

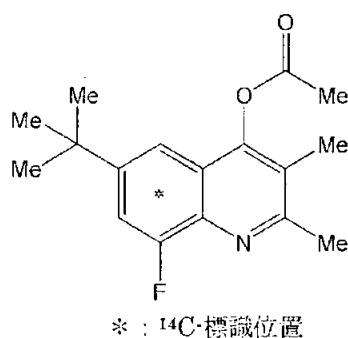
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

2. 植物代謝に関する試験

(資料 運-7)

3) AF-02 のほうれんそうにおける代謝

放射性標識化合物： $[^{14}\text{C}]$ AF-02



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-4a,5,6,7,8,8a- ^{14}C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

$[^{14}\text{C}]$ AF-02 の保存溶液の調製； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 をアセトニトリル 200 mL に溶解して保存溶液を調製した。

試験植物；ほうれんそう (*Spinacia oleracea* L. 品種：リビエラ)

栽培環境；ファイトロン（光源：太陽光）内に設置したポットで栽培した。

ポット；埼玉県農林総合研究センター園芸研究所（久喜市）の畑圃場より採取した新鮮畑土壌を 1/5000 a のワグネルポットに充填して用いた。

温湿度；ほうれんそう慣行栽培期の東京地方の温湿度を基準に設定した。

栽培時期；2007年9月～2007年11月

施用液の調製および施用：

施用液； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 の希釈溶液の計算量を採り、エバポレーターで有機溶媒を留去して乾固した。これを少量のアセトンで溶解し、顆粒水和剤白試料を添加した後、水を加えて超音波をかけながらよく攪拌して施用液とした。

施用量；1.2 mg/ポット（予定慣行最大施用量である 600 g a.i./ha 相当量）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Meiji Seikaファルマ株式会社にある。

施用時期；播種 44 日後に初回散布し、その 1 週間および 2 週後に追加散布を行った。
施用部位；ほうれんそうの全面に散布した。

試験区の配置と試料採取：

処理区と非処理対照区の 2 試験区を設けた。処理区は最終散布 1 日、7 日、および 14 日後にほうれんそう地上部を収穫した。非処理区については最終散布 14 日後にほうれんそう地上部を収穫した。処理区は各ポットから採取した試料を 1 点の混成試料にまとめた。

試験区	ポット数	採取時期	採取試料
処理区	9	最終散布 1、7、14 日後	ほうれんそう地上部
非処理対照区	1	最終散布 14 日後	ほうれんそう地上部

分析方法：

試料の均質化と放射性総残留物 (TRR) の測定；

採取した各試料は、アセトニトリルで表面洗浄を行った後、ドライアイスと共にミキサーで粉砕して均質化処理した。TRR は抽出法により測定した。

ほうれんそう試料の抽出と精製；

次の図に示すように、アセトン/水=8/2(v/v)を加え、ホモジナイズおよび濾過により抽出し、抽出液と残渣に分離した。各画分の ^{14}C を測定し、それらを合計して TRR を求めた。抽出液は減圧濃縮した後、固相抽出による分画化を行った。

図 1 抽出操作フローシート

代謝物の定量；

抽出液中の代謝物は C18 カラムを用いてフロースルー型放射能検出付きの HPLC で分析した。得られたラジオクロマトグラムを解析して 44 画分に分画し、代謝物を定量した。

主代謝物の同定；

抽出液中のフリーの主放射性ピークについては、HPLC、及び一次元 TLC による参照標品との比較により同定を行った。抱合体については、単離した後、MS/MS スペクトルを取得、またはその酵素加水分解物を HPLC で参照標品と比較することにより同定を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

放射能測定；

すべての液体試料は液体シンチレーション計測 (LSC) して定量した。固体中の放射能量は酸化燃焼処理したのち、LSC 測定して定量した。

試験結果：

1) 抽出分析 (本文中の濃度はすべて植物体重量ベースでの AF-02 換算濃度)

表 1 に示すように、最終散布 1、7、14 日後のほうれんそう中の TRR レベルは、20.7122、17.5133、12.5435 mg eq./kg と徐々に減少した。表面洗浄液中の放射能は最終散布 1 日後には TRR の 39.5% であったが、その後徐々に減少し、最終散布 14 日後には TRR の 9.1% となった。試料中に残留する放射能はその多くが抽出液中に回収され (TRR の 58.1 ~ 86.8%)、抽出残渣中の放射能は最大で 4.1% (最終散布 14 日後) であった。

表 1 ほうれんそう中の放射性総残留物レベル (mg eq./kg)

	最終散布 1 日後		最終散布 7 日後		最終散布 14 日後	
	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR
表面洗浄液	8.1636	39.50	4.0016	22.84	1.1179	9.06
抽出液	12.0504	58.12	12.9439	73.92	10.9072	86.81
抽出残渣	0.4981	2.38	0.5678	3.24	0.5184	4.13
計	20.7122	100.00	17.5133	100.00	12.5435	100.00

2) 放射性成分の分析

主要放射性ピークの定量値を表 2 に示す。最終散布からの日数が経過するに伴い、AF-02 及び が減少し、

が増加した。AF-02 以外に TRR の 10% を越える代謝物であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2 ほうれんそう抽出液中の放射性成分の HPLC 分析

フラクション 番号	識別	最終散布 1日後		最終散布 7日後		最終散布 14日後	
		mg	%	mg	%	mg	%
		eq./kg	TRR	eq./kg	TRR	eq./kg	TRR
合計		20.7122	100	17.5133	100	12.5435	100

<LOD) : 検出限界未満

3) 抽出残渣

抽出残渣中の TRR が低かったため、特徴づけ分析は実施しなかった。

4) 保存安定性

最終散布 14 日後の試料を収穫後 139 日間凍結保存したのち、抽出し、HPLC で分析したところ、収穫 16 日後に分析した結果とほぼ同じ定量値が得られ、 $[^{14}\text{C}]\text{IAF-02}$ 及びその代謝物は凍結保存した試料中で安定であることが分かった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

5) 代謝経路

図2 ほうれんそうにおけるAF-02の推定代謝経路

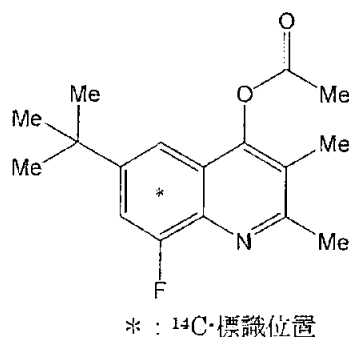
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

3. 土壌中動態に関する試験

(資料 運-8)

1) AF-02 の好氣的湛水土壌代謝運命

放射性標識化合物 : [^{14}C]AF-02



化学名 : 6-*tert*butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U- ^{14}C]quinolyl acetate

放射化学的純度 :

比放射能 :

標識位置選定理由 :

試験方法 :

被験物質 [^{14}C]AF-02 溶液の調製 ;

[^{14}C]AF-02 をアセトンに溶解して被験物質溶液とした。

供試土壌 ; 表 1 の特性の日本の水田土壌(栃木土壌)を 2 mm の篩に通して使用した。

表 1：供試土壌の採取地および特性

採取地		栃木県宇都宮市
pH	H ₂ O	6.5
	KCl	5.6
	CaCl ₂	6.0
有機炭素 (腐植) (g/kg)		76.3(132)
陽イオン交換能 (cmolc/kg)		50.4
粒径分布 (%)	極粗砂 (2.0~1.0mm)	1.2
	粗砂 (1.0~0.5mm)	5.2
	中砂 (0.5~0.25mm)	9.0
	細砂 (0.25~0.1mm)	11.4
	極細砂 (0.1~0.05mm)	5.8
	シルト (0.05~0.002mm)	38.0
	粘土 (0.002mm 以下)	29.4
土性分類 (USDA)		埴壌土
主粘土鉱物		アロフェン
最大容水量 (%)		125.95

インキュベーション条件；

乾土 55 g 相当の試験土壌 (2 mm 篩別後) を試験容器 (200 mL 容の広口ガラス瓶) に充填し、脱イオン水 65 mL を加えて、沈降後の土壌深さ 4.9 cm、水深約 1.5 cm としたのち、加湿空気を連続通気して下記温度条件の恒温槽で 29 日間プレインキュベートした。試験期間中は適宜 Milli-Q 水を加えて水深を設定範囲内に維持した。

温度	25 ± 2°C
照明	暗所

還元層形成の確認；

プレインキュベーション終了時 (被験物質添加前) に酸化還元電位 (Eh) が土壌下層部で 200 mV 以下であることを確認した。

土壌の滅菌；

非滅菌土壌と同様のプレインキュベーションを 21 日間行った栃木土壌の一部について、1 日に 1 回 20 分間のオートクレーブ滅菌を 3 日間行って滅菌土壌を調製した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

被験物質処理；

プレインキュベーション後の試験容器内の湛水土壌の水層に、圃場での予定処理量 800 g/ha に相当する 0.8 mg/kg の目標濃度で被験物質溶液を添加したのち、攪拌して [¹⁴C]AF-02 を試験系全体に均一に分布させた。処理後の各試験容器を揮発性物質捕集装置と連結し、二酸化炭素フリーの加湿空気を連続通気して上記条件でインキュベートした。

揮発性物質捕集剤；

試験容器から排出された空気は 2 本の 1N 水酸化ナトリウムトラップに通して二酸化炭素を連続捕集した。

試料採取；各土壌とも次の各時点で、2 連の試験容器と揮発性物質トラップを採取した。

非滅菌	0、1、3、7、28、56、70、84 日
揮発性物質	28、56、70、84 日
滅菌	7、70 日

分 析：

施用直後を除き、傾斜法により水層と土壌を分離した。

水層試料；

直接 LSC で分析して、放射エネルギーを測定した。0 日目と 1 日目試料は固相抽出後、HPLC プロファイルを測定した。

土 壌；

150 mL のアセトニトリルで 30 分間 1 回振とう抽出し（施用直後は 2 回）、LSC で分析した後、アセトニトリル抽出液を濃縮して HPLC で分析した。施用直後以外の試料については残渣土壌を 150 mL のアセトニトリル/0.1N 塩酸（8/2 v/v）150 mL で 2 回抽出し、それぞれの酸性アセトニトリル抽出液を LSC で分析した。これを合わせた後、濃縮して HPLC で分析した。最終時点の抽出残渣試料については、腐植成分の分画を行って分析した。施用直後の分析方法を図 1 に、それ以外の分析時点の分析方法を図 2 に、腐植成分の分析方法を図 3 に示す。

NaOH トラップは、試料の一部（2 mL）を液体シンチレーション計測（LSC）して定量した。

HPLC プロファイル測定では、溶出液を 22 の画分に分画した後、放射能フロー検出器より検出し、定量した。放射性ピークまたは分析標品と同じ HPLC 分画に溶出する放射能をそれらの定量値とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

AF-02 と代謝物の同定は、HPLC（逆相 HPLC）と一次元シリカゲル TLC における標準品とのコクロマトグラフィーによって確認した。TLC 上の放射性物質はラジオイメージングアナライザーで検出した。

図 1 : 0 日目試料の水層及び土壌中残留物の分析フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 2 : 水層及び土壌中残留物の分析フローシート (0 日目以外)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 3 : 腐植画分の分析フューシート

AF-02 及び M1 の半減期等の算定 ;

AF-02 の消失は一相性の一次反応では相関が低かったため、0~7 日目の数値を用いて以下のグスタフソン式を適用して計算した。M1 の消失は一相性の一次反応とみなして計算した。

- 1) グスタフソン式 $C=C_0(1+\beta t)^{-1/\alpha}$ から、式 1 及び式 2 で 50%消失期 (DT_{50}) と 90%消失期(DT_{90})を算出した。

$$DT_{50} = (0.5^{-1/\alpha} - 1) / \beta \quad (\text{式 1}), \quad DT_{90} = (0.1^{-1/\alpha} - 1) / \beta \quad (\text{式 2})$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

2) M1の消失を一相性の一次反応とみなして、式3、式4及び式5からDT50及びDT90を算出した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (\text{式 3}), \quad DT_{50} = (\ln 2)/k \quad (\text{式 4}), \quad DT_{90} = (\ln 10)/k \quad (\text{式 5})$$

k : 分解速度定数、C : 時間tにおける濃度、C₀ : 初濃度

結 果

物質収支と土壤中残留物 ;

表2に土壤中および揮発性物質トラップから回収された放射能または放射性成分の処理放射能比(処理量%)を、表3に土壤中の残留物濃度の各推移を示した。

設定処理濃度0.8 mg/kgに対して、0.798 mg/kgの濃度で処理された。これら土壤から試験期間中処理量の98.8~102.5%が土壤と揮発性物質トラップから回収された。

