酸基付加体)
—	画分 7 - EtOAc/DEA, EtOAc/CH ₃ OH/H ₂ O/DEA (2.1%, 0.039ppm)
—	画分 8 - EtOAc/CH ₃ OH/H ₂ O/DEA (10.0%, 0.185ppm)
—	画分 9 - EtOAc/CH ₃ OH/H ₂ O/DEA, CH ₃ OH/H ₂ O/DEA (6.7%, 0.124ppm)
—	画分 10 - CH ₃ OH/H ₂ O/DEA (21.1%, 0.389ppm)
—	画分 11 - CH ₃ OH/H ₂ O/DEA, CH ₃ OH/EtOAc (3.6%, 0.066ppm)
—	画分 12 - CH ₃ OH/EtOAc (6.5%, 0.120ppm)
—	画分 13 - CH ₃ OH/EtOAc (1.0%, 0.018ppm)
—	シリカゲル - (3.7%, 0.068ppm)

Hex: ヘキサン
tol: トルエン
DEA: ジエチルアミン
EtOAc: 酢酸エチル

図11 スピノシンA処理14日後の処理部(NOR)洗浄液の詳細分析

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

図11 散布処理後のリンゴ果実におけるスピノサドの主要代謝経路



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

作物代謝 (5)

茎葉処理後のリンゴの葉における代謝運命

資料No. 58

試験機関:

報告書作成年: 1995年

試験目的

茎葉施用後のスピノサドのリンゴの葉への吸収, 移行, 分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。あわせて光による分解の影響を調べた。

^{14}C -標識化合物

化学名

[^{14}C] スピノシンA

(2R, 3aR, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピ^oラノシ^oキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラノシ^oキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-14-メチル-1H-as-インダ^oセノ[3, 2-d]チオシ^oクロ^oテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[^{14}C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンピ^oラノシ^oキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oキシ- β -D-エリスロピ^oラノシ^oキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカヒト^oロ-4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oセノ[3, 2-d]チオシ^oクロ^oテ^oシン-7, 15-ジ^oオン

[^{14}C] スピノシンA

[^{14}C] スピノシンD

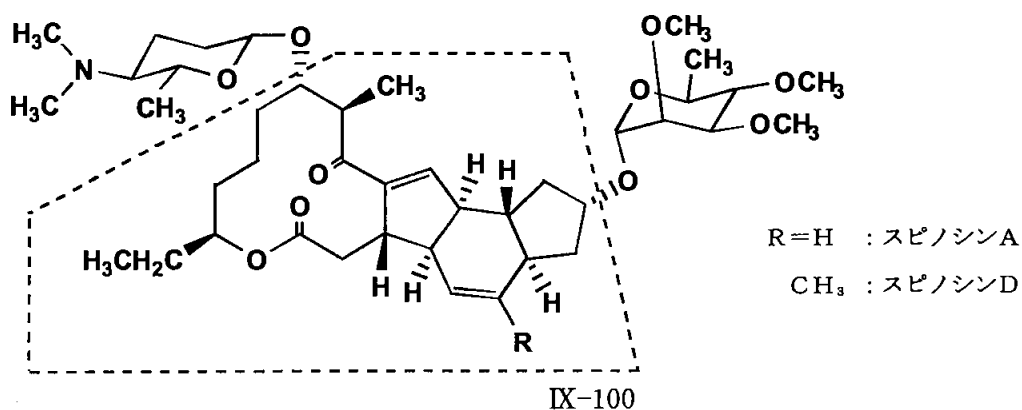
比放射能

放射化学的純度

標識位置 点線内の炭素原子を均一に ^{14}C で標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

供試作物

リンゴ（品種：レッド デリシャス：矮性）を使用した。

土 壤

下記特性の土壌を使用した。

pH	6.0
有機炭素	3.19%
陽イオン交換用量	19.3 me/100g
土性分類	SC (砂質埴土)

作物調製場所

米国 California州 Watsonville
Plant Science 社

薬剤散布日

1993年 8月16日

最終収穫日

1993年 9月13日

処理区的设计

80~100 個の果実をつけた木 3本を選び 1つをスピノシンA用、他の 1つをスピノシンD用とし、残りの 1つを無処理対照区とした。木のまわりには板で塀を作り、内側にポリエチレンの膜を貼り、上部は黒色のポリエチレン製屋根で覆った。

方 法

① 施 用

リンゴの木 1本あたりスピノシンAについては予定慣行施用量 (500g a.i./ha) の 1.5倍に相当する量を、スピノシンDについては 2.3倍に相当する量を乳剤として散布した。移行性を調べるために 1本の枝には散布時にビニール袋で覆って、散布液がかからないようにした。また光による分解の影響を調べるため、散布後 1本の枝を白色のビニール袋で覆って栽培した。

	スピノシンA	スピノシンD
濃 度	885 ppm	349 ppm
比放射能		
散布量	1500 ml	1500 ml

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

② 栽培条件および気象データ

42mmの降雨以外に特に灌水しなかった。最高・最低温度、降水量、湿度および照度を測定した。

③ 試料採取

処理部試料（NORと略す）および移行性検討試料（TRANSと略す）は施用当日、施用3、7、10および28日後に、光分解対照用試料（PHOTOと略す）は施用3および7日後に葉を採取した。

④ 分 析

採取した葉を図1のフローシートに従って分析した。まず葉をアセトニトリル/メタノール/2%酢酸アンモニウム水溶液（4：4：1）、続いてヘキサン/ジクロロメタン（1：1）およびメタノールで洗浄した。次に葉を細断したのちアセトニトリルを加えブレンダーで磨砕したのち、丸底フラスコに移して還流抽出した。放冷後濾過し、濾液と抽出残渣を得た。抽出残渣はフード内で風乾した。各画分の放射能をLSCで測定した。洗液およびシリカゲルSep-pakで分画したアセトニトリル抽出画分をTLCおよびHPLCで分析した。

スピノシンA処理3日および28日後のアセトニトリル還流抽出後の残渣については図2のフローシートに従い、さらに詳細な分析を行った。すなわち0.1N塩酸を加え1時間還流後放冷、中和、遠心分離、さらにメタノールを加えて濾過して緩和条件での酸抽出を行った。メタノールを含む濾液をメタノール留去後、0.1N塩酸抽出上清と合して酸抽出画分とし酢酸エチルで液-液分配して分画した。酢酸エチル画分に十分な放射能が検出されたNOR試料についてはTLCおよびHPLCで分析した。NOR試料の水層については濃縮、遠心分離後の上清を

カラムにより分画して、その性質を検討した。酸抽出後の残渣は硫酸加水分解したのちフェニルヒドラジンと反応させてグルコサゾン合成して¹⁴Cの天然成分への取り込みについて検討した。