水層に検出される放射能は急速に減少し、3日目には処理量の1.2%となった。土壤中から抽出される放射能は田面水からの移行により3日目に95.6%まで増加したが、その後穏やかに減少し、84日目には処理量の73.8%となった。これに伴い、抽出残渣が施用直後の2.1%から処理84日目に26.9%に増加した。二酸化炭素の生成は痕跡量程度であった。

表2 : 放射能分布および物質収支 (処理量%)

	インキュベーション 期間(日)	水層	土 壤		¹⁴ CO ₂	総回収率
			抽出液	抽出残渣		
非 滅 菌	0	13.11	87.30	2.09	N.M.	102.49
	1	6.01	93.48	2.17	N.M.	101.66
	3	1.18	95.58	4.83	N.M.	101.60
	7	0.62	89.86	9.67	N.M.	100.14
	28	0.29	78.81	21.93	0.04	101.07
	56	0.18	75.85	24.26	0.07	100.37
	70	0.17	72.41	26.15	0.07	98.80
	84	0.12	73.84	26.88	0.07	100.91
滅 菌	7	0.73	91.92	8.50	N.A.	101.14
	70	0.26	83.40	19.88	N.A.	103.54

N.M.) : 測定せず N.A.) : 試料なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 3 : 土放射能分布および物質収支 (放射能濃度、mg eq./kg)

	インキュベーション 期間 (日)	水層	土壌		¹⁴ CO ₂	総回収率
			抽出液	抽出残渣		
非 滅 菌	0	0.1046	0.6963	0.0167	N.M.	0.8175
	1	0.0479	0.7457	0.0173	N.M.	0.8109
	3	0.0094	0.7624	0.0385	N.M.	0.8104
	7	0.0050	0.7167	0.0771	N.M.	0.7988
	28	0.0023	0.6286	0.1750	0.0003	0.8062
	56	0.0015	0.6050	0.1935	0.0006	0.8006
	70	0.0014	0.5776	0.2086	0.0006	0.7881
	84	0.0010	0.5890	0.2144	0.0006	0.8049
滅 菌	7	0.0058	0.7332	0.0678	N.A.	0.8068
	70	0.0021	0.6652	0.1585	N.A.	0.8259

N.M.): 測定せず N.A.): 試料なし

水層と土壌中の残留物 ;

表 4 に主要放射性成分の推移 (処理放射能比と成分濃度) を示した。

非滅菌土壌では、AF-02 は急速に分解され、7 日後には 1.8%まで低下した。一方、主要代謝物として M1 が生成し、最大で 3 日目に処理量の 92.1%となった。M1 の分解は穏やかで処理 84 日目に 72.9%に低下したが、抽出残渣が処理 84 日目に処理量の 26.9%に増加することから、最終的に土壌有機物に結合するか腐植成分に親和した形態となると推定された。その他の代謝物としては、 が処理 84 日後に痕跡量生成した程度であった。

表 4 : 好氣的湛水条件における [¹⁴C]AF-02 及び分解物の分布

	インキュベーション 期間 (日)	処理量%		mg eq./kg	
		AF-02		AF-02	
非 滅 菌	0 ^{a)}	86.56		0.6904	
	1 ^{a)}	9.57		0.0764	
	3 ^{b)}	3.46		0.0276	
	7 ^{b)}	1.84		0.0147	
	28 ^{b)}	<1.65		<0.0132	
	56 ^{b)}	<1.60		<0.0127	
	70 ^{b)}	<1.91		<0.0153	
	84 ^{b)}	<1.50		<0.0120	
滅 菌	7 ^{b)}	25.80		0.21	
	70 ^{b)}	<3.58		<0.0286	

a) : 水層+土壌抽出液 b) : 土壌抽出液のみ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

結合残留物（抽出残渣）；処理 84 日後の非滅菌土壌の抽出残渣中の放射性成分を腐植成分に分類した。その結果を表 5 に示す。主にソックスレー抽出画分、腐植酸画分、ヒューミン画分に分布し、フルボ酸画分はやや少なかった。

表 5：腐植成分画分中の放射能分布（処理量%）

抽出残渣	ソックスレー抽出画分	フルボ酸画分	腐植酸画分	ヒューミン画分
26.88	9.19	2.72	7.09	8.01

分解速度；

非滅菌土壌における AF-02 濃度の推移をグスタフソン式で解析し、DT₅₀、DT₉₀を算出した（表 6、図 4）。M1 濃度の推移は一次反応式で解析し、DT₅₀、DT₉₀を算出した（表 6、図 5）

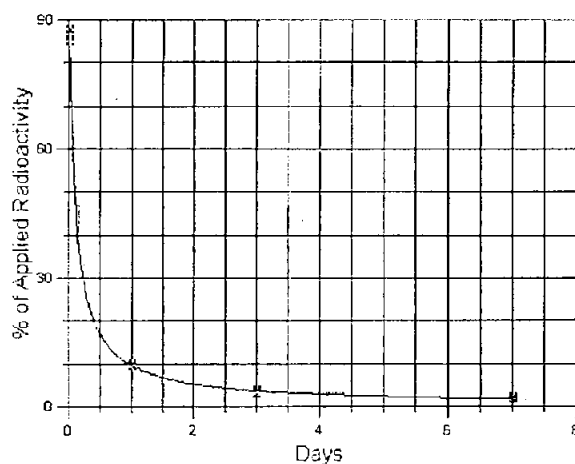


図 4：非滅菌栃木土壌における AF-02 のグスタフソン式減衰速度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

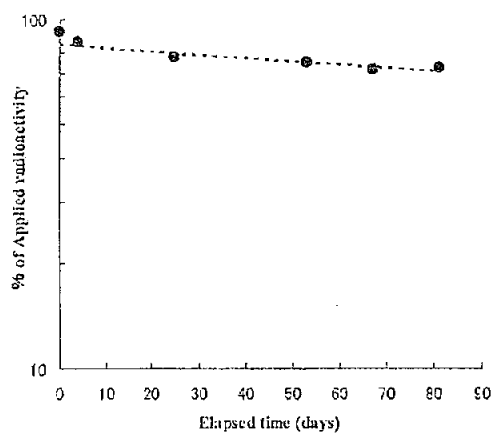


図5：非滅菌栃木土壌におけるM1の一次式減衰速度

表6：AF-02及びM1の土壌中分解速度（DT₅₀およびDT₉₀）

	解析法	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)	相関係数 (r ²)
AF-02	グスタフソン式	0.12	1.12	0.999
M1	一次反応	327	1085	0.875

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Meiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 6 : AF-02 の好氣的湛水条件土壤における推定代謝経路

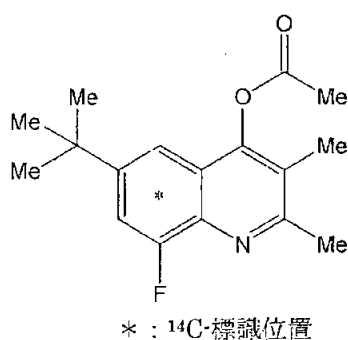
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

3. 土壌中動態に関する試験

(資料 運-9)

2) AF-02 の好氣的土壌中動態

放射性標識化合物： $[^{14}\text{C}]\text{AF-02}$



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-4a,5,6,7,8,8a- ^{14}C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

被験物質 $[^{14}\text{C}]\text{AF-02}$ 溶液の調製；

$[^{14}\text{C}]\text{AF-02}$ をアセトンに溶解して被験物質溶液とした。

供試土壌；表 1 の特性の日本の農耕地土壌(夕張土壌)を 2 mm の篩に通して使用した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 1：供試土壌の採取地および特性

採取地		北海道夕張市
pH	H ₂ O	5.8
	KCl	5.0
	CaCl ₂	5.2
有機炭素 (腐植) (g/kg)		50.5(87.1)
陽イオン交換能 (cmolc/kg)		27.7
リン酸吸収係数 (g/kg)		19.9
粒径分布 (%)	極粗砂 (2.0~1.0mm)	0.6
	粗砂 (1.0~0.5mm)	4.5
	中砂 (0.5~0.25mm)	8.5
	細砂 (0.25~0.1mm)	6.9
	極細砂 (0.1~0.05mm)	4.2
	シルト (0.05~0.002mm)	44.3
	粘土 (0.002mm 以下)	31.0
土性分類 (USDA)		埴壤土
主粘土鉱物		アロフェン、クロライト、 イライト
最大容水量 (%)		82.65

インキュベーション条件；

乾土 30 g 相当の試験土壌 (2 mm 篩別後) を試験容器 (200 mL 容の広口ガラス瓶) に充填し、Milli-Q 水を加えて下記の水分条件に調整したのち、加湿空気を連続通気して下記温度条件の恒温槽で 14 日間プレインキュベートした。試験期間中は適宜 Milli-Q 水を加えて土壌水分を設定範囲内に維持した。

水分	最大容水量の 50%
温度	25 ± 2°C
照明	暗所

土壌の滅菌；

非滅菌土壌と同様のプレインキュベーションを行った夕張土壌の一部について、1 日に 1 回 20 分間のオートクレーブ滅菌を 3 日間行って滅菌土壌を調製した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

被験物質処理；

プレインキュベーション後の試験容器内土壌に、圃場での予定処理量 700 g a.i./ha に相当する 0.7 mg/kg の目標濃度で被験物質溶液を添加したのち、攪拌して ^{14}C AF-02 を均一に分布させた。処理後の各試験容器を揮発性物質捕集装置と連結し、二酸化炭素フリーの加湿空気を連続通気して上記条件でインキュベートした。

揮発性物質捕集剤；

試験容器から排出された空気は 2 本の 1N 水酸化ナトリウムトラップに通して放射性二酸化炭素を連続捕集した。

試料採取；各土壌とも次の各時点で、2 連の試験容器と揮発性物質トラップを採取した。

非滅菌	0、3、7、14、28、56、84 日
揮発性物質	7、14、28、56、84 日
滅菌	7、70 日

土壌微生物の検定；

非滅菌土壌の微生物活性が維持されていたことをバイオマス炭素のクロコホルム薫蒸培養法により確認した。

分析：土壌は 100 mL のアセトニトリルで 1 回振とう抽出し、抽出液を LSC で測定した後、濃縮して HPLC で分析した。残渣を更にアセトニトリル/0.1N 塩酸 (8/2 v/v) 100 mL で 50°C で振とう抽出を 2 回行った。この酸性抽出液を LSC で測定した後、濃縮して HPLC で測定した。最終的な抽出残渣は乾燥した後、燃焼処理を行って、放射能を測定した (図 1)。なお、0 日目の試料はアセトニトリル抽出を 2 回行い、酸性アセトニトリル抽出は行わなかった (図 2)。NaOH トラップは、試料の一部 (2mL) を液体シンチレーション計測 (LSC) して定量した。

HPLC プロファイル測定では、溶出液を 22 の画分に分画した後、放射能フロー検出器により検出し、定量した。放射性ピークまたは分析標品と同じ HPLC 分画に溶出する放射能をそれらの定量値とした。

AF-02 と代謝物の同定は、HPLC (逆相 HPLC) と一次元シリカゲル TLC における標準品とのコクロマトグラフィーによって確認した。TLC 上の放射性物質はラジオイメーjingアナライザーで検出した。放射性二酸化炭素の生成は、NaOH トラップに塩化バリウムを加え、NaOH 溶液中の放射能が $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ 沈殿となって定量的に失われることから確認した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1：土壤中残留物の分析フローシート

図2：0日目試料の土壤中残留物の分析フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

半減期等の算定：以下の方法で算定した。

AF-02 及び M1 の消失を一相性の一次反応とみなして、式 1、式 2 及び式 3 から DT₅₀ 及び DT₉₀ を算出した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (\text{式 1})、 \quad DT_{50} = (\ln 2)/k \quad (\text{式 2})、 \quad DT_{90} = (\ln 10)/k \quad (\text{式 3})$$

k：分解速度定数、C：時間 t における濃度、C₀：初濃度

結 果：

試験系の微生物活性；

非滅菌土壌中の土壌微生物活性は以下の通りであり、試験終了時においても、微生物活性は維持されていた。

非滅菌土壌の微生物バイオマス (mgC/kg 土壌)

試験開始時	試験終了時
61	121

物質収支と土壌中残留物；

表 1 に土壌中および揮発性物質トラップから回収された放射能または放射性成分の処理放射能比 (処理量%) を、表 2 に土壌中の残留物濃度の各推移を示した。設定処理濃度 0.7 mg/kg に対して、0.698 mg/kg の濃度で処理された。これら土壌から試験期間中処理量の 99.9~103.0% が土壌と揮発性物質トラップから回収された (表 3)。

非滅菌土壌では、AF-02 は非生物的作用により急速に分解され、3 日後には 1.5% まで低下した。一方、主要代謝物として M1 が生成し、最大で 3 日目に処理量の 97.5% となった。M1 の分解は穏やかで処理 84 日目に 80.3% に低下した。抽出残渣が処理 84 日目に 16.1% に増加し、二酸化炭素が 0.9% まで増加することから、最終的に土壌有機物に結合するか腐植成分に親和した形態となり、ごく少量は二酸化炭素にまで分解無機化されると推定された。その他の代謝物としては、
が処理 84 日後に最大 3.8% 生成したほか、
が TLC で痕跡量検出された程度であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2：土壤中放射能残留量回収率、 ^{14}C AF-02 及び分解物の分布 (処理量%)

	インキュベーション 期間(日)	抽出液		抽出残渣	$^{14}\text{CO}_2$	総回収率
		合計	AF-02			
非 滅 菌	0	99.13	99.13	0.77	N.M.	99.90
	3	98.99	1.45	2.85	N.M.	101.84
	7	97.12	<1.71	4.71	0.15	101.98
	14	95.67	<1.66	7.13	0.23	103.03
	28	91.92	0.31	9.76	0.38	102.06
	56	86.18	<1.92	13.19	0.64	100.01
	84	84.06	<1.61	16.06	0.85	100.97
滅 菌	7	99.51	9.23	1.04	N.A.	100.56
	70	91.79	1.66	14.69	N.A.	106.48

N.M.): 測定せず N.A.): 試料なし

表 3：土壤中放射能残留量回収率、 ^{14}C AF-02 及び分解物の分布 (放射能濃度、mg eq./kg)

	インキュベーション 期間(日)	抽出液		抽出残渣	$^{14}\text{CO}_2$	総回収率
		合計	AF-02			
非 滅 菌	0	0.6922	0.6922	0.0054	N.M.	0.6976
	3	0.6913	0.0101	0.0199	N.M.	0.7112
	7	0.6783	<0.0119	0.0329	0.0010	0.7122
	14	0.6681	<0.0116	0.0498	0.0016	0.7195
	28	0.6419	0.0021	0.0682	0.0026	0.7127
	56	0.6019	<0.0134	0.0921	0.0045	0.6984
	84	0.5871	<0.0113	0.1121	0.0059	0.7051
滅 菌	7	0.6949	0.0645	0.0073	N.A.	0.7022
	70	0.6410	0.0116	0.1026	N.A.	0.7436

N.M.)測定せず N.A.): 試料なし

添加濃度：0.698 mg/kg

分解速度: AF-02 及び M1 の濃度の推移を一次反応式で解析し、 DT_{50} 、 DT_{90} を算出した(表 4、
図 3 と図 4)。AF-02 の好気条件の非滅菌土壌における DT_{50} 、 DT_{90} はそれぞれ、0.5 日
と 1.6 日であり、M1 の DT_{50} 、 DT_{90} はそれぞれ、280 日と 931 日であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

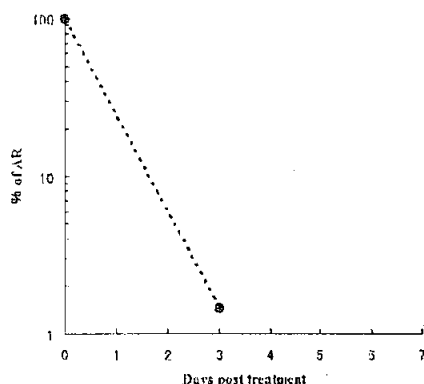


図 3：非滅菌夕張土壌における AF-02 の一次減衰速度

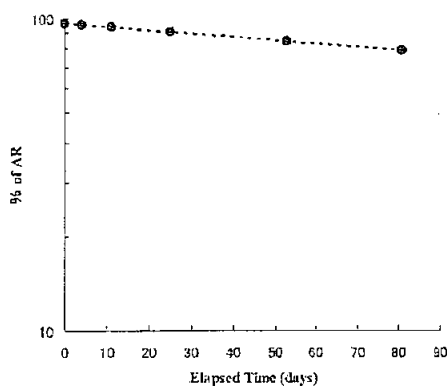


図 4：非滅菌夕張土壌における M1 の一次減衰速度

表 4：AF-02 及び M1 の土壌中分解速度 (DT₅₀ および DT₉₀)

	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)	相関係数 (r ²)
AF-02	0.5	1.6	1.000
M1	280	931	0.970

代謝経路：；

AF-02 は、M1 に急速に分解された。M1 の分解は穏やかであるが、 を經由して、最終的に結合残留物を生成するほか、ごく一部は ¹⁴CO₂ に無機化されるものと推定された。図 2 の推定経路が提示された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 5 : AF-02 の好気条件土壌における推定代謝経路

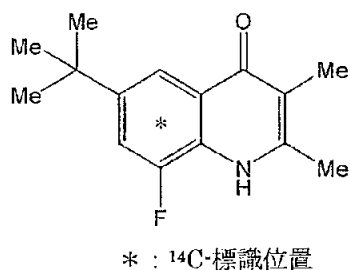
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

3. 土壌中動態に関する試験

(資料 運-10)

3) M1 の嫌氣的土壌中動態

放射性標識化合物： $[^{14}\text{C}]\text{M1}$



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4(1*H*)-[U-4a,5,6,7,8,8a- ^{14}C]quinolinone

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

被験物質 $[^{14}\text{C}]\text{M1}$ 溶液の調製；

$[^{14}\text{C}]\text{M1}$ をアセトンに溶解して被験物質溶液とした。

供試土壌；表1の特性の日本の水田土壌(栃木土壌)を2 mm の篩に通して使用した。

表 1：供試土壌の採取地および特性

採取地		栃木県宇都宮市
pH	H ₂ O	6.4
	KCl	5.5
	CaCl ₂	5.9
有機炭素 (腐植) (g/kg)		76.2(131)
陽イオン交換能 (cmolc/kg)		55.5
粒径分布 (%)	極粗砂 (2.0~1.0mm)	1.2
	粗砂 (1.0~0.5mm)	5.5
	中砂 (0.5~0.25mm)	9.8
	細砂 (0.25~0.1mm)	11.3
	極細砂 (0.1~0.05mm)	6.6
	シルト (0.05~0.002mm)	37.7
	粘土 (0.002mm 以下)	27.9
土性分類 (USDA)		埴壤土
主粘土鉱物		アロフェン
最大容水量 (%)		126.64

インキュベーション条件；乾土 55 g 相当の試験土壌 (2 mm 篩別後) を試験容器 (200 mL 容の広口ガラス瓶) に充填し、Milli-Q 水 62 mL を加えて湛水状態とした。各試験容器のヘッドスペースを窒素で十分に置換し、ブチルゴムセンで密栓したのち、下記温度条件の恒温槽で 39 日間ブレインキュベートした。

温 度	25 ± 2°C
照 明	暗 所

還元層形成の確認；ブレインキュベーション終了時 (被験物質添加時) に酸化還元電位(Eh)が土壌下層部で 0 mV 以下であることを確認した。

被験物質処理；ブレインキュベーション後の試験容器内の湛水土壌の水層に、圃場での予定処理量 800 g/ha に相当する 0.8 mg/kg の目標濃度で被験物質溶液を添加した後、攪拌して [¹⁴C]M1 を試験系全体に均一に分布させた。処理後の各試験容器のヘッドスペースを窒素で十分に置換し、ブチルゴムセンで密栓した後、上記条件でインキュベートした。土壌沈降後の土壌厚は 5.5 cm、水深 1.0 cm であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

揮発性物質捕集剤；好氣的湛水土壤中運命試験の結果より、揮発性物質の生成は痕跡量であったため、本試験においては揮発性物質の捕集は実施しなかった。

試料採取；次の各時点で、2連の試験容器を採取した。

試料採取	0、3、7、14、28、56、84 日後
------	----------------------

分 析：

傾斜法により水層と土壌を分離した。

水層試料；直接 LSC で分析して、放射エネルギーを測定した。

土壌； 150 mL のアセトニトリルで 30 分間 1 回振とう抽出し、LSC で分析した後、アセトニトリル抽出液を濃縮して IPLC で分析した。残渣を 150 mL のアセトニトリル/0.1N 硫酸 (8/2 v/v) 150 mL で 2 回抽出し、それぞれの酸性アセトニトリル抽出液を LSC で分析した。これを合わせた後、濃縮して HPLC で分析した。最終時点の抽出残渣試料については、腐植成分の分画を行って分析した。土壌の抽出方法を図 1 に、腐植成分の分析方法を図 2 に示す。

HPLC プロファイル測定では、溶出液を 22 の画分に分画した後、放射能フロー検出器により検出し、定量した。放射性ピークまたは分析標品と同じ HPLC 分画に溶出する放射能をそれらの定量値とした。

M1 と代謝物の同定は、HPLC (逆相 HPLC) と一次元シリカゲル TLC における標準品とのクロマトグラフィーによって確認した。TLC 上の放射性物質はラジオイメージングアナライザーで検出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1：水層及び土壌中残留物の分析フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 2 : 腐植画分の分析フローシート

M1 の半減期等の算定 ;

M1 の消失を一相性の一次反応とみなして、式 1、式 2 及び式 3 から DT_{50} 及び DT_{90} を算出した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (\text{式 1})、 \quad DT_{50} = (\ln 2)/k \quad (\text{式 2})、 \quad DT_{90} = (\ln 10)/k \quad (\text{式 3})$$

k : 分解速度定数、 C : 時間 t における濃度、 C_0 : 初濃度

結 果

物質収支と土壤中残留物；

表 2 に水層及び土壤中から回収された放射能または主要放射性成分の処理放射能比（処理量％）を、表 3 に土壤中の残留物濃度の各推移を示した。

設定処理濃度 0.8 mg/kg に対して、0.799 mg/kg の濃度で処理された。これら土壤から試験期間中処理量の 98.7～101.8％が水層と土壤から回収された。

水層に検出される放射能は少なく、0 日目から処理量の 1.3％となった。M1 は 0 日目に最大で処理量の 93.3％となった後、穏やかに分解し、処理 84 日目に 62.6％に低下したが、抽出残渣が処理 84 日目に処理量の 34.3％に増加することから、最終的に土壤有機物に結合するか腐植成分に親和した形態となると推定された。その他の代謝物としては、 が TLC で痕跡量検出された程度であった。

表 2：放射能分布および物質収支（処理量％）

インキュベーション期間（日）	水層	土 壤			総回収率
		抽出液		抽出残渣	
		M1	その他		
0	1.32	93.34	1.96	2.10	98.71
3	0.43	88.74	1.66	9.46	100.30
7	0.25	85.36	2.00	14.17	101.77
14	0.16	75.61	3.45	19.72	98.94
28	0.10	69.78	4.32	25.38	99.58
56	0.10	66.88	1.48	31.19	99.64
84	0.08	62.59	2.61	34.32	99.59

表 3：土放射能分布および物質収支（放射能濃度、mg eq./kg）

インキュベーション期間（日）	水層	土 壤			総回収率
		抽出液		抽出残渣	
		M1	その他		
0	0.0105	0.7460	0.0156	0.0168	0.7889
3	0.0035	0.7093	0.0133	0.0756	0.8016
7	0.0020	0.6822	0.0160	0.1132	0.8134
14	0.0013	0.6043	0.0276	0.1576	0.7908
28	0.0008	0.5577	0.0346	0.2028	0.7959
56	0.0008	0.5345	0.0118	0.2493	0.7964
84	0.0006	0.5002	0.0209	0.2743	0.7960

処理濃度：0.799mg/kg

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

結合残留物（抽出残渣）；

処理後 84 日の抽出残渣中の放射性成分を分画した。その結果を表 4 に示す。ほぼ均等にソックスレー抽出画分、フルボ酸画分、腐植酸画分、ヒューミン画分に分布していた。