また洗液およびアセトニトリル抽出画分については1N塩酸による加水分解（65°C、30分間）を行い、抱合体の生成について検討した。

代謝物の構造はスピノシンA及びD処理3日後のNOR試料から単離した試料をLC/MS/MS*で分析して同定した。

* 質量分析計を2台連結した液体クロマトグラフィー質量分析計

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

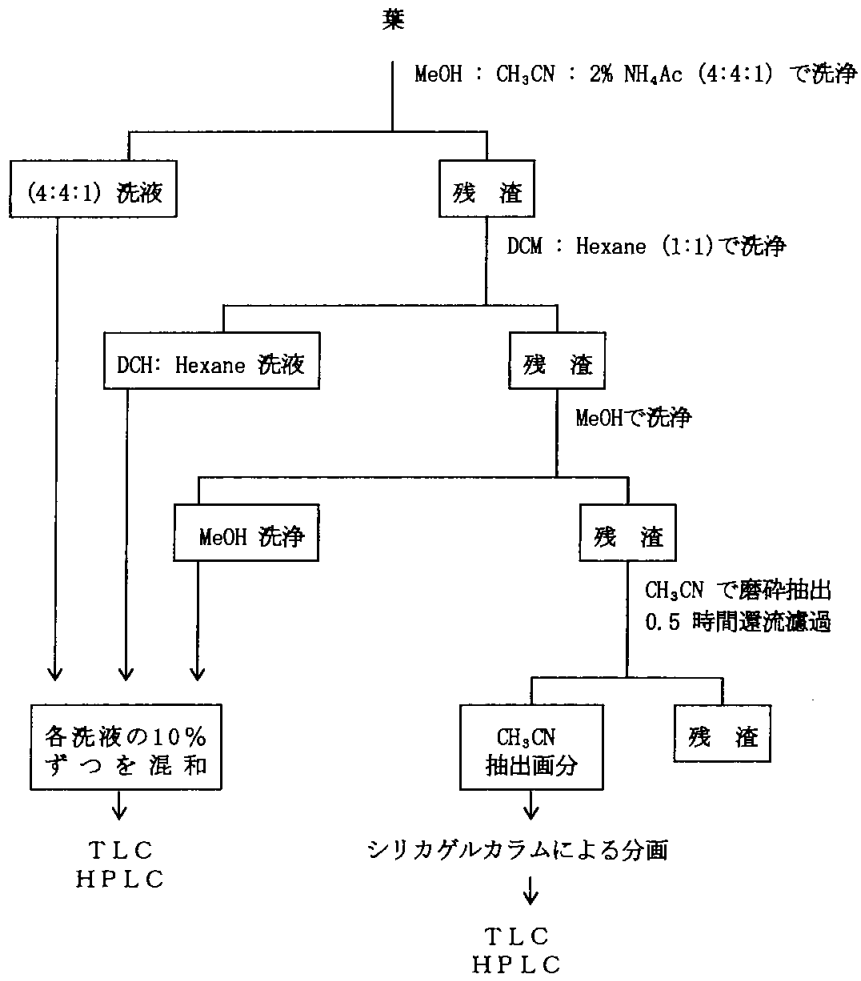


図1

スピノシンA処理3および28日後のアセトニトリル還流抽出残渣

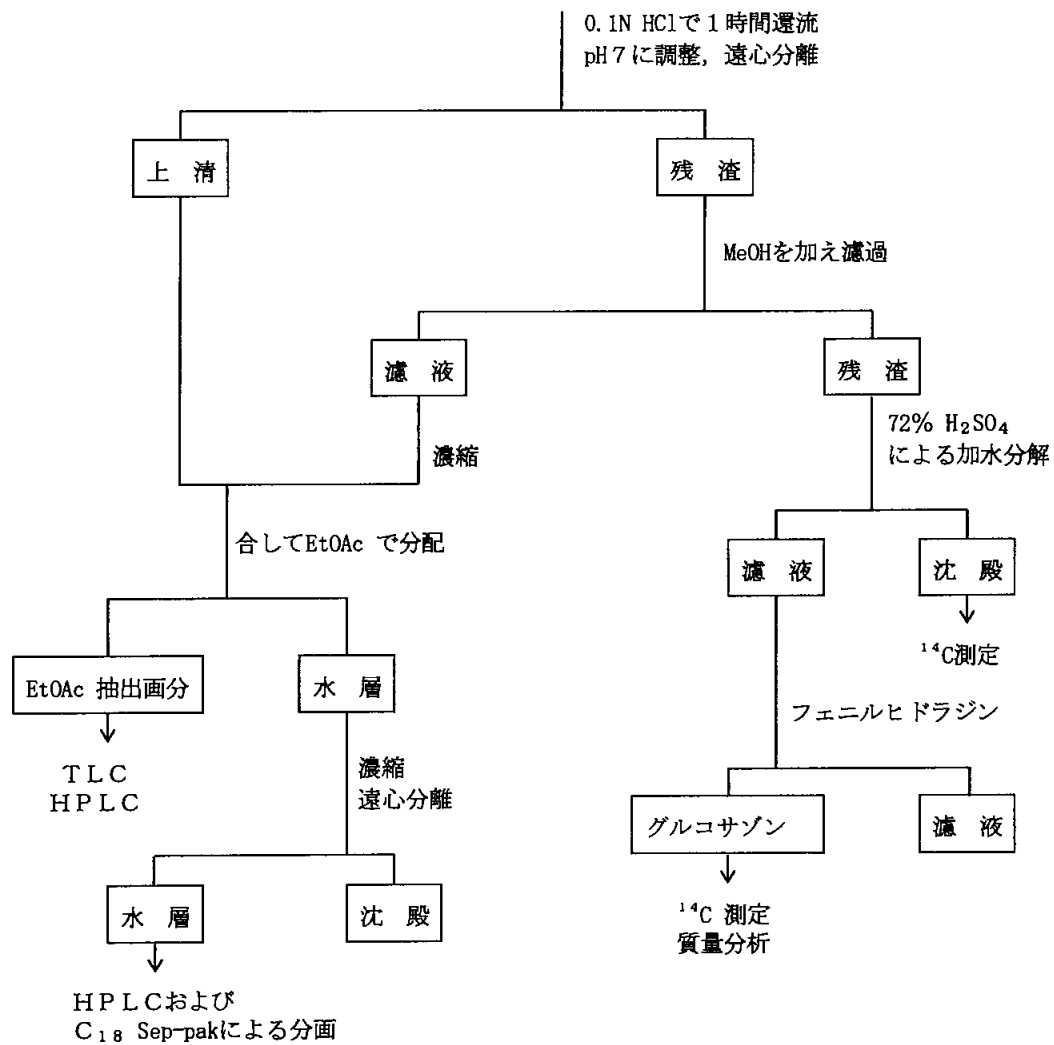


図 2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

結 果

0日のNOR（処理部）試料の残留総放射能（TRR）はスピノシンAおよびスピノシンD（処理試料）でそれぞれ約217ppmおよび約89ppmであった（表1）。28日後の試料では128ppmおよび43ppmと低値であったが、この期間葉の成長および風雨の影響がなかったことから試料間の変動によるものと考えられる。処理直後の試料ではTRRの98%が葉面洗液に回収されたが、それ以後の試料ではTRRに占める洗液の割合は減少し、28日後では約60%であった。これに伴ない、アセトニトリル抽出画分および非抽出性の放射性残留物の割合が増えた（表1）。

光分解対照用試料（PHOTO）では7日目までTRRの97%が洗液に回収された。移行性検討用試料（TRANS）中のTRRは徐々に増加し28日後に0.8ppm検出された（表1）。

NOR試料の洗液を分析したところ、スピノシンA、スピノシンDいずれも急速に分解されることが示唆された。表2に示すように7日目までにスピノシンAはTRRの10%に減少し、スピノシンDはすでに検出されなかった。これに対してPHOTO試料ではそれぞれTRRの78%および82%のスピノシンAおよびDが検出された。この結果から光分解がスピノシンの消失に重要であることが判明した。

表3および4にはシリカゲルカートリッジカラムで前処理した際のスピノシンAおよびDの分析結果を示した。スピノシンAおよびDの量は理論的には表2と同じ値になるはずだが、実測値は必ずしも一致しなかった。カラムの画分ではスピノシンAおよびDが含まれる画分より極性の高い画分（#5MeOH+DEA）の量が3日目以降、それぞれ28.8~37.9%および27.4~36.3%に増加した。この画分は表2ではスポット1（TLC原点）に相当する画分で、水溶性の高い極性物質と考えられる。