表 4：腐植成分画分中の放射能分布（処理量%）

抽出残渣	ソックスレー抽出画分	フルボ酸画分	腐植酸画分	ヒューミン画分
34.32	9.67	8.71	9.57	7.18

分解速度；

栃木土壌における M1 濃度の推移を一次反応式で解析し、DT₅₀、DT₉₀を算出した。

（表 5、図 3）

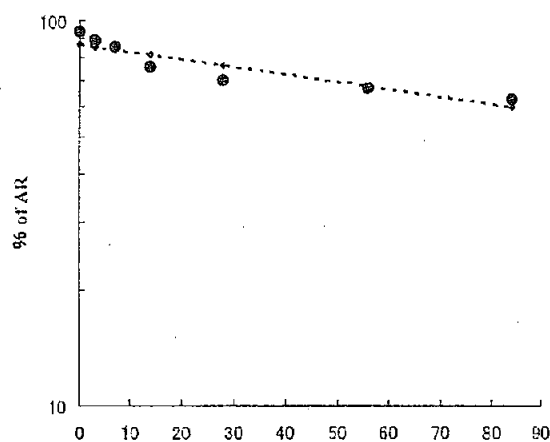


図 3：栃木土壌における M1 の一次式減衰速度

表 5：M1 の土壌中分解速度（DT₅₀ および DT₉₀）

	解析法	DT ₅₀ （日）	DT ₉₀ （日）	相関係数 (r ²)
M1	一次反応	157	520	0.833

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Meiji Seikaファルマ株式会社にある。

図4：M1の嫌気条件土壌における推定代謝経路

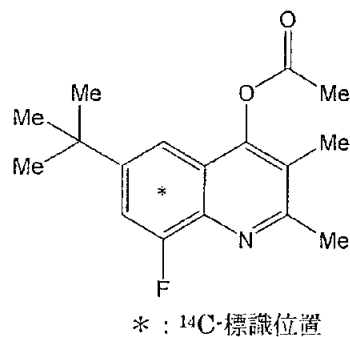
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

4. 水中動態に関する試験

(資料 運-11)

1) AF-02 の加水分解動態試験

放射性標識化合物：[¹⁴C]AF-02



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-4a,5,6,7,8,8a-¹⁴C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

農林水産省、米国 EPA のガイドラインに準拠して、pH 4、5、7、9 において 25℃で試験した。

被験物質[¹⁴C]AF-02 溶液の調製；

[¹⁴C]AF-02 をアセトニトリルに溶解して被験物質溶液とした。

試験系および被験物質の添加；

pH 4、5、7、9 の下記 4 種類の緩衝液について窒素ガスを 5 分間通気して緩衝液中の酸素を除去し、次いでポアサイズ 0.22 μm の滅菌フィルターで滅菌した。これに[¹⁴C]AF-02 のアセトニトリル溶液を加えて[¹⁴C]AF-02 濃度約 1 mg/L (溶解補助剤であるアセトニトリル濃度は約 1%) の試験溶液を調製した。この試験濃度は AF-02 の水溶解度 (20.2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

mg/L、20°C) を十分に下回るものである。滅菌した 100 mL の褐色ガラスバイアルに試験溶液 100 mL を分注して試験系とした。

緩衝液；以下の緩衝液を用いた。

pH 4	<0.01M クエン酸緩衝液> 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 18mL 及び 0.1M クエン酸一カリウム水溶液 100mL に水を加えて 1000mL とし、これに 0.1M 塩酸水溶液を加えて目標の pH に調整した。
pH 5	<0.01M 酢酸緩衝液> 0.2M 酢酸水溶液 14.5mL 及び 0.2M 酢酸ナトリウム水溶液 35.5mL に水を加えて 1000mL とした。
pH 7	<0.01M リン酸緩衝液> 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 59.3mL 及び 0.1M リン酸一カリウム水溶液 100mL に水を加えて 1000mL とし、これに 0.1M 塩酸水溶液を加えて目標の pH に調整した。
pH 9	<0.01M 塩化カリウム/ホウ酸緩衝液> 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 42.6mL 及び 0.1M 塩化カリウム/ホウ酸水溶液 100mL に水を加えて 1000mL とした。

インキュベーション条件；

25 ± 1°C の恒温室内、暗条件で最長 30 日間インキュベートした。

試料採取；

次の 7 時点で各 pH につき 2 点の試験容器からその一部を採取した。

pH 4	0、1、2、4、7、14、30 日
pH 5	0、1、3、7、14、21、30 日
pH 7	0、1、3、7、14、21、30 日
pH 9	0、4、10 時間及び 1、2、7、30 日

分析：

試験溶液の一部を採取し、放射能濃度、および HPLC によるプロファイルを測定した。HPLC プロファイルでは参照化合物の混合溶液を試験溶液に添加して、HPLC に注入し、HPLC 用フロースルー型放射能検出器により各成分を定量した。AF-02 及び分解物の確

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

認は、標準品との HPLC コクロマトグラフィー及び TLC コクロマトグラフィーで行った。

0 時点および 30 日後の試料の一部を塗抹培養法により微生物数を計測し、滅菌状態を検証した。

半減期等の算出；

AF-02 の消失を一次反応と見なして式 1、式 2 及び式 3 から DT_{50} 及び DT_{90} を算出した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (\text{式 1}), \quad DT_{50} = \ln 2/k \quad (\text{式 2}), \quad DT_{90} = \ln 10/k \quad (\text{式 3})$$

k : 分解速度定数、C : 時間 t における濃度、 C_0 : 初濃度

結 果：

滅菌状態の維持；

各 pH の 0 時点および 30 日間静置した試料中における微生物数を計数し、試験期間中滅菌が維持されていたことが確認された。

pH の維持；

0 時点および 30 日間静置した試料における pH を計測し、ほぼ設定された pH に保たれていることが確認された。

放射能回収率および分解物プロファイル；

各 pH および採取時点における試験溶液中放射能の処理放射能に対する割合 (%) と HPLC 分析結果を表 1-1 及び表 1-2 に示す。

pH 4、5、7、9 のいずれの pH においても、インキュベーション期間 0 日では処理した放射能は定量的に回収されており、被験物質が分析試料の調製操作中において安定であること、ならびに試験容器壁面への吸着のないことが確認された。

全ての pH および採取時点で処理放射能は定量的に回収された (全試料の回収率、pH 4: 100.1~102.6%、pH 5: 100.1~103.4%、pH 7: 99.2~102.9%、pH 9: 100.9~103.9%)。

全ての pH において 30 日間のインキュベーションで AF-02 の分解が認められた。AF-02 以外に検出された分解物はほぼ全てが M1 であり、他に痕跡量程度の放射能が認められたのみであった。

一次反応式から推定される AF-02 の 25°C における半減期は、pH 4 では 3.3 日、pH 5 では 21.3 日、pH 7 では 40.6 日、pH 9 では 0.6 日であった (表 2 及び図 1-1~図 1-4)。

想定される分解経路

AF-02 はエステル結合の開裂による脱アセチル化により、M1 を生成した。生成した M1 は加水分解的に安定であると考えられた。図 2 に加水分解経路を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 1-1: 各 pH における放射能回収率および HPLC プロファイル (処理放射能に対する%)

期間 (日)	pH 4		pH 5		pH 7		pH 9	
	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02
0	100.1	99.7	101.9	101.9	99.4	98.4	102.2	100.9
0.167	--	--	--	--	--	--	100.9	80.3
0.417	--	--	--	--	--	--	101.4	60.8
1	102.2	81.4	102.4	98.5	102.9	99.5	101.1	28.3
2	101.3	63.5	--	--	--	--	103.0	8.6
3	--	--	100.1	90.6	99.2	92.5	--	--
4	100.9	42.6	--	--	--	--	--	--
7	100.7	21.5	100.8	79.1	100.4	86.9	103.9	<0.9
14	102.6	5.1	102.2	64.4	100.9	77.3	--	--
21	--	--	103.4	50.5	102.0	70.1	--	--
30	100.7	<0.9	103.3	38.3	101.6	58.9	103.2	<0.9

数値は 2 反復試料の平均値、-- : 該当試料なし

表 1-2: 各 pH における放射能回収率および HPLC プロファイル (放射能濃度、mg eq./L)

期間 (日)	pH 4		pH 5		pH 7		pH 9	
	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02	回収 ¹⁴ C	AF-02
0	0.992	0.988	1.009	1.009	0.983	0.975	1.013	1.000
0.167	--	--	--	--	--	--	1.000	0.795
0.417	--	--	--	--	--	--	1.005	0.602
1	1.012	0.807	1.015	0.975	1.020	0.986	1.002	0.280
2	1.003	0.629	--	--	--	--	1.020	0.085
3	--	--	0.992	0.897	0.983	0.916	--	--
4	1.000	0.422	--	--	--	--	--	--
7	0.997	0.213	0.999	0.783	0.994	0.861	1.030	<0.009
14	1.016	0.050	1.012	0.638	0.999	0.766	--	--
21	--	--	1.024	0.500	1.010	0.694	--	--
30	0.998	<0.009	1.023	0.379	1.007	0.584	1.022	<0.009

数値は 2 反復試料の平均値、-- : 該当試料なし

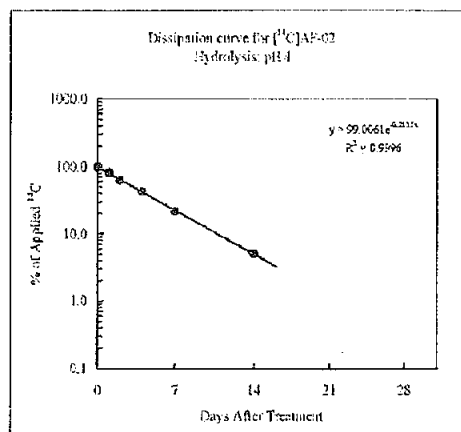


図 1-1 pH4 における AF-02 の一次式減衰速度

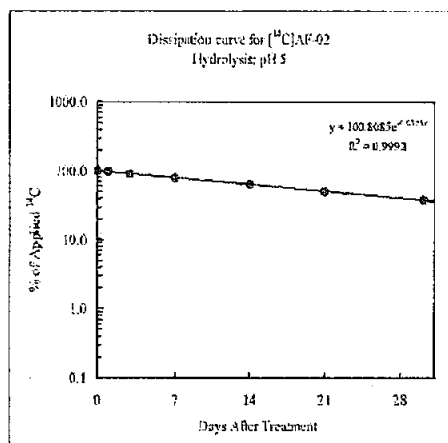


図 1-2 pH5 における AF-02 の一次式減衰速度

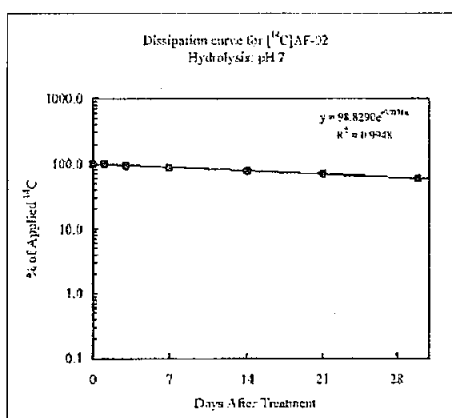


図 1-3 pH7 における AF-02 の一次式減衰速度

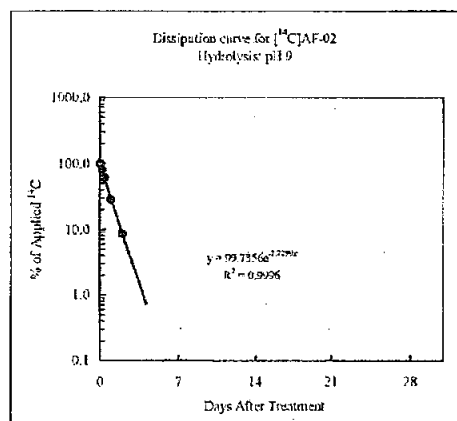


図 1-4 pH9 における AF-02 の一次式減衰速度

表 2 AF-02 の加水分解半減期 (25℃)

	DT ₅₀ (日)	DT ₉₉ (日)	r ²
pH 4	3.25	10.79	0.9996
pH 5	21.33	70.84	0.9993
pH 7	40.58	134.81	0.9948
pH 9	0.56	1.87	0.9996

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 2 AF・02 の加水分解経路

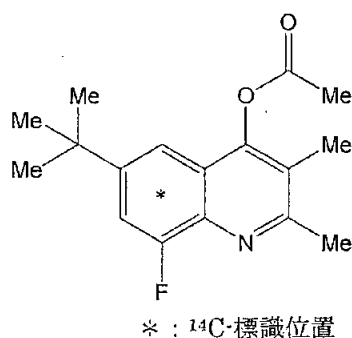
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

4. 水中動態に関する試験

(資料 運-12)

2) AF-02 の水中光分解動態試験

放射性標識化合物：[¹⁴C]AF-02



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-4a,5,6,7,8,8a-¹⁴C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能（施用液中）：

標識位置選定理由：

試験方法：

被験物質[¹⁴C]AF-02 溶液の調製；

[¹⁴C]AF-02 をアセトニトリルに溶解して被験物質溶液とした。

試験系；

希薄緩衝液と田面水の 2 条件で実施した。緩衝液は加水分解的に最も安定である pH7 とした。自然水には、水田に使用する剤であることから、水田の田面水（採取場所：財団法人日本植物調節剤研究協会研究所、採取年月日：2007 年 7 月 27 日）を用いた。いずれも、ポアサイズ 0.22 μm の滅菌フィルターで滅菌後、使用した。

試験容器；

光照射区用には石英試験管を、暗所対照区用にはアルミホイルで覆った石英試験管を使用した。いずれも滅菌して使用した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

被験物質の添加；

[¹⁴C]AF-02 のアセトニトリル溶液を滅菌緩衝液および滅菌田面水 5 mL に加えて、
[¹⁴C]AF-02 濃度約 1.0 mg/L (溶解補助剤であるアセトニトリル濃度は約 1%) の試験溶液を調製した。この試験濃度は AF-02 の水溶解度 (20.2 mg/L、20℃) を十分に下回るものである。

揮発性物質の捕集；

照射・インキュベーション条件；

290 nm 以下及び 800 nm 以上の光をカットする UV フィルターを通したキセノンショートアーク光を光源とした装置で試験を実施した (照射区)。試料設置面での平均光強度は 290~800 nm で 189.1 W/m²、300~400 nm で 21.4 W/m²であった。

試験容器は平均水温 25±1℃となるように温度設定した実験室内に設置し、最長 14 日間連続照射した。

暗所対照区試料は、25 ± 1℃の恒温室内、暗条件で最長 14 日間インキュベートした。

試料採取；光照射区、暗所対照区ともに次の各時点で試料 (試験容器) を採取した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

緩衝液：0、0.25、1、2、3、7及び14日

田面水：0、0.25、1、2、3、7及び14日

量子収率測定；

AF-02の量子収率は*p*-ニトロアセトフェノンとピリジンから成る化学光量計を用いて、Dulin および Mill の方法に準じて測定した。

分析：

試験溶液の一部を採取し、放射能濃度および HPLC 分析によるプロファイルを測定した。また、揮発性成分については、水酸化ナトリウムトラップに捕集された放射能について、バリウム沈殿法を用いて放射性二酸化炭素である確認を行った。放射能はすべて液体シンチレーション計測法 (LSC) で定量した。HPLC プロファイル測定では試験溶液に参照標品の混合溶液を添加後、HPLC に注入し、HPLC 用フロースルー型放射能検出器により各成分を定量した。AF-02 及び分解物の確認は、参照標品との HPLC コクロマトグラフィー、及び一次元 TLC コクロマトグラフィーの2つの方法で行った。

滅菌状態及び pH の確認；

0 時点および最終採取時点の試料の一部を平板培養して微生物数を計測し、滅菌状態を検証した。また、pH の確認を行った。

分解速度および DT₅₀、DT₉₀ の算定；

AF-02 の消失を一次反応と見なして式 1、式 2 及び式 3 から DT₅₀ 及び DT₉₀ を算出した。
 $\ln C = -kt + \ln C_0$ (式 1)、 $DT_{50} = (\ln 2)/k$ (式 2)、 $DT_{90} = (\ln 10)/k$ (式 3)
k：分解速度定数、C：時間 t における濃度、C₀：初濃度

また、本試験では暗所対照区においても被験物質の有意な減少が認められた。そこで、暗条件での加水分解反応を排除した、光反応のみによる減衰を評価するため、式 4 により正味の光分解定数を算出した。算出した正味の光分解定数を式 2 及び式 3 に代入し、光反応のみに起因する DT₅₀ 及び DT₉₀ を求めた。

$$K_{net\ photolysis} = K_{irradiated} - K_{dark} \quad (\text{式 4})$$

K_{net photolysis}：正味の光分解速度定数

K_{irradiated}：光照射区より算出された分解速度定数

K_{dark}：暗所対照区より算出された分解速度定数

自然太陽光下での半減期は、春 (4~6 月) の東京 (N35°) における自然太陽光の 1 日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

積算照度 (300~400 nm) が 0.672 mJ/m² (=7.78 W/m²) であり、試験条件のキセノン光の 1 日間が自然太陽光の 2.75 日間に相当することから、東京の春の太陽光に対する半減期も算定した (21.4÷7.78=2.75)。この換算係数を用いて、自然太陽光下での光反応のみに起因する分解速度定数を求め ($K_{estimated\ net\ photolysis\ in\ Tokyo} = K_{net\ photolysis} / 2.75$)、これを式 2 及び式 3 に代入し、東京の春における光反応のみに起因する DT₅₀ 及び DT₉₀ を求めた。更に加水分解反応を加味した自然条件下における水中での分解速度定数を計算し ($K_{estimated\ net\ photolysis\ in\ Tokyo} + K_{dark}$)、同様に東京の春における自然条件での DT₅₀ 及び DT₉₀ を求めた。

結 果:

滅菌状態の維持;

緩衝液および田面水の 0 時点および最終採取時点の試料で微生物数を計数し、試験期間中滅菌が維持されていたことが確認された。

pH の維持; 0 時点と最終時点の pH は表 1 に示す通りであり、試験期間中、試験溶液の pH は概ね設定 pH に維持されていた。

表 1: 0 時点及び最終時点における試験溶液の pH

		0 日目	最終時点 (14 日目)
緩衝液(pH 7)	光照射区	7.00	7.06
	暗所対照区	7.08	7.02
田面水	光照射区	7.29	7.46
	暗所対照区	7.43	7.43

分解速度および分解物;

各採取時点における試験溶液及び揮発性物質捕集液の処理放射エネルギーに対する割合 (%) と濃度 (mg/L; 揮発性物質については試験溶液中濃度に換算した濃度) を表 2-1 及び表 2-2 に示す。

全ての試験水および採取時点で処理放射能は定量的に回収された (緩衝液: 94.0~102.7%、田面水: 91.0~102.0%)。また、揮発性物質 (放射性二酸化炭素) は、最終時点において、緩衝液で 13.1%、田面水で 17.6% の発生が認められた。暗所対照区では揮発性物質の発生は認められなかった。

緩衝液では、AF-02 は経時的に減少し、主に (最大 41.8%) 及び M1 (最大 1.2%) を生成した。その他、いくつかの未同定分解物を認めたが、10% を越えるものはなかった。最終時点 (14 日目) には AF-02 は 3.6%、 は 20.5% まで減少し、多成分の混

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

合物である高極性成分(Polars)が23.0%まで増加した。

田面水においても、AF-02は経時的に減少し、
を生成した。その他、未同定の分解物を主にHPLCの画分番号1
及び2に認めたと、10%を越えるものはなかった。その他、いくつかの未同定分
解物を認めた。最終時点にはAF-02、M1及び2は検出限界以下まで減少し、多成分
の混合物であるHPLCの画分番号3-4の高極性成分(Polars)が26.8%まで増加した。

一方、暗所対照区においては、緩衝液、田面水それぞれにおいて最終採取時点でAF-02
が75.9%及び2.1%まで減少し、M1が25.5%及び96.0%に増加した。その他の分解物
はほとんど認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2-1 緩衝液における物質収支及び HPLC プロファイル

	照射 時間 (日)	溶液			揮発性物質		合計
		AF-02	その他	小計	グリ コー ル	NaOH	
照射区	0	99.5	<0.6	100.0	N.A.	N.A.	100.0
	0.25	95.8	<1.3	102.7	<0.1	<0.1	102.7
	1	82.9	0.5	99.5	<0.1	0.2	99.6
	2	59.9	1.8	98.8	<0.1	0.7	99.5
	3	45.3	4.2	98.7	<0.1	1.4	100.1
	7	11.7	17.6	91.9	<0.1	5.7	97.6
	14	3.6	25.6	80.8	0.1	13.1	94.0
対照区	0	101.2	<1.2	101.2	N.A.	N.A.	101.2
	0.25	99.4	<1.3	99.4	<0.1	<0.1	99.4
	1	98.4	<1.2	100.7	<0.1	<0.1	100.7
	2	100.7	<1.3	104.8	<0.1	<0.1	104.8
	3	96.8	0.5	104.3	<0.1	<0.1	104.3
	7	87.0	0.5	100.6	<0.1	<0.1	100.6
	14	75.9	<1.3	101.5	<0.1	<0.1	101.5
照射区	0	1.013	0.006	1.018	N.A.	N.A.	1.018
	0.25	0.976	<0.014	1.046	<0.001	<0.001	1.046
	1	0.844	0.005	1.013	<0.001	0.002	1.014
	2	0.610	0.018	1.006	<0.001	0.007	1.013
	3	0.461	0.043	1.004	<0.001	0.015	1.019
	7	0.119	0.180	0.936	<0.001	0.058	0.993
	14	0.036	0.260	0.823	0.001	0.133	0.957
対照区	0	1.031	<0.012	1.031	N.A.	N.A.	1.031
	0.25	1.012	<0.014	1.012	<0.001	<0.001	1.012
	1	1.002	<0.012	1.025	<0.001	<0.001	1.025
	2	1.025	<0.014	1.067	<0.001	<0.001	1.067
	3	0.986	0.005	1.062	<0.001	<0.001	1.062
	7	0.886	0.005	1.024	<0.001	<0.001	1.024
	14	0.773	<0.013	1.033	<0.001	<0.001	1.033

N.A.)試料なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2-2 田面水における物質収支及びHPLC プロファイル

	照射 時間 (日)	溶液			揮発性物質		合計	
		AF-02	Polars (HPLC #3-4)	その他	小計	グリ コー ル		NaOH
照射区	0	100.2	<1.2	<1.2	100.2	N.A.	N.A.	100.2
	0.25	96.8	<1.5	<1.4	102.0	<0.1	<0.1	102.0
	1	80.7	0.7	1.4	101.5	<0.1	0.1	101.6
	2	51.3	2.5	14.2	95.8	<0.1	0.6	96.4
	3	33.1	7.1	19.6	97.9	0.1	1.6	99.5
	7	3.4	17.1	39.4	86.7	0.1	7.8	94.5
	14	<1.6	26.8	34.6	73.2	0.1	17.6	91.0
対照区	0	102.5	<1.4	<1.3	102.5	N.A.	N.A.	102.5
	0.25	99.3	<1.4	<1.3	102.6	<0.1	<0.1	102.6
	1	87.8	<1.3	<1.2	103.2	<0.1	<0.1	103.2
	2	64.7	<1.3	<1.2	105.0	<0.1	<0.1	105.0
	3	45.2	<1.3	<1.2	102.4	<0.1	<0.1	102.4
	7	11.0	<1.4	<1.4	101.9	<0.1	<0.1	101.9
	14	2.1	<1.3	<1.2	98.1	<0.1	<0.1	98.1
照射区	0	1.020	<0.013	<0.012	1.020	N.A.	N.A.	1.020
	0.25	0.986	<0.015	<0.015	1.038	<0.001	<0.001	1.038
	1	0.822	0.007	0.014	1.033	<0.001	0.001	1.035
	2	0.522	0.026	0.144	0.975	<0.001	0.006	0.981
	3	0.337	0.072	0.199	0.997	0.001	0.016	1.013
	7	0.035	0.175	0.401	0.883	0.001	0.079	0.964
	14	<0.016	0.273	0.352	0.746	0.001	0.179	0.926
対照区	0	1.044	<0.014	<0.014	1.044	N.A.	N.A.	1.044
	0.25	1.010	<0.014	<0.013	1.044	<0.001	<0.001	1.044
	1	0.894	<0.013	<0.013	1.051	<0.001	<0.001	1.051
	2	0.659	<0.013	<0.013	1.069	<0.001	<0.001	1.069
	3	0.460	<0.013	<0.012	1.043	<0.001	<0.001	1.043
	7	0.112	<0.015	<0.014	1.038	<0.001	<0.001	1.038
	14	0.021	<0.013	<0.012	0.999	<0.001	<0.001	0.999

N.A.): 試料なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

以上、表 2-1 および表 2-2 に示したように、 の最大生成量が緩衝液と田面水でそれぞれ 41.8% と 12.2% であった点、田面水においては M1 が最大 4.1% と有意に認められた点、および微量分解物 () の最大生成量が緩衝液では、 % であったのに対し、田面水では、 % であり、両者に差が認められた点から、AF-02 の分解物プロファイルは緩衝液と田面水で差があると考えられた。これは、緩衝液では加水分解速度が遅いため主に AF-02 自身が光分解を受けるのに対し、田面水では AF-02 が加水分解された M1 も光分解を受けるために生じていると推測された。いずれの条件においても、添加放射能の 10% を超えて検出された主要な分解物は、 のみであった。