表5および6には洗浄後の葉に含まれるスピノシンAおよびDの分析結果を示した。葉に移行する親化合物はTRRの約1%以下の少量であった。

表7にLC/MS/MSで同定する過程における分画と代謝物の概要を示した。TRRの10%を超える成分はスピノシンAのみで、その他は含量でも5%を超えなかった。代謝反応は主に酸化と考えられ、複数の水酸化体が存在すると考えられた。

表8に示すように抽出残渣を酸処理したのち酢酸エチルで抽出を試みた。その結果、酢酸エチルで抽出可能な成分はTRRの2.4~3.8%と少量で、水溶性成分（水層）が28日でTRRの13.4~13.9%、不溶性成分（抽出残渣）がTRRの12.1~15.0%であった。

生体成分への¹⁴Cの取り込み確認するため、図2に示す方法で、セルロースを硫酸で加水分解し、生成するブドウ糖にフェニルヒドラジンを反応させ、オサゾンを生成させ、結晶中の放射能を測定した。表9に示すように3および28日後試料でTRRの13.4~16.2%の放射能が確認された。オサゾンに放射能が検出されたということはアグリコン部分の炭素がセルロースの一部へ取り込まれたと考えられる。酸加水分解の結果を表10に示す。3日後の試料では加水分解前の

以上から主な代謝物は

スピノサドは処理部から他の部分へ少量であるが移行する。スピノサドの分解には光分解の影響が大きい。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表1 リンゴ葉中放射能の分析

処理部試料 (NOR)

植物中総残留放射能 (TRR) に対する割合 (%)

	スピノシンA					スピノシンD				
	0日	3日後	7日後	10日後	28日後	0日	3日後	7日後	10日後	28日後
洗液1	89.8	70.5	67.5	54.0	43.0	87.5	63.1	58.2	48.8	39.4
洗液2	6.9	7.4	7.4	6.6	5.2	6.7	9.8	7.3	9.6	5.4
洗液3	2.0	7.8	10.2	11.2	12.8	3.9	9.3	12.1	11.0	12.7
CH ₃ CN 抽出物	1.0	4.3	3.8	6.2	6.8	1.5	6.7	7.2	8.3	11.1
抽出残渣	0.4	9.9	11.0	22.0	32.2	0.4	11.2	15.1	22.3	31.5
総放射能濃度 (ppm)	216.9	135.1	205.8	175.4	128.3	88.7	96.6	70.6	71.8	43.1

光分解対照用試料 (PHOTO)

	スピノシンA			スピノシンD		
	0日	3日後	7日後	0日	3日後	7日後
洗液1	89.8	89.3	85.5	87.5	84.7	81.9
洗液2	6.9	5.5	6.1	6.7	6.6	6.3
洗液3	2.0	2.7	4.8	3.9	6.3	8.2
CH ₃ CN 抽出物	1.0	1.2	1.6	1.5	1.7	2.9
抽出残渣	0.4	1.3	2.0	0.4	0.7	0.8
総放射能濃度 (ppm)	216.9	153.8	169.3	88.7	90.4	125.9

移行性検討用試料 (TRANS)

	スピノシンA				
	0日	3日後	7日後	10日後	28日後
洗液1	0	40.2	39.6	39.8	18.9
洗液2	0	16.5	5.1	8.7	6.5
洗液3	0	16.4	20.7	17.1	9.9
CH ₃ CN 抽出物	0	0	5.6	10.2	34.9
抽出残渣	100	26.9	28.9	24.2	29.8
総放射能濃度 (ppm)	0.023	0.125	0.310	0.564	0.844

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表2 処理葉洗液のTLC分析

葉上+葉中総放射能に対する割合 (% TRR)							
TLC 上のスポット	処理部試料 (NOR)					光分解対照試料 (PHOTO)	
	0日後	3日後	7日後	10日後	28日後	3日後	7日後
スピノシンA	84.5	15.9	9.8	4.9	0	77.2	78.0
1	9.0	30.1	33.0	36.3	39.3	7.3	4.6
2	-	0.9	1.6	1.4	-	-	-
3	-	1.4	2.6	1.2	-	-	-
4	-	1.2	1.5	-	-	-	-
5	-	1.8	7.2	2.1	-	-	-
6	-	2.1	7.3	-	-	-	-
7	-	12.5	6.5	19.8	3.4	3.0	2.6
8	3.3	5.1	8.4	-	4.6	6.1	6.5
9	0.5	7.4	2.0	1.2	-	1.9	1.3
10	-	3.4	3.0	2.9	1.6	0.7	1.4
スピノシンD	88.7	2.8	0	0	0	84.2	81.6
1	4.8	23.5	33.8	32.5	36.6	3.2	1.5
2	-	1.5	1.5	1.1	1.5	-	-
3	-	1.6	2.0	1.5	0.9	-	-
4	-	0.8	1.5	1.0	0.6	-	-
5	-	1.2	1.7	1.5	1.0	-	-
6	-	1.4	2.5	3.3	1.3	-	-
7	-	3.0	5.7	2.8	1.3	-	1.5
8	-	9.0	10.0	3.3	2.5	1.3	0.6
9	2.7	10.9	6.7	3.7	2.2	2.3	1.9
10	0.6	13.2	2.5	8.9	1.6	2.1	5.9
11	-	8.9	2.2	2.2	1.6	1.8	3.3
12	-	2.9	1.5	2.0	1.0	0.9	-
13	-	-	-	-	1.6	-	-

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表3 スピノシンAを処理した葉の洗液のシリカゲルカートリッジカラムによる
分画およびTLC分析

試料/画分	画分中放射能 (% TRR)	画分の濃度 (ppm)	スピノシンAの割合 (画分中%) ^{a)}	スピノシンAの割合 (% TRR) ^{b)}	スピノシンAの濃度 (ppm)
0日後	98.7	214.1			
#1 CH ₂ Cl ₂	1.0	2.169			
#2 CH ₃ CN	0.4	0.868			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.217			
#4 CH ₃ CN+DEA	96.2	208.658	94.7	91.1	197.599
#5 MeOH+DEA	1.0	2.169			
3日後	85.7	115.8			
#1 CH ₂ Cl ₂	3.3	4.458	0	0	0
#2 CH ₃ CN	3.1	4.188	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	50.5	68.226	28.2	14.2	19.240
#5 MeOH+DEA	28.8	38.909	0	0	0
7日後	85.1	175.1			
#1 CH ₂ Cl ₂	3.1	6.380			
#2 CH ₃ CN	3.5	7.203			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.2	0.412			
#4 CH ₃ CN+DEA	46.9	96.314	22.8	10.7	22.007
#5 MeOH+DEA	31.5	64.827	0	0	0
10日後	71.8	125.9			
#1 CH ₂ Cl ₂	2.8	4.911			
#2 CH ₃ CN	3.8	6.665			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.4	0.702			
#4 CH ₃ CN+DEA	26.9	46.832	10.6	2.9	5.001
#5 MeOH+DEA	37.9	66.652	0	0	0
28日後	61.0	78.3			
#1 CH ₂ Cl ₂	2.0	2.566			
#2 CH ₃ CN	4.9	6.415			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.2	0.257			
#4 CH ₃ CN+DEA	20.0	25.660	6.6	1.3	1.694
#5 MeOH+DEA	33.8	43.365	0	0	0

a) 画分4を濃縮してTLCで分析した。

b) 理論的には表2の割合と同じ数値になるべきであるが、実測値は必ずしも一致しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表4 スピノシンDを処理した葉の洗液のシリカゲルカートリッジカラムによる
分画およびTLC分析

試料/画分	画分中放射能 (% TRR)	画分の濃度 (ppm)	スピノシンDの割合 (画分中%) ^{a)}	スピノシンDの割合 (% TRR) ^{b)}	スピノシンDの濃度 (ppm)
0日後	98.1	87.0			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.4	0.355			
#2 CH ₃ CN	0.5	0.444			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.5	0.444			
#4 CH ₃ CN+DEA	96.0	85.152	94.0	90.2	80.043
#5 MeOH+DEA	0.8	0.710			
3日後	82.2	79.4			
#1 CH ₂ Cl ₂	2.0	1.932	0	0	0
#2 CH ₃ CN	1.6	1.546	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	51.1	49.363	14.1	7.2	6.960
#5 MeOH+DEA	27.4	26.468	0	0	0
7日後	77.6	54.8			
#1 CH ₂ Cl ₂	3.9	2.753			
#2 CH ₃ CN	3.4	2.400			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.6	0.424			
#4 CH ₃ CN+DEA	33.4	23.580	7.5	2.5	1.769
#5 MeOH+DEA	36.3	25.628	0	0	0
10日後	69.4	49.8			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.5	0.359			
#2 CH ₃ CN	4.7	3.375			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	1.1	0.790			
#4 CH ₃ CN+DEA	29.2	20.966	0	0	0
#5 MeOH+DEA	33.9	24.340	0	0	0
28日後	57.5	24.8			
#1 CH ₂ Cl ₂	3.0	1.292			
#2 CH ₃ CN	5.7	2.457			
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0			
#4 CH ₃ CN+DEA	18.2	7.844	0	0	0
#5 MeOH+DEA	30.7	13.232	0	0	0

a) 画分4を濃縮してTLCで分析した。

b) 理論的には表2の割合と同じ数値になるべきであるが、実測値は必ずしも一致しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表5 スピノシンAを処理した葉の抽出液のシリカゲルカートリッジカラムによる
分画およびTLC分析

試料/画分	画分中放射能 (% TRR)	画分の濃度 (ppm)	スピノシンAの割合 (画分中%) ^{a)}	スピノシンAの割合 (% TRR)	スピノシンAの濃度 (ppm)
0日後	1.0	2.169			
#1 CH ₂ Cl ₂	0	0	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0	0	-	-	-
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	0.9	1.952	89.4	0.8	1.745
#5 MeOH+DEA	0	0	-	-	-
3日後	4.3	5.809			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.4	0.540	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.4	0.540	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.135	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	2.3	3.107	31.5	0.7	0.979
#5 MeOH+DEA	1.3	1.756	0	0	0
7日後	3.8	7.820			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.3	0.617	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.4	0.823	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.206	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	1.9	3.910	24.4	0.5	0.954
#5 MeOH+DEA	1.1	2.264	0	0	0
10日後	6.2	10.875			
#1 CH ₂ Cl ₂	1.4	2.456	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.8	1.403	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.175	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	1.3	2.280	10.7	0.1	0.244
#5 MeOH+DEA	2.5	4.385	0	0	0
28日後	6.8	8.724			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.9	1.155	-	-	-
#2 CH ₃ CN	1.2	1.540	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.128	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	1.9	2.438	8.5	0.2	0.207
#5 MeOH+DEA	2.7	3.464	0	0	0

a) 画分4を濃縮してTLCで分析した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表6 スピノシンDを処理した葉の抽出液のシリカゲルカートリッジカラムによる
分画およびTLC分析

試料/画分	画分中放射能 (% TRR)	画分の濃度 (ppm)	スピノシンDの割合 (画分中%) ^{a)}	スピノシンDの割合 (% TRR)	スピノシンDの濃度 (ppm)
0日後	1.5	1.331			
#1 CH ₂ Cl ₂	0	0	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0	0	-	-	-
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	1.4	1.242	85.0	1.2	1.056
#5 MeOH+DEA	0.1	0.089	-	-	-
3日後	6.7	6.472			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.3	0.290	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.3	0.290	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0	0	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	4.3	4.154	7.2	0.3	0.290
#5 MeOH+DEA	1.7	1.642	0	0	0
7日後	7.2	5.083			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.5	0.353	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.8	0.565	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.071	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	3.3	2.330	10.2	0.3	0.238
#5 MeOH+DEA	2.5	1.765	0	0	0
10日後	8.3	5.959			
#1 CH ₂ Cl ₂	0.5	0.359	-	-	-
#2 CH ₃ CN	0.9	0.646	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.1	0.072	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	4.0	2.872	6.2	0.2	0.178
#5 MeOH+DEA	2.8	2.010	0	0	0
28日後	11.1	4.784			
#1 CH ₂ Cl ₂	1.7	0.733	-	-	-
#2 CH ₃ CN	1.6	0.690	0	0	0
#3 CH ₂ Cl ₂ +DEA	0.2	0.086	-	-	-
#4 CH ₃ CN+DEA	4.0	1.724	12.8	0.5	0.221
#5 MeOH+DEA	3.5	1.509	0	0	0

a) 画分4を濃縮してTLCで分析した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 7 処理3日後の試料の質量分析による同定：精製過程における放射能分画

シカゲ [®] カラム分画	葉面洗浄していない葉				葉面洗液			
	スピノシンA 処理		スピノシンD 処理		スピノシンA 処理		スピノシンA 処理	
	代謝物名	% TRR	代謝物名	% TRR	シカゲ [®] カートリッジ [®] TLC 分画 カラム 分画	代謝物名	% TRR	
トルエン		0.04		0.00	ジクロロメタン + アセトニトリル		7.5	
トルエン/酢酸エチル (9/1)		0.04		0.03	アセトニトリル + ジエチルアミン		39.7	
トルエン/酢酸エチル (5/5)	#0	0.9		0.6		2A 四水酸化 スピノシン A(XE) 三水酸化 スピノシン A(XD) 二水酸化 スピノシン A(XC) テトラヒドロスピノシン A(AH)	3.2	
	0A	0.3		-				
	#1	17.6		3.2				
	1A スピノシン A(A)	11.4		1.3		2B スピノシン B(B) 水酸化 スピノシン A(XA)	4.2	
	1B	-	スピノシン D	1.3				
	#2	4.2		2.7		5A 水酸化 スピノシン A(XA) ジヒドロスピノシン A(AG)	1.2	
	2A スピノシン B(B)	1.3		-				
	#3	5.5		21.9		5B 水酸化 スピノシン A(XA)	1.0	
	3A	1.5		3.4				
	3B	0.5		5.1		5C スピノシン A(A)	0.6	
	3C	0.8		2.6				
	3D	-		2.8		5D	0.7	
	3E	-		4.4				
	#4	8.3		10.3		6A スピノシン B(B) ¹⁾	0.8	
	4A 二酸化スピノシン A(XC)	2.5	N-脱メチル スピノシン D(E)	-		6B 二水酸化 スピノシン A(XC) 四水酸化 スピノシン A(XE)	0.4	
	4B 水酸化スピノシン A(XA)	0.8		-				
	#5	7.4		9.7		6C スピノシン A(A)	14.9	
	#6	11.7		5.9		6D	0.1	
シカゲ [®] メジソン		0.4		0.6		6E	0.2	
						6F	0.2	
					メタノール + ジエチルアミン		38.5	

() 内は一覧表の記号を示す。

1) スピノシンAが精製中に分解して生成した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表8 抽出残渣の酸処理による分画

		% Sample ¹⁴ C ^a	% TRR ^b	濃度 (ppm)
スピノシンD				
処理部試料	EtOAc 抽出物	21.7	2.4	2.344
3日後	水層	36.7	4.1	3.975
	抽出残渣	41.6	4.7	4.500
スピノシンA				
処理部試料	EtOAc 抽出物	10.8	3.5	4.476
28日後	水層	42.7	13.7	17.639
	抽出残渣	46.5	15.0	19.197
スピノシンA				
移行性検討試料	EtOAc 抽出物	13.0	3.8	0.032
28日後	水層	46.2	13.9	0.117
	抽出残渣	40.8	12.1	0.102
スピノシンD				
処理部試料	EtOAc 抽出物	10.1	3.2	1.366
28日後	水層	42.5	13.4	5.775
	抽出残渣	47.4	14.9	6.435

a 残渣中放射能を 100とした%

b TRR: Total Radioactive Residue (試料中総残留放射能) の略

表9 天然成分中の放射能の分析 (強酸による加水分解)