表 3 に試験条件下および春の東京における自然太陽光下での光分解による 50% 消失期および 90% 消失期をまとめた。

表 3 : 試験条件下および春 (4~6 月) の東京における AF-02 の DT₅₀ および DT₉₀

		試験条件				太陽光 (東京、春)		
		DT ₅₀ (H)	DT ₉₀ (H)	分解定数 (/日)	r ²	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)	分解定数 (/日)
緩衝液	照射区	2.8	9.3	0.248	0.981	8.4 ^{b)}	27.9 ^{b)}	0.083 ^{b)}
	対照区	33.4	110.8	0.021	0.974	33.4 ^{c)}	110.8 ^{c)}	0.021 ^{c)}
	正味の光分解	3.0 ^{a)}	10.1 ^{a)}	0.227 ^{a)}	—	6.7 ^{d)}	22.3 ^{d)}	0.103 ^{d)}
田面水	照射区	1.4	4.7	0.492	0.986	9.4 ^{b)}	31.1 ^{b)}	0.074 ^{b)}
	対照区	2.4	8.0	0.288	0.993	2.4 ^{c)}	8.0 ^{c)}	0.288 ^{c)}
	正味の光分解	3.4 ^{a)}	11.3 ^{a)}	0.204 ^{a)}	—	1.9 ^{d)}	6.4 ^{d)}	0.362 ^{d)}

a) 試験条件下における正味の光分解定数 = 照射区の分解定数 - 対照区の分解定数

b) 自然太陽光下での光分解のみに起因する分解定数 = 試験条件下における正味の光分解定数 / 換算係数

c) 自然条件下での加水分解定数 = 暗所対照区の分解定数

d) 自然条件下での分解定数 = 太陽光換算した正味の光分解定数 + 暗所対照区の分解定数

量子収率 : AF-02 の直接的な光分解反応における量子収率 $\phi_{\text{AF-02}}$ は 1.87×10^{-3} と算出された。

光分解経路 :

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1 AF-02 の水中光分解経路

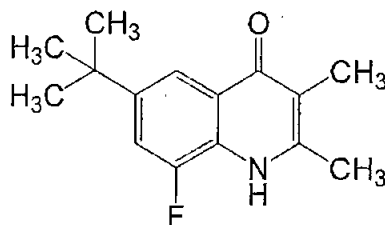
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

4. 水中動態に関する試験

(資料 運-12-1)

3) AF02-M1 の水中光分解試験

被験物質：AF02-M1



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4(1*H*)-quinolinone

純度：

試験方法：

試験溶液の調製；

AF02-M1 をアセトニトリルに溶解して 100mg/L の被験物質溶液とした。

供試水溶液；

[¹⁴C]AF-02 の水中光分解運命試験で用いた pH7 の緩衝液を用いた。0.1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 59.3mL および 0.1mol/L リン酸一カリウム水溶液 100mL に水を加えて 1000mL とし、0.1mol/L 塩酸水溶液を滴下して pH7.0 に調整した。ポアサイズ 0.22 μm の滅菌フィルターで滅菌後、使用した。

試験容器；

光照射区用には石英試験管を、暗所対照区用には褐色ガラス製試験管を使用した。いずれも滅菌して使用した。

被験物質の添加；

AF02-M1 のアセトニトリル溶液を滅菌緩衝液 5 mL に加えて、AF02-M1 濃度約

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

1.0 mg/L (溶解補助剤であるアセトニトリル濃度は約 1%) の試験溶液を調製した。

照射・インキュベーション条件；

290 nm 以下及び 800 nm 以上の光をカットする UV フィルターを通したキセノンショートアーク光を光源とした装置で試験を実施した (照射区)。試料設置面での平均光強度は 290~800 nm で 197.3 W/m²、300~400 nm で 21.7 W/m²であった。

試験容器は平均水温 25±2℃となるように温度設定した装置内に設置し、最長 24 時間連続照射した。

暗所対照区試料は、25 ± 2℃の恒温室内でインキュベートした。

試料採取；

光照射区、暗所対照区ともに 0、1、2、3、4、6、9 及び 24 時間後に試料 (試験容器) を採取した。

分析；

試験溶液の全量を 10mL 容のメスフラスコに移し、アセトニトリルで試験容器を洗い込み、10mL に定容したものを検液とした。検液は速やかに HPLC(UV 検出)で分析した。

滅菌状態及び pH の確認；

0 時点および最終採取時点の試料の一部を平板培養して微生物数を計測し、滅菌状態を検証した。また、pH の確認を行った。

分解速度および DT₅₀、DT₉₀ の算定；

AF02-M1 の消失を一次反応と見なして式 1、式 2 及び式 3 から DT₅₀ 及び DT₉₀ を算出した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (\text{式 1})、\quad DT_{50} = (\ln 2)/k \quad (\text{式 2})、\quad DT_{90} = (\ln 10)/k \quad (\text{式 3})$$

k : 分解速度定数、C : 時間 t における濃度、C₀ : 初濃度

自然太陽光下での半減期は、春 (4~6 月) の東京 (N35°) における自然太陽光の 1 日積算照度 (300~400 nm) が 0.672 mJ/m² (=7.78 W/m²) であり、試験条件のキセノン光の 1 日間が自然太陽光の 2.79 日間に相当する (21.7÷7.78=2.79) ことから、東京の春の太陽光に対する半減期も算定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

結 果：

滅菌状態の維持；

0 時点および最終時点の試料で微生物数を計数し、試験期間中滅菌が維持されていたことが確認された。

pH の維持；

0 時点と最終時点の pH は表 1 に示す通りであり、試験期間中、試験溶液の pH は設定 pH に維持されていた。

表 1：0 時点及び最終時点における試験溶液の pH

		0 時点	最終時点 (24 時間後)
緩衝液(pH 7)	光照射区	7.00	7.01
	暗所対照区	7.00	7.00

分解速度；

AF02-M1 の濃度推移を表 2 に、減衰グラフを図 1 に示す。

表 2：AF02-M1 の濃度推移

測定時点 (hr)	照射区		対照区	
	濃度(mg/L)	残存率(%)	濃度(mg/L)	残存率(%)
0				
1				
2				
3				
4				
6				
9				
24				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 1 : AF02-M1 の減衰グラフ

半減期の推定；

AF02-M1 の消失を一次反応と見なしてDT50及びDT90を算出した。結果を表3に示す。

表 3 AF02-M1 のDT50及びDT90 (単位：時間)

分解速度定数	試験条件		東京, 春	
	DT50	DT90	DT50	DT90
0.2385	2.91	9.65	8.1	26.9

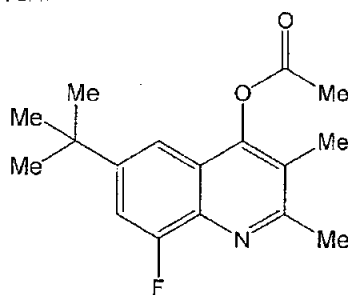
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

5. 土壌吸着性試験

(資料 渾-13)

1) AF-02 の土壌吸着性試験

被験物質：AF-02 純品



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-quinolyl acetate

純度：

試験土壌：使用した5種類の土壌名とその特性を表1に示す。供試土壌は、全て2 mmの篩を通過させ、水分含有量を測定した風乾土壌である。

表 1 試験土壌の特性

土壌試料名					
採取場所					
OECD 土壌タイプ	3	4	2	1	5
土性 (USDA)	SL:砂壤土	L: 壤土	SiCL:シルト質埴土	SiC: シルト質埴土	S: 砂土
砂 (%)	56.8	50.8	16.3	11.1	94.4
シルト (%)	30.3	32.0	50.1	42.3	2.1
粘土 (%)	12.9	17.2	33.6	46.6	3.5
有機炭素含有率 (%)	2.86	0.47	8.93	4.15	0.07
有機物含有率 (%)	4.93	0.81	15.4	7.15	0.12
pH in 0.01 mol/L CaCl ₂	5.6	5.9	4.7	5.7	8.4
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	21.8	11.6	39.4	32.3	2.3
リン酸吸収係数 (g/kg)	13.9	3.2	26.1	11.8	0.8
土壌水分量 (%)	3.50~4.27	0.93	11.0~17.1	6.93~8.53	0.33~0.73
粘土鉱物の種類	アロフェン	ハロサイト、イライト	アロフェン	イライト、クローライト	モンモリロナイト、カオリン鉱物

※栃木土壌は火山灰土壌である。

試験設計：AF-02 は湛水土壌条件下において速やかに分解するため、上澄液及び土壌画分両方の AF-02 濃度を測定するダイレクト法を適用した。また、AF-02 の主代謝物である M1 も分析対象とし、当該試験条件における分解性も検討した。

試験方法：適量の試験土壌をネジ蓋付ステンレス鋼製遠沈管 (200 mL 容) に量り採り、適量の 0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液を加えた。25 ± 0.5°C、暗所下で 12 時間以上振とうして予備平衡化した後、被験物質のアセトニトリル溶液を適量添加した。試料を速やかに 25°C に設定した恒温槽中の振とう機で振とうした。土壌と水の分離は遠心分離機を用い、水層はそのまま、土壌はアセトニトリルで抽出した後、固相抽出に供して前処理を行った。AF-02 及び M1 の測定は LC-MS/MS を用いた。

吸着平衡化時間、最適な土壌/溶液比及び AF-02 の安定性を確認するための予備試験は 5.0 µg/mL の濃度で実施した。平衡化時間は吸着率の経時変化および被験物質の分解性を考慮して最適な時間を選択した。

吸着平衡時における物質収支及び安定性確認は以下の分析フローに従って測定した。本試験 (吸着等温線の作成) は被験物質の分解が著しかったことから実施困難と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1 吸着平衡試験と物質収支測定の実験フローシート

結 果

表 2 に示す条件で、土壌/溶液比の検討を行った。吸着率は 71~94%であり、検討した土壌/溶液比は適切であった。

表 2 土壌/溶液比

土壌	土壌/溶液比	吸着平衡化時間(hr)	吸着率(%)
(OECD タイプ 3)	1 : 5	24	84
(OECD タイプ 4)	1 : 5	24	88
(OECD タイプ 2)	1 : 5	24	94
(OECD タイプ 1)	1 : 5	24	91
(OECD タイプ 5)	1 : 5	24	71

図 2 に AF-02 の吸着率の変化を示す。土壌においては吸着平衡は 24 時間に達していると判断した。土壌は 12 時間で、徳島土壌は速やかに平衡状態に達していると判断した。

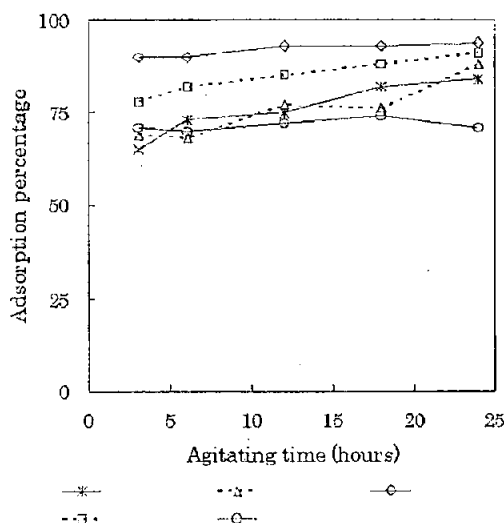


図 2 AF-02 の吸着率の経時推移

表 3 に吸着平衡 24 時間における水層、土壌両画分における AF-02 及び M1 の量の経時推移をまとめた。AF-02 単独での物質収支は徐々に減少したが、M1 合算での物質収支は良好であった。AF-02 の分解により、土壌における水層中の AF-02 濃度は検出限界付近まで低下したため、吸着振とう 18 時間以上では正確な被験物質の吸着性評価は困難であると判断した。AF-02 の分解により、フロインドリッヒの吸着等

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

温線の作成は困難であったため、吸着平衡 12 時間における値を吸着パラメーターとして用いて土壤中における移動性を評価した(表 4)。その結果、low()~immobile ()と判断された。

表 3 24 時間吸着振とう時の経時推移

土壌種類		青森						福島					
時間 (hr)		物質 量 (μg)		物質収支(%)		吸着係数		物質 量 (μg)		物質収支(%)		吸着係数	
		AF-02	M1	AF-02	AF-02+ M1	K^{ads}	K^{adsoc}	AF-02	M1	AF-02	AF-02 +M1	K^{ads}	K^{adsoc}
3	水層	29.1	12.4	79	105	9.3	325	17.5	36.6	48	96	10.9	2319
	土壌	70.1	19.0					42.3	22.5				
6	水層	15.3	22.3	56	102	13.4	469	15.0	40.5	40	93	10.4	2213
	土壌	53.9	35.5					34.0	24.8				
12	水層	6.7	25.6	27	85	15.3	535	4.6	49.2	17	91	16.5	3511
	土壌	26.6	46.8					16.4	43.0				
18	水層	3.2	22.0	17	78	23.4	818	3.5	54.0	13	98	16.3	3468
	土壌	18.2	54.6					12.2	52.4				
24	水層	1.8	24.5	11	75	27.2	951	0.5	61.0	6	88	68.5	14574
	土壌	11.6	55.2					7.3	41.8				
土壌種類		栃木						埼玉					
時間 (hr)		物質 量 (μg)		物質収支(%)		吸着係数		物質 量 (μg)		物質収支(%)		吸着係数	
		AF-02	M1	AF-02	AF-02+ M1	K^{ads}	K^{adsoc}	AF-02	M1	AF-02	AF-02 +M1	K^{ads}	K^{adsoc}
3	水層	8.6	0.3	121	131	45.1	505	12.0	20.2	57	105	17.6	424
	土壌	143	12.4					58.4	39.9				
6	水層	6.9	0.7	95	112	43.8	490	6.0	27.4	34	102	22.4	540
	土壌	112.3	20.7					35.4	57.2				
12	水層	4.4	1.4	87	116	66.4	744	2.7	28.6	19	98	28.3	682
	土壌	103.8	34.8					20.3	70.2				
18	水層	3.7	1.5	69	106	61.6	690	1.3	26.0	12	97	37.1	894
	土壌	81.7	44.2					13.8	79.3				
24	水層	2.2	2.4	53	97	73.9	828	0.7	27.2	9	99	54.0	1301
	土壌	63.7	52.0					10.8	84.4				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