	3日後 成分D (NOR ^a)	28日後 成分A (NOR ^a)	28日後 成分A (TRANS ^b)	28日後 成分D (NOR ^a)
酸分解前の試料中濃度 (ppm)	4.500	19.197	0.102	6.435
<u>不溶性沈殿</u>				
試料中%	43.5	37.1	39.5	48.0
濃度 (ppm)	1.958	7.122	0.040	3.089
<u>グルコサゾン</u>				
試料中%	16.2	15.7	13.4	14.8
濃度 (ppm)	0.729	3.014	0.014	0.952

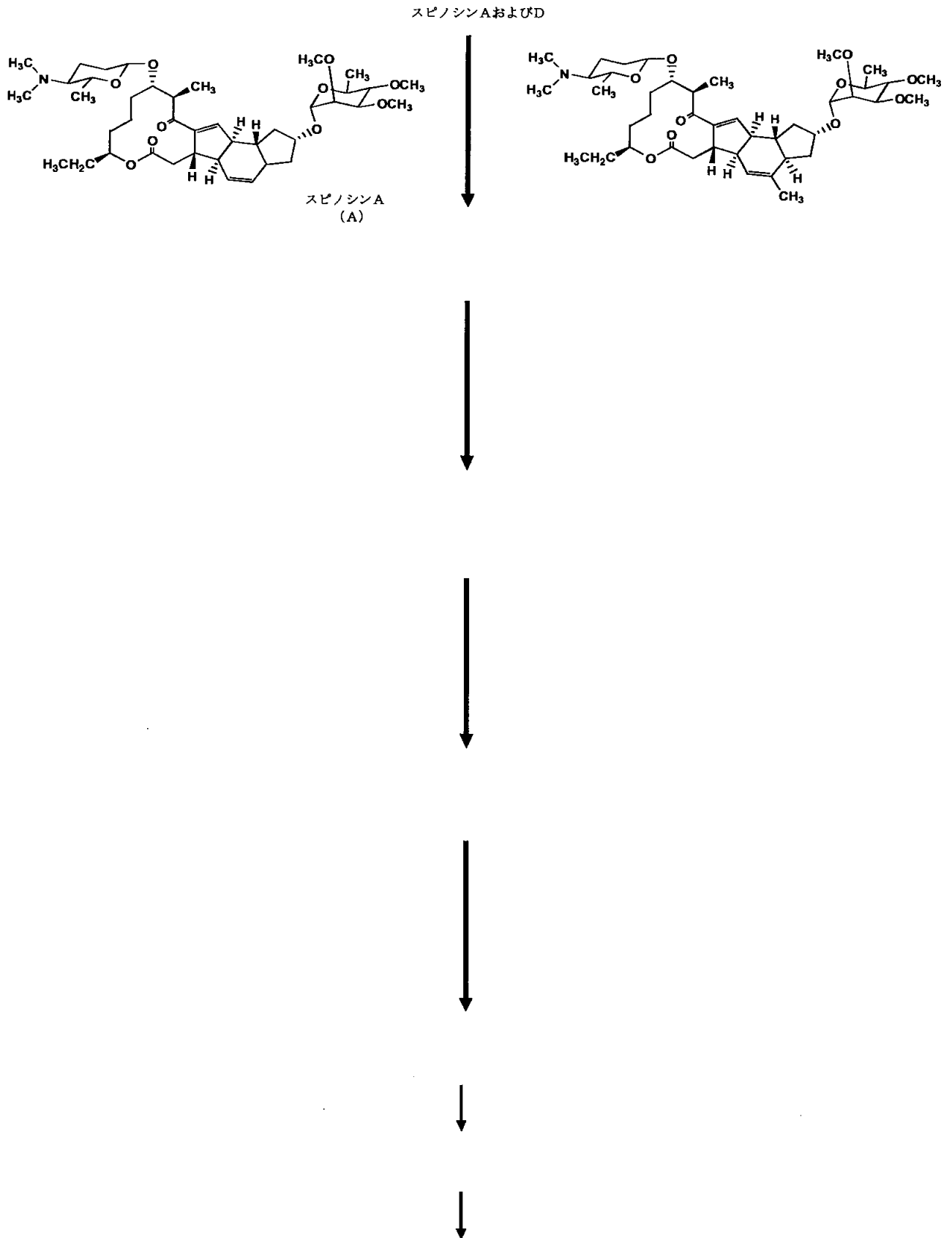
a NOR : 処理部試料

b TRANS : 移行性検用試料

表10 スピノシンAを処理した葉の抽出液の酸加水分解前後の比較

	3日後 分解前	3日後 分解後	28日後 分解前	28日後 分解後
スピノシンA(TLC上%)	15.3	0.0	1.0	0.0

図3 散布処理後のリンゴ葉におけるスピノサドの主要代謝経路



作物代謝 (6)

水稻における代謝運命

資料No. 64

試験機関:

報告書作成年: 2001年

試験目的

土壌処理後のスピノサドの水稻への吸収、分布および代謝残留物を明らかにすることを目的に実施した。

¹⁴C-標識化合物

化学名

[¹⁴C] スピノシンA

(2R, 3aS, 5aR, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bR)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンノピ^oラノシルオキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ- β -D-エリスロピ^oラノシルオキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカビト^oロ-14-メチル-1H-as-インダ^oセノ[3, 2-d]オキサシクロテ^oシン-7, 15-ジ^oン

[¹⁴C] スピノシンD

(2S, 3aR, 5aS, 5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS, 16bS)-2-(6-テ^oオキシ-2, 3, 4-トリ-O-メチル- α -L-マンノピ^oラノシルオキシ)-13-(4-ジ^oメチルアミノ-2, 3, 4, 6-テトラテ^oオキシ- β -D-エリスロピ^oラノシルオキシ)-9-エチル-2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16a, 16b-ヘキサテ^oカビト^oロ-4, 14-ジ^oメチル-1H-as-インダ^oセノ[3, 2-d]オキサシクロテ^oシン-7, 15-ジ^oン

[¹⁴C] スピノシンA

[¹⁴C] スピノシンD

比放射能

放射化学的純度

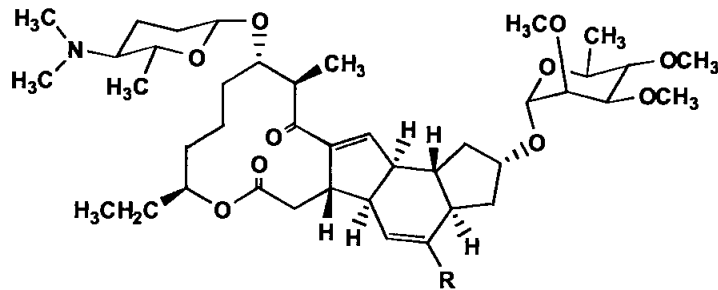
標識位置 点線内の炭素原子を均一に¹⁴Cで標識した。

標識位置設定理由 分子の中心に位置するアグリコン環の標識を選択した。

標識体合成法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

構造式



R = H : スピノシンA
CH₃ : スピノシンD

供試作物

水稻（品種：Japonica M202, *Oryza sativa* L.）を使用した。

作物調製場所

米国Indiana州 Indianapolis, Dow AgroSciences 環境化学研究所温室

作物調製期間

2000年6月20日～2000年10月19日

処理区の設定

2種類の大きさのポットを使用。

最初の1ヶ月用 : 25 x 51 x 10(h) cm (各3ポット)

収穫期用 : 38 x 51 x 20(h) cm (各5ポット)

方法

① 施用

スピノシンAおよびスピノシンDを200 g a. i./haの割合でアセトン溶液(1 mg/0.3 mL/ hole)を用いて、苗を移植する前の植穴部(各ポットにつき5穴)に処理した。予定慣行施用量(75 g a. i./ha)と原体中のスピノシンAおよびスピノシンDの割合(85:15)を考慮すると、スピノシンAについては3.1倍、スピノシンDについては17.8倍に相当する。

	スピノシンA	スピノシンD
成分量	5 mg/pot	5 mg/pot
比放射能		
施用液(アセトン)量	1.5 mL/pot	1.5 mL/pot

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

② 栽培条件

温室で栽培した。日照時間を16時間、平均温度29℃に制御した。各ポットには緩効性化成肥料を施肥した他、液体肥料を週1回与えた。害虫防除のため、3種の殺虫剤を使用した。

③ 試料採取

施用1, 2, 7, 15, 28日, 穂ばらみ期及び収穫期に下記の試料を採取した。

採取時点	ポット数	採取試料
1日	各1	水
2日	各1	水
7日	各1	茎葉部, 水
15日	各1	茎葉部, 水
28日	各1	茎葉部, 水
穂ばらみ期	各1	茎葉部, 水
収穫期	各4	穀粒, 稲わら

水試料は100 mLを採取した。植物試料は水面のすぐ上又は地際(収穫期)から切り取り採取した。試料は一時的に冷凍して分析時まで保管した。

28日までの植物試料は液体チッ素で凍結させ、乳鉢と乳棒で粉碎して抽出時まで冷凍保管した。穂ばらみ期及び収穫期のわらは、切断後一時冷凍し、さらに液体チッ素で凍結させ、ミルで粉碎して抽出時まで冷凍保管した。穀粒は、脱穀して玄米と籾殻に分離し、それぞれをブレンダー及びミルで微粉化して抽出時まで冷凍保管した。

④ 分 析

水試料は、田面水の一部100 mLを、中性のアセトニトリル/ジクロロメタン(ACN/DCM) [1:1]100 mLで2回分配し、2回の抽出液を合して1つの画分(中性画分)とした。次いで、残りの水相に塩酸を数滴添加して酸性とし、再びACN/DCM [1:1]100 mLで2回抽出(酸性画分)した。中性、酸性及び抽出後の水相の一部について、LSCにより総放射能を測定した。28日目を除いた全ての有機溶媒抽出液は、さらにHPLCでも分析した。

処理後7, 15及び28日目に採取した未成熟植物については、各調製試料の0.5~1.0 gを、ACN/水[70:30]溶液約50 mLを加えて、Polytronホモジナイザーを用いて磨細抽出した。抽出残渣を吸引ろ過して取り出し、一夜風乾して秤量し、一部を燃焼分析に供した。水性アセトニトリル抽出液に水25 mLを加え、DCM 40 mLで1回分配し、続いてのACN/DCM[1:1] 100 mLで抽出した。2つの抽出液を合し、抽出液及び抽出後の水相の両方についてLSCにより総放射能を測定した。有機溶媒抽出液については、さらにHPLC及びTLCの両方で分析した。

茎葉試料は図3のフローシートに従って分析した。調製した各茎葉試料の一部10 gを、メタノール/水[70:30]約150 mLを加え、Polytronホモジナイザーを用いて磨細抽出した。残渣の組織を吸引ろ過して取り出し、前操作

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

と同様に2回目のホモジネーションに供した。この工程に続いて、試料を攪拌しながら約1時間還流した。抽出残渣を吸引ろ過して取り出し、一夜風乾して秤量し、一部を燃焼分析に供した。LSC用の2つの水性メタノール抽出液を取り出した後、抽出液を合わせ、メタノールを減圧下で留去し、次いで残っている水相画分を、中性及び酸性において各2回、ACN/DCM[1:1]を用いて分配した。中性、酸性抽出液及び抽出後の水相の一部について、LSCで総放射能を測定し、さらに中性抽出液についてはHPLCで分析した。

稲わらは図1のフローシートに従って分析した。稲わら試料の5 gを、上記茎葉試料と同様に処理した後、残渣の稲わら画分中の非抽出性残留については、酸洗浄剤による繊維質(ADF)画分の分離又は1.0 N HCl中での還流のどちらかでさらに特性検討を行った。ADF画分は文献記載の方法に従って、セルロースとリグニン画分への残留の分布を測定した。還流分析では、抽出後の稲わらの設定量1 gを1.0 N HCl中で攪拌しながら約1時間還流した。続いて、残渣の稲わらを吸引ろ過して取り出し、乾燥及び秤量後、これらの固体を燃焼分析に供した。次いで、加水分解物の溶液を、ACN/DCM[1:1] 150~200 mLで3回液々分配した。3回の抽出液を合した後、有機溶媒抽出液及び水相画分の一部について、燃焼法により総放射能を測定し、さらに有機溶媒抽出液はHPLCで分析した。

玄米中の放射能は燃焼法による測定結果から、極めて微量であることが判明したが、この放射能が抽出可能であるかを確認した。2点のスピノシンAの玄米試料20 gを、メタノール/水[70:30]溶液 150 mL中を加え、Polytronホモジナイザーを用いて2回ホモジナイズした。ホモジネートを合して攪拌しながら約1時間還流した。還流工程に続いて、玄米の抽出残渣を吸引ろ過して取り出し、得られたろ液からメタノールを減圧下で留去した。残渣の水性画分の一部を燃焼法により総放射能を測定し、またこの画分に同量のACN/DCM[1:1]で3回液々分配した。有機層を合し、減圧下で濃縮し、その1/10を燃焼法により総放射能を測定した。なおスピノシンDの玄米中の総放射能は検出限界以下であったため、抽出性確認試験を実施しなかった。

⑤ 放射能測定

液体試料は直接または抽出残渣など固体試料と同様に自動燃焼装置で酸化燃焼処理したのち、いずれも液体シンチレーション計測(LSC)法で¹⁴C放射能を定量した。HPLCではフラクションコレクターで分取後、LSCで¹⁴Cを定量した。TLC上の放射能はイメージスキャナーで定量した。