土壌種類		徳島					
時間 (hr)		物質 量 (μ g)		物質収支(%)		吸着係数	
		AF-02	M1	AF-02	AF-02+ M1	K_{ads}	K_{adsoc}
3	水層	30.4	0.7	98	99	12.3	17571
	土壌	92.3	0.3				
6	水層	30.4	1.7	96	98	11.9	17000
	土壌	89.9	1.3				
12	水層	28.8	3.1	96	100	12.6	18000
	土壌	90.3	1.9				
18	水層	25.9	5.1	95	102	14.3	20429
	土壌	92.1	2.7				
24	水層	27.9	5.4	93	100	12.2	17429
	土壌	87.9	2.8				

※M1の量はAF-02換算した量(換算係数1.17)

※水層中の量=VR(吸着振とう後に分取された上澄液量)×C_{aq}(ti)(任意の時点における水層中濃度)

※ K_{ads} :吸着係数、 K_{adsoc} :有機炭素含量で補正した吸着係数

表4 吸着平衡12時間における吸着パラメーター

土壌	1/n	吸着係数、 K_{ads}	r^2	有機炭素含量、%	吸着係数、 K_{adsoc}
(OECDタイプ3)		15.3		2.86	535
(OECDタイプ4)		16.5		0.47	3511
(OECDタイプ2)		66.4		8.93	744
(OECDタイプ1)		28.3		4.15	682
(OECDタイプ5)		12.6		0.07	18000

※ 栃木土壌は火山灰土壌である。

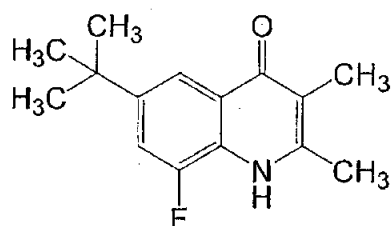
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

5. 土壌吸着性試験

(資料 連-13-1)

2) AF02-M1 の土壌吸着性試験

被験物質：AF02-M1



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4(1*H*)-quinolinone

純度：

試験土壌：使用した5種類の土壌名とその特性を表1に示す。供試土壌は、全て2 mmの篩を通過させ、水分含有量を測定した風乾土壌である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 1 試験土壌の特性

土壌試料名					
採取場所					
OECD 土壌タイプ	3	4	2	1	5
土性 (USDA)	SL:砂壤土	L: 壤土	SiCL:シルト 質埴壤土	SiC: シルト 質埴土	S: 砂土
砂 (%)	56.8	50.8	16.3	11.1	94.4
シルト (%)	30.3	32.0	50.1	42.3	2.1
粘土 (%)	12.9	17.2	33.6	46.6	3.5
有機炭素含有率 (%)	2.86	0.47	8.93	4.15	0.07
有機物含有率 (%)	4.93	0.81	15.4	7.15	0.12
pH in 0.01 mol/L CaCl ₂	5.6	5.9	4.7	5.7	8.4
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	21.8	11.6	39.4	32.3	2.3
リン酸吸収係数 (g/kg)	13.9	3.2	26.1	11.8	0.8
土壌水分量 (%)	3.43	1.07	16.83	6.67	0.87~1.00
粘土鉱物の種類	アロフェン	ハロサイト、 イライト	アロフェン	イライト、ク ロライト	モンモリロナ イト、カオリ ン鉱物

※栃木土壌は火山灰土壌である。

試験設計：試験は予備検討(吸着平衡時間の設定および土壌/溶液比の設定試験)および本試験 (吸着等温線の作成) に分けて実施した。

試験方法： 適量の試験土壌をネジ蓋付ステンレス鋼製遠沈管 (200 mL 容) に量り採り、適量の 0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液を加えた。25±0.5℃、暗所下で 12 時間以上振とうして予備平衡化した後、被験物質のメタノール溶液を適量添加した。試料を速やかに 25℃ に設定した恒温槽中の振とう機で振とうした。土壌と水の分離は遠心分離機を用い、水層はそのまま、土壌はアセトニトリルで抽出した後、固相抽出に供して前処理を行った。測定は LC-MS/MS を用いた。

吸着平衡化時間および最適な土壌/溶液比を確認するための予備試験は 5.0 µg/mL の濃度で実施した。土壌/溶液比は吸着平衡化時に吸着率が可能な限り 20% 以上となるように選択した。

本試験は、水相中初期濃度 0.08, 0.2, 0.5, 2 および 5 mg/L の 5 濃度を用いて吸着等温試験を実施し、フロイドリッヒの吸着係数を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1 吸着平衡試験と物質収支測定の実験フローシート

結 果：

表2に示す土壌/溶液比で予備検討を行った。この土壌/溶液比における吸着平衡化時間と吸着率の結果を表2に、各土壌の吸着平衡化のグラフを図2に示した。

表2 予備試験における土壌/溶液比

土壌	土壌/溶液比	吸着平衡化時間	吸着率 (%)
(OECD タイプ 3)	1 : 5	24	62.8
(OECD タイプ 4)	1 : 5	24	41.7
(OECD タイプ 2)	1 : 5	24	91.7
(OECD タイプ 1)	1 : 5	24	65.8
(OECD タイプ 5)	1 : 5	24	9.2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

徳島土壌については吸着率が低かったため、本試験では土壌/溶液比を 1:1 とした。それ以外の土壌については予備試験の条件を用いた。24 時間吸着振とう時の物質収支は

それぞれ 80, 93, 85, 83 および 95% であり全体的にやや不良であったため、水相と土壌画分の両方を測定するダイレクト法を用いた。

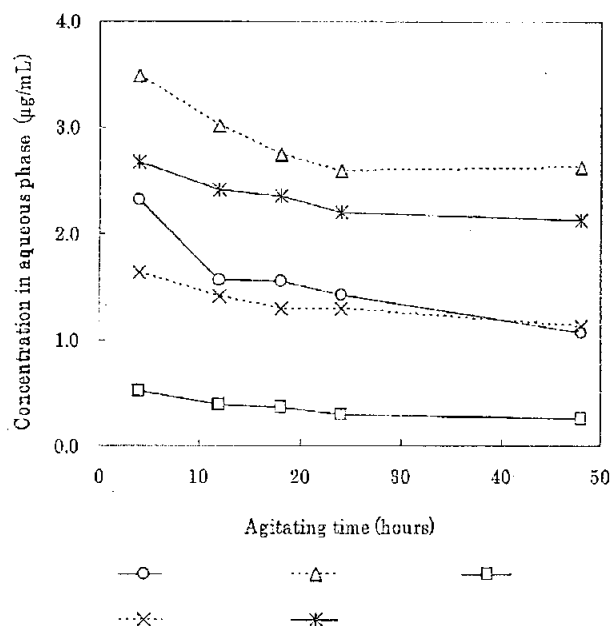


図2 吸着溶液中の被験物質濃度の推移

以上の予備試験の結果から表3に示す条件で本試験を実施した。本試験の結果求められた吸着等温パラメータおよびフロイドリッヒの吸着係数を表4に、吸着等温線を図3にまとめた。

表3 本試験の実施条件

試験温度	25°C ± 0.5°C
平衡化媒体	0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液
試験濃度	水相中初期濃度 0.08, 0.2, 0.5, 2, 5 mg/L
土/水比	
吸着平衡化時間	24 時間
溶解補助剤	メタノール 0.1%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Meiji Seikaファルマ株式会社にある。

表4 吸着等温パラメータおよびフロインドリッヒの吸着係数

土壌	1/n	K_{adsF}	r^2	有機炭素含量, %	K_{adsFoc}
(OECD タイプ 3)	0.819	8.73	0.999	2.86	305
(OECD タイプ 4)	0.832	3.71	0.996	0.47	789
(OECD タイプ 2)	0.797	43.15	0.999	8.93	483
(OECD タイプ 1)	0.848	9.73	1.000	4.15	234
(OECD タイプ 5)	0.814	0.81	0.996	0.07	1157

※栃木土壌は火山灰土壌である。

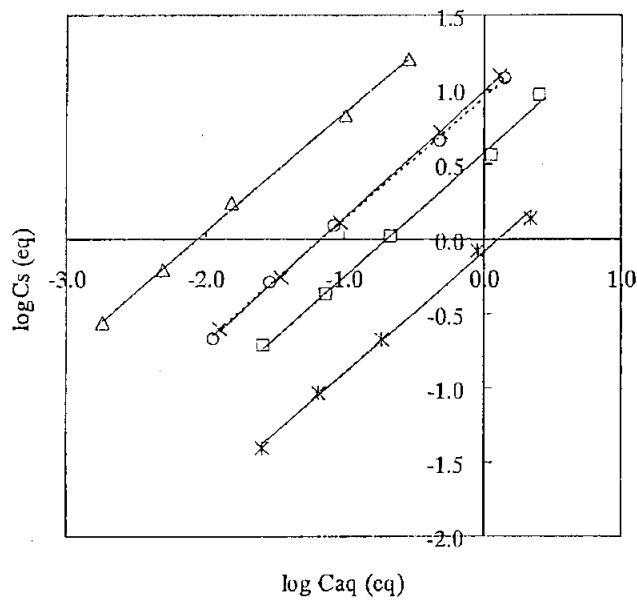


図3 フロインドリッヒの吸着等温線

フロインドリッヒの土壌吸着係数 K_{adsFoc} は 234~1157 の範囲であり、AF02-M1 の移動性はであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

生物濃縮性試験

(資料 運-14)

1) AF-02 のコイにおける濃縮度試験

被験物質：AF-02原体 純度 %
供試生物：コイ (学名 *Cyprinus carpio* L.)
体長 7.6 ~9.0 cm (平均8.5cm 標準偏差0.35)
体重 5.41~8.71 g (平均7.18g 標準偏差0.798)

方法：

1) 試験条件 (暴露条件及び環境条件)

暴露条件：流水式

(原液 0.1mL/分及び試験用水 2000mL/分の割合で 2880L/日を試験水槽に供した。)

試験期間：28日間 (理由：28日間で定常状態に達したため。)

試験濃度区及び試験液の調製：

<第1濃度区>

供試試料を超音波照射しながら 2-メトキシエタノールに溶解して、10.0g/L の被験物質溶液を調製した。この被験物質溶液を 2-メトキシエタノールで希釈して被験物質濃度として 200mg/L の原液を調製した。

<第2濃度区>

第1濃度区で調製した 10.0g/L の被験物質溶液を 2-メトキシエタノールで希釈して、被験物質濃度として 20.0mg/L の原液を調製した。

<対照区>

2-メトキシエタノールを原液とした。

各濃度区は以下の被験物質濃度とした。同時に、対照区を設定した。

設定濃度	被験物質濃度	分散剤濃度
		2-メトキシエタノール
第1濃度区	10µg/L	50µL/L
第2濃度区	1µg/L	50µL/L
対照区	—	50µL/L

環境条件：

試験温度 24.0~24.5°C

溶存酸素濃度 7.9~8.2 mg/L

pH 7.9~8.0

照光時間 白色蛍光灯による人工照明 (14時間明/10時間暗)

観察及び測定：

供試魚の観察：供試魚の健康状態等を 1日に2回 (休日は1回) 目視観察した。

試験水量：メスシリンダーを用いて 1日に1回測定記録した。

試験温度：アルコール温度計を用いて週1回測定記録した。

溶存酸素濃度：溶存酸素計を用いて週1~2回測定記録した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

pH 測定 : pH 計を用いて実験期間中に 3 回測定記録した。

清掃 : 実験期間中、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を 1 日に 1 回程度除去した。

魚の生死及び症状 :

試験水及び供試魚の分析 :

試験水及び供試魚中の被験物質分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。また、予備試験の結果、被験物質は供試魚体内で代謝されることが予想されたため、供試魚分析では被験物質の予想代謝物、6-tert-ブチル-8-フルオロ-2,3-ジメチル-4(H)-キノリノン (以下、代謝物と記す) の分析を同時に行った。供試魚中の代謝物の分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。