⑥ 代謝物の同定

代謝物はLC-MS/MSを用い、合成標品（ ）と比較して同定した。

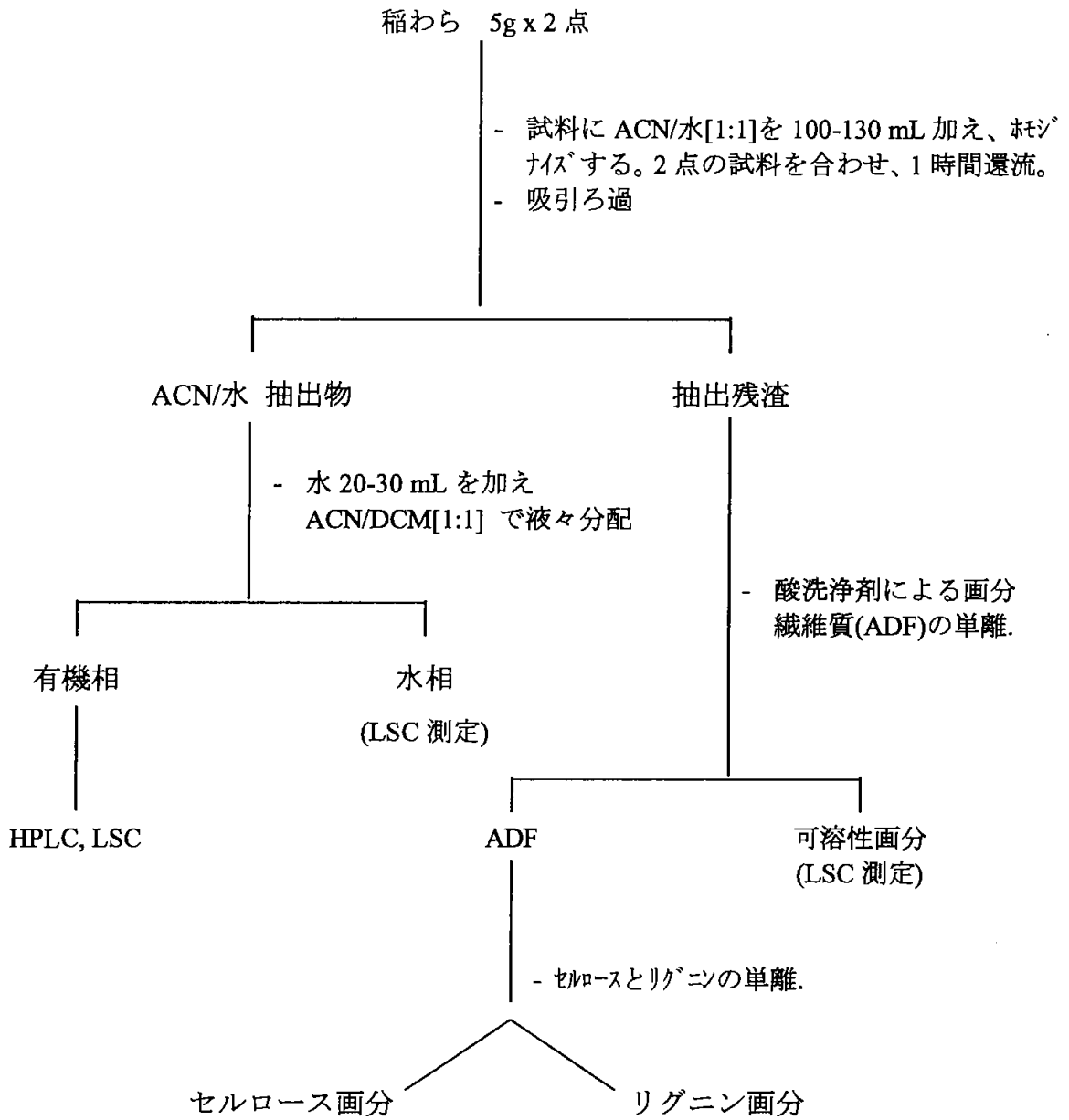


図1 分析フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

結果：結果の概要を表1～9に示す。

下表の総放射能残留 (TRR) に示されるように、スピノシンA及びスピノシンDは土壌から根を經由して容易に吸収され、植物の地上部へ移行した。最高残留濃度は、移植後1週以内に認められた。植物全体の残留濃度はその後減少したが、スピノシンA、Dとも処理後1ヶ月間を通して取り込まれ続けた。1ヶ月以降は、スピノシンA、Dとも取り込まれる量は極端に減少した。茎葉期試料が採取された時点までに、植物全体の残留濃度は成長による希釈効果によって1.0 μ g/g未満に低下した。吸収されたスピノシンAとDの総量を比較したところ、スピノシンA量はスピノシンD量のほぼ2倍であった。これは、スピノシンDと比較してスピノシンAの水溶解度が高いためと考えられた。残留物の穂先への移行は極めて少なかった。穂先へ移動した残留物の大部分は、籾殻に集中し、玄米(脱穀した穀粒)中の残留は検出限界の約0.004 μ g/g以下であった。

作物の画分		総放射能濃度 (TRR) [μ g/g]	
		スピノシン A	スピノシン D
未成熟植物	処理後 7 日目	45.61	18.88
	処理後 15 日目	21.18	4.96
	処理後 28 日目	3.78	2.34
茎葉	処理後 65 日目	0.219	0.159
稲わら		0.604	0.282
穀粒全体		0.016	< LOD
	籾殻	0.055	0.020
	玄米	0.004	< LOD

スピノサドに由来する残留物は、湛水した区画から採取した田面水中にも見出された。植物と同様に、残留の最高濃度は移植後1週以内に検出されたが、その後着実に低下した。処理後28日目における水中平均濃度は約0.01mg/L以下に減少した。水中残留の分析の結果、移植後の2、3日以内に、スピノシンA及びスピノシンDは水試料中のTRRの1～3%に減少し、水溶性の残留物に分解された。

植物に吸収された、スピノサドに由来する残留物は着実に代謝されて、高極性成分や非抽出性成分へと変換された。この代謝反応は、

全ての試料における代謝物は、全試験を通して定性的には類似していたが、経時的な量的変化が認められた。処理後1週目では、スピノシンA及びD並びに

穂

ばらみ期後半の茎葉試料では、親化合物のスピノシンA又はD及び

収穫期では(処理後約119日目)、スピノシンA又はDは稲わら中のTRRの4～8%に過ぎず、

稲わら中の極性残留物は、稲わら中TRRの約45～53%に相当し、残りの約40～45%は非抽出性残留物であった。籾殻中の残留物のパターンは、稲わらにみられたものに類似していた。

玄米中にはスピノサドの基本骨格を有する残留物は認められなかった。

以上の結果は、これまでに実施されたスピノサドの作物代謝試験の結果と同様である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 1 スピノシン A またはスピノシン D を処理した田面水の分析

残留総放射能(TRR)に対する割合 (%)					
スピノシン A	TRR (mg/L)	スピノシン A	極性成分 2 ^{a/}	極性成 分 1 ^{b/}	水相画分
2 日後	0.281	1.3	28.1	42.1	12.8
7 日後	0.236	0.7	12.5	44.5	37.1
15 日後	0.072	0.5	15.4	38.1	40.8
28 日後	0.008	NA ^{c/}	NA	35.3 ^{d/}	25.9

残留総放射能(TRR)に対する割合 (%)					
スピノシン D	TRR (mg/L)	スピノシン D	極性成分 2 ^{a/}	極性成 分 1 ^{b/}	水相画分
2 日後	0.128	1.0	49.5	31.7	11.7
7 日後	0.085	<LOQ ^{d/}	19.5	45.2	33.9
15 日後	0.027	--	16.5	41.2	41.3
28 日後	0.003	NA ^{d/}	NA	27.9 ^{d/}	26.8

^{a/} 保持時間 3-7 分の成分。スピノシン A では 3 種以上の成分を含む。スピノシン D では複数成分を示唆するブロードなピークとなった。

^{b/} HPLC に保持されない極性成分。

^{c/} 28 日後の抽出物は量的に少ないため、分析しなかった。

^{d/} 定量限界以下

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 2. スピノシン A を処理した土壌で栽培した未成熟水稻の分析

	TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}				
		スピノシン A	保持時間 6分	保持時間 3-5.5分 ^{b/}	水相画分	抽出 残渣
7 日後	45.61	60.7 (27.69)	6.3 (2.87)	1.9-2.1 (0.87-0.96)	3.2 (1.46)	8.7 (3.97)
15 日後	21.18	43.4 (9.19)	7.6 (1.61)	6.0 (1.27)	3.1 (0.66)	23.4 (4.96)
28 日後	3.78	29.5 (1.12)	7.5 (0.28)	12.1 (0.46)	4.5 (0.17)	31.1 (1.18)

^{a/} 括弧内の数値はスピノシン A に換算した放射能濃度($\mu\text{g/g}$)を示す。

^{b/} 複数成分を示唆するブロードなピーク。7 日後の試料については各成分の濃度を示した。

表 3. スピノシン D を処理した土壌で栽培した未成熟水稻の分析

	TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}				
		スピノシン D	保持時間 6-8分	保持時間 3-5.5分 ^{b/}	水相画分	抽出 残渣
7 日後	18.88	50.7 (9.57)	3.7-8.4 (0.70-1.59)	2.2-2.9 (0.42-0.55)	3.3 (0.62)	8.6 (1.55)
15 日後	4.96	33.0 (1.64)	2.9-13.4 (0.14-0.66)	8.7 (0.43)	3.6 (0.18)	24.7 (1.23)
28 日後	2.34	18.0 (0.42)	2.5-14.2 (0.06-0.33)	6.3-15.9 (0.15-0.37)	5.6 (0.13)	26.3 (0.62)

^{a/} 括弧内の数値はスピノシン D に換算した放射能濃度($\mu\text{g/g}$)を示す。

^{b/} 複数成分を示唆するブロードなピーク。7 日後の試料については各成分の濃度を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 5. スピノシン A またはスピノシン D を処理した土壌で栽培した穂ばらみ期水稻の分析

TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン A	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}				抽出残渣
		保持時間 6分 ₂	保持時間 3-5分 ^{b/}	水相画分		
スピノシン A	0.219 (0.050)	22.9 (0.050)	9.2 (0.020)	7.4-11.4 (0.016-0.025)	3.8 (0.008)	33.3 (0.073)

TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン D	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}				抽出残渣
		保持時間 6-8分 ^{a/}	保持時間 3-5分 ₂	水相画分		
スピノシン D	0.159 (0.018)	11.2 (0.018)	3.6-11.9 (0.006-0.019)	22.4 (0.036)	4.6 (0.007)	37.9 (0.060)

^{a/} 括弧内の数値はスピノシン A または D に換算した放射能濃度($\mu\text{g/g}$)を示す。

^{b/} 複数成分を示唆するブロードなピーク。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 6. スピノシン A またはスピノシン D を処理した土壌で栽培した水稻から得た籾殻の分析

TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン A	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}			
		保持時間 6分 ₂	保持時間 3-5.5分 ^{a/}	水相画分	抽出残渣
スピノシン A 0.055	11.9 (0.007)	7.2-8.5 (0.004-0.005)	10.2-20.1 (0.006-0.011)	5.0 (0.003)	29.8 (0.016)

TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン D	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}			
		保持時間 6-8分 ₂	保持時間 3-5.5分 ^{a/}	水相画分	抽出残渣
スピノシン D 0.020	<LOD ^{c/}	25.0 (0.005)	35.3 (0.007)	--	33.0 (0.007)

^{a/} 括弧内の数値はスピノシン A または D に換算した放射能濃度($\mu\text{g/g}$)を示す。

^{c/} 検出限界以下(バックグラウンド放射能 8 dpm)
TRR の 3%、または 0.001 $\mu\text{g/g}$ に相当する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 7. スピノシン A またはスピノシン D を処理した土壌で栽培した水稻から得た稲わらの分析

	TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン A	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}			
			極性成分 ^{b/}	水相画分	繊維質画分 (ADF)	酸可溶性画分 ^{c/}
スピノシン A	0.604	8.6 (0.052)	2.7-13.7 (0.016-0.083)	9.1 (0.055)	32.0 (0.193)	6.4 (0.039)

	TRR Level ($\mu\text{g/g}$)	スピノシン D	残留総放射能(TRR)に対する割合 (%) ($\mu\text{g/g}$) ^{a/}			
			極性成分 ^{b/}	水相画分	繊維質画分 (ADF)	酸可溶性画分 ^{c/}
スピノシン D	0.282	4.2 (0.012)	2.7-32.6 (0.008-0.092)	8.8 (0.025)	35.5 (0.100)	6.9 (0.019)

^{a/} 括弧内の数値はスピノシン A または D に換算した放射能濃度($\mu\text{g/g}$)を示す。

^{b/} アイソクラティック分析で分離された 4 成分の量の幅を示した。この部分は、ほとんどカラムに保持されずすぐに溶出したので、さらにグラジエント分析したところ最低 6~7 成分から構成されていることが判明した。

^{c/} この画分は繊維質画分(ADF)を分離する際に、抽出残渣から溶出した成分である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 8. スピノシン A を処理した土壌で栽培した水稻から得た稲わら抽出残渣の分析

	稲わら抽出残渣使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	ADF 重量 (g)	ADF dpm/g	ADF 中総放射能(dpm)	抽出残渣に対する割合 (%)	TRR に対する割合(%)
繊維質画分 (ADF)の分離	9.55	57,367	4.61	10,380	47,852	83.4	32.0
リグニン画分	ADF 使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	リグニン重量 (g)	リグニン dpm/g	リグニン中総放射能(dpm)	ADF に対する割合 (%)	TRR に対する割合(%)
試料 1	1.01	10,484	0.44	13,699	6,028	57.5	18.4
試料 2	0.99	10,276	0.59	11,507	6,789	<u>66.1</u> 61.8 ^d	<u>21.2</u> 19.8 ^d
セルロース画分	ADF 使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	セルロース重量 (g)	セルロース dpm/g	セルロース中総放射能 (dpm)	ADF に対する割合 (%)	TRR に対する割合(%)
試料 1	1.0044	10,435	0.8667	9,979	8,649	82.9	26.5
試料 2	1.0043	10,436	0.8481	9,902	8,398	<u>80.5</u> 81.7 ^d	<u>25.8</u> 26.2 ^d

表 7 とは別試料を分析に用いた。この稲わら抽出残渣は 6,007 dpm/g の放射能(TRR の 38.4%, スピノシン A 換算濃度 0.232 μ g/g) を含む。

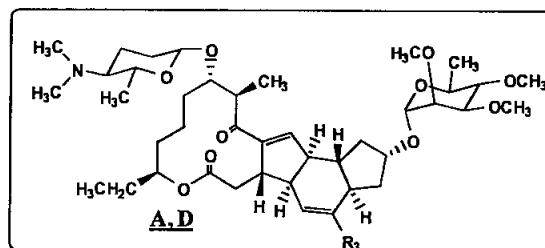
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・アグロサイエンス日本株式会社にある。

表 9. スピノシン D 処理した土壌で栽培した水稻から得た稲わら抽出残渣の分析

	稲わら抽出残渣使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	ADF 重量 (g)	ADF dpm/g	ADF 中総放射能(dpm)	抽出残渣に対する割合 (%)	TRR に対する割合(%) ^d
繊維質画分 (ADF)の分離	10.04	26,486	5.26	4,195	22,066	83.3	35.5
	ADF 使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	リグニン重量 (g)	リグニン dpm/g	リグニン中総放射能(dpm)	ADF に対する割合 (%)	TRR に対する割合 (%)
リグニン画分							
試料 1	1.01	4,237	0.1862	19,054	3,548	83.7	29.7
試料 2	1.01	4,237	0.1903	19,355	3,683	<u>86.9</u> 85.3 ^d	<u>30.8</u> 30.3 ^d
	ADF 使用量 (g)	供試放射能 (dpm)	セルロース重量 (g)	セルロース dpm/g	セルロース中総放射能 (dpm)	ADF に対する割合 (%)	TRR に対する割合 (%)
セルロース画分							
試料 1	1.011	4,240	0.8434	3,646	3,075	72.5	25.7
試料 2	1.040	4,362	0.8513	3,513	2,991	<u>68.6</u> 70.6 ^d	<u>24.4</u> 25.6 ^d

表 7 とは別試料を分析に用いた。この稲わら抽出残渣は 2,638 dpm/g の放射能 (TRR の 42.6%, スピノシン A 換算濃度 0.120 μ g/g) を含む。

スピノサドの水稻中における代謝分解経路図



スピノシンAまたはスピノシンD