魚体中の脂質含量 :

対照区については実験開始前及び実験完了後に行い、脂質含量測定用として別途 6 尾を取り上げ、3 群 (2 尾 1 群) に分けて測定した。なお、ばく露期間中の供試魚分析試料については、同一の試料から脂質含量測定用試料が分取できなかったため、測定は実施しなかった。

算出可能な濃縮倍率 :

供試魚中の被験物質及び代謝物定量下限濃度より、下記の倍率を超えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となった。

被験物質	第 1 濃度区 (10 μ g/L)	3.0	倍
	第 2 濃度区 (1 μ g/L)	30	倍
代謝物	第 1 濃度区 (10 μ g/L)	4.2	倍
	第 2 濃度区 (1 μ g/L)	43	倍

結 果 :

1) 魚体中の被検物質濃度

<AF-02>

試験区 (μ g/L)	取り込み期間 (日)					
	0	7	12	15	21	28
第 1 濃度区 (10 μ g/L)	29	29	29	29	29	29
第 2 濃度区 (1 μ g/L)	29	29	29	29	29	29

(2 匹の平均値、単位 ng/g)

・低濃度、高濃度区とも AF-02 は検出されなかったため定量限界値 29 ng/g を記載した。

<代謝物>

試験区 (μ g/L)	取り込み期間 (日)					
	0	7	12	15	21	28
第 1 濃度区 (10 μ g/L)	41	208	220	178	209	235
第 2 濃度区 (1 μ g/L)	41	41	41	41	41	41

(2 匹の平均値、単位 ng/g)

・低濃度区では代謝物は検出されなかったため定量限界値 41 ng/g を記載した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

2) 試験水中の被験物質濃度
<AF-02>

試験区 ($\mu\text{g/L}$)	取り込み期間 (日)					
	0	7	12	15	21	28
第1濃度区 (10 $\mu\text{g/L}$)	9.42	9.77	9.74	9.88	10.0	9.93
第2濃度区 (1 $\mu\text{g/L}$)	0.923	0.930	0.933	0.982	0.990	0.977

(単位 ng/L)

3) 濃縮係数

(1) 各取り込み期間におけるBCF
<AF-02>

試験区 ($\mu\text{g/L}$)	取り込み期間 (日)				
	7	12	15	21	28
第1濃度区 (10 $\mu\text{g/L}$)	≤ 3.0	≤ 3.0	≤ 3.0	≤ 3.0	≤ 3.0
第2濃度区 (1 $\mu\text{g/L}$)	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30

(2匹の平均値、小数点以下は四捨五入)

いずれの試験区も、最後の連続した3回の分析においてすべて不検出であったため、定常状態における濃縮倍率は算出できなかった。しかし、濃縮倍率はすべて100倍未満であったため、28日後には定常状態に達しているとみなした。

<代謝物> (参考値)

試験区 ($\mu\text{g/L}$)	取り込み期間 (日)				
	7	12	15	21	28
第1濃度区 (10 $\mu\text{g/L}$)	22	23	18	21	24
第2濃度区 (1 $\mu\text{g/L}$)	≤ 43	≤ 43	≤ 43	≤ 43	≤ 43

(2匹の平均値、小数点以下は四捨五入)

第1濃度区：15、21及び28日後における濃縮倍率(平均)はその3回の分析における濃縮倍率の平均値に対して変動が20%以内であったため、定常状態に達していると判断した。それらの結果を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

第2濃度区：最後の連続した3回の分析においてすべて不検出であったため、定常状態における濃縮倍率は算出できなかった。しかし、濃縮倍率はすべて100倍未満であったため、28日後には定常状態に達しているとみなした。

なお、代謝物の濃縮倍率は、供試魚体内で代謝物濃度と試験水中の被験物質濃度から算出したため、参考値として記載した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(2) BCF_{ss}

<AF-02>

試験区 (μ g/L)	魚体中濃度 (Cf ng/g)	水中濃度 (Cw ng/L)	濃縮係数 (BCF _{ss})
10	—	—	≤ 3.0
1	—	—	≤ 30

<代謝物> (参考値)

試験区 (μ g/L)	魚体中濃度* (Cf ng/g)	水中濃度* (Cw ng/L)	濃縮係数 (BCF _{ss})
10	207	9.94	21
1	—	—	≤ 43

* : 定常状態 (15、21 及び 28 日後) における測定値の平均値
小数点以下は四捨五入

4) 観察

異常は認められなかった。

5) 脂質含量

実験開始前	4.17%
実験完了後	6.28%

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解のまとめ

[¹⁴C]AF-02 を用いて実施した動物、植物、土壌及び水中における代謝、分解及び残留の概要は以下の通りであり、想定代謝・分解経路及び結果の概要を以降の項に示した。

動物（資料番号：運-1、運-2、運-3、運-4）

2 mg/kg、100 mg/kg の単回経口投与による雌雄ラットにおける動物体内運命試験を行った。

排泄バランス試験では、[¹⁴C]AF-02 は 96 時間後で低用量/雄では 46.2% が尿に、45.8% が糞に排泄され、尿及び糞への排泄割合はほぼ同じであった。その他の群では 57.4~61.7% が尿に、35.2~38.3% が糞に排泄され、尿中への排泄が高い傾向があった。投与 96 時間後における体内残留率（消化管及び内容物除く）は 1.2~2.0% であり微量であった。尿中の主要代謝物は、

及び、
であった。また、
及び

は、雄試料中では、それぞれ 0.86~0.94% 及び 0.6~1.5% であったのに対し、雌試料中では、それぞれ 3.8~4.4% 及び 3.7~3.9% であり、雌試料中に多く検出された。その他の微量代謝物として、
を検出し、LC/MS/MS で
を検出した。

一方、糞中の主要代謝物は、
であった。また、
は、雄試料中では不検出であったのに対し、雌試料中ではそれぞれ 5.5~5.7% 及び 5.3~6.6% であり、雌試料中でのみ検出された。その他の微量代謝物として、
を検出し、LC/MS/MS で
を検出した。糞尿ともに AF-02 は検出されなかった。硫酸抱合体の生成量以外に性差は認められなかった。

血中キネティクス試験では、血漿中の薬物動態パラメータは、低用量の投与で、T_{max}: 3 時間 (雄)、3 時間 (雌)、C_{max}: 4.38 μg eq./g (雄)、5.10 μg eq./g (雌)、AUC_{0-∞}: 57.16 μg eq./g·h (雄)、72.80 μg eq./g·h (雌)、半減期: 32.0 時間 (雄)、33.3 時間 (雌) であった。一方、高用量の投与で T_{max}: 12 時間 (雄)、12 時間 (雌)、C_{max}: 136.9 μg eq./g (雄)、132.2 μg eq./g (雌)、AUC_{0-∞}: 3373.2 μg eq./g·h (雄)、3744.5 μg eq./g·h (雌)、半減期: 30.6 時間 (雄)、31.9 時間 (雌) であった。低用量と高用量の AUC 比は 51.4~59.0 倍であった。性差は認められなかった。

組織分布試験では、低用量における C_{max} 時点 (投与 3 時間後) で、消化管 (含内容物)、骨格筋、血液、肝臓、カーカス、脂肪及び骨 (雌のみ) に投与量の 1% 以上の分布を認めた。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰し、肝臓を除き 0.08 μg eq./g 以下となった。高用量における C_{max} 時点 (投与 12 時間後) においても投与量の 1% 以上の分布を認めた組織は、低用量と同じであった (骨を除く)。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰した。投与 96 時間後では、血液、肝臓、ハーパー腺、腎臓、副腎、消化管 (内容物含む)、カーカス

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(雄のみ)及び卵巣(雌のみ)で1.0 µg eq./g以上の濃度を示した。

胆汁排泄では、投与後48時間で26.5~42.8%が胆汁中に排泄された。吸収率(48時間まで)は73.5~92.4%と推定され、比較的高い値であった。胆汁中での主要代謝物は、

また、
の合算での生成量は1.1~5.2%であり、低用量/雄においてのみ5%を超えて検出された。また、
は合算での生成量が、雄において0.36~0.91%、雌において2.1~3.6%であり、雌試料中の方が高い傾向があった。その他の微量代謝物として、

が検出された。AF-02は検出されなかった。

以上、ラットへのAF-02の経口投与では尿及び糞の両方の経路で排泄され、低用量/雄では尿及び糞への排泄割合はほぼ同じであり、その他の群では尿中排泄量の方が高い傾向が認められた。また、糞中への排泄には胆汁排泄が大きく寄与していた。投与後96時間の体内残留率は1.2~2.0%で微量であった。投与後48時間での吸収率は73.5~92.4%と推定され、比較的高い値であった。尿中の主要代謝物は
であった。また、胆汁中においては
が主要代謝物であった。

植物(資料番号: 運-5、運-6、運-7)

水稻、トマト及びホウレンソウを用いて実用濃度で散布処理を行って試験した。その結果、水稻では最終収穫時に、玄米において0.62ppm、稲わらにおいて11.05ppm、籾殻において11.28ppm及び根部において1.28ppmのTRRレベルが認められた。玄米においては25%が、稲わらにおいては16%が結合残渣に放射能が存在した。玄米においてはAF-02が0.084ppm(TRRの14%)検出され、TRRの10%を越える主要代謝物は、
であり、稲わらにおいては
であった。

トマト果実では、最終散布1日後、7日後及び14日後においてそれぞれ0.34ppm、0.35ppm及び0.18ppmのTRRレベルが認められた。AF-02が最大0.099ppm(TRRの29%)検出され、主要代謝物は、

ホウレンソウでは、最終散布1日後、7日後及び14日後においてそれぞれ20.7ppm、17.5ppm及び12.5ppmのTRRレベルが認められた。AF-02が最大8.6ppm(TRRの42%)検出され、主要代謝物は、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

土壌（資料番号：運-8、運-9、運-10）

好氣的灌水条件下において、0.8mg/kgの濃度で処理をして試験を実施した。その結果、AF-02のDT₅₀は0.1日、DT₉₀は1.1日であり、速やかに分解した。主要代謝物はM1であり、最大で処理量の92%生成した。M1の分解は緩やかで、84日後においても処理量の73%が検出された。また、84日後に土壌残渣中に27%の放射能が検出され、痕跡量の二酸化炭素も検出された。

また、好氣的条件下において0.7mg/kgの濃度で処理をして試験を実施した。その結果、AF-02のDT₅₀は0.5日、DT₉₀は1.6日であり、速やかに分解した。主要代謝物はM1であり、最大で処理量の98%生成した。M1の分解は緩やかで、84日後においても処理量の80%が検出された。また、84日後に土壌残渣中に16%の放射能が検出され、二酸化炭素への無機化率は0.9%であった。

主要代謝物であるM1の分解が緩やかであったため、¹⁴C]M1を用いた嫌氣的条件下における試験を0.8mg/kgの濃度で実施した。その結果、M1は84日後に処理量の63%に減少し、DT₅₀は157日、DT₉₀は520日と計算された。主要な代謝物は認めなかったが、84日後に土壌残渣中に35%の放射能が検出された。

水中（資料番号：運-11、運-12）

加水分解運命試験をpH4、5、7及び9の緩衝液を用いて、濃度1ppm、25°Cの条件で30日間実施した。AF-02の半減期はpH4、5、7及び9においてそれぞれ3.3、21.3、40.6及び0.56日と算出された。分解物はM1のみであった。

また、水中光分解運命試験をpH7の希薄緩衝液及び田面水を用いて、濃度1ppm、25°Cで21.4 W/m² (300~400nm)のキセノン光を連続照射して実施した。東京の春の太陽光照射下に換算したAF-02の自然条件下での半減期は緩衝液で6.7日、田面水で1.9日（光分解速度と加水分解速度を加味して算出）と算出された。主要分解物はM1であり、緩衝液及び田面水でそれぞれ最大42%及び12%生成した。二酸化炭素もそれぞれ13%及び18%生成した。

土壌吸着（資料番号：運-13）

土壌吸着性試験では、日本の5種類の土壌（砂土、壤土、砂壤土、シルト質埴土、シルト質壤土）を用いて試験を行った。AF-02の分解が早くフロイントリッヒの吸着等温線の作成は困難であったため、吸着平衡時の吸着パラメーターを求めたところ、K_{adsoc}は、535~18000であった。

想定される代謝・分解経路は以下の通りである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

AF-02 の推定代謝・分解経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解の概要 (1) 代謝分解の比較

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解の概要 (2) 動物体内運命及び植物体内運命

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解の概要 (3) 土壌中運命

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解の概要 (4) 加水分解運命

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝分解の概要 (5) 水中光分解運命

