

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

1. 動物における代謝試験

(1)

アクリナトリンを用いたラット代謝試験

(資料No.48)

供試標識化合物：

化学名： (S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル=(Z)-(1R,3S)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

標識位置：

供試動物： SD(CD)系ラット、8週齢、体重200g

試験方法

投与： 標識体をそれぞれポリエチレングリコール200 (PEG200) に懸濁し、低用量は1mg/kg、高用量は50mg/kgを強制経口投与した。

用量設定の根拠： 慢性毒性試験における無影響レベルの1mg/kgおよび影響レベルの50mg/kgを用量として選択した。

試験の構成

実験	標識	用量	回数・経路	動物数	検討項目	試料採取時間
①		50mg/kg	単回経口投与	雌雄各1匹	予備試験 尿、糞及び呼吸	24時間間隔で投与後5日間
②		1mg/kg、 50mg/kg	単回経口投与	雌雄各5匹	血漿中濃度推移	投与後0.25、0.5、1、2、3、4、6、24時間及びその後は24時間間隔

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

③	標識体混合物	1mg/kg、 50mg/kg	単回経口投与	雌雄各5 匹	吸収・排泄、 組織分布	24時間間隔で投 与後120時間
④	標識体等量混 合物及び非標識 体	1mg/kg	反復経口投与*	雌雄各5 匹	吸収・排泄、 組織分布	24時間間隔で投 与後120時間
⑤	標識体混合物	1mg/kg、 50mg/kg	単回経口投与	雌雄各3 匹	胆汁排泄	胆管カニューレ により投与後48 時間
⑥	標識体等量混 合物	1mg/kg	単回経口投与	雌雄各5 匹	組織分布	投与後4、24、 72、120及び168 時間
⑦	標識体等量混 合物	1mg/kg	1日1回7日間 経口投与	雄5匹	オートラジオ グラフィ	最終投与後4、 24、72、120及 び168時間

*：非標識体を1日1回14日間投与後、15日目に標識体を1回投与した。

試料採取および試料分析の概要

予備試験（実験①）：投与後5日間にわたって、尿、糞及び呼気を24時間間隔で採取した。呼気中のCO₂は、エタノールアミン：2-エトキシエタノール(1：3)混合液を充填したトラップで捕集した。試料採取期間終了時に動物を屠殺し、カーカスを保存した。

血漿中濃度推移試験（実験②）：投与後0.25、0.5、1、2、3、4、6、24間時およびその後は24時間間隔で血漿中の放射能が測定限界に達するまで、血液を採取した。

吸収、排泄試験（実験③及び④）：

a) 実験③：投与後120時間にわたって、24時間間隔で尿及び糞を採取し、試料採取期間終了時に動物を屠殺して血液、肝、腎、甲状腺、副腎、心、脳、肺、脾、卵巣、精巣、子宮、消化管、筋肉、骨髄及び脂肪を採取し、カーカスを保存した。

b) 実験④：非標識化合物の低薬量14日間反復経口投与に続く標識化合物単回投与後、実験③と同様に排泄物、血液及び臓器試料を採取した。

胆汁排泄（実験⑤）；投与後48時間にわたって、胆管カニューレにより1.5時間間隔で胆汁を、24時間間隔で尿及び糞を採取した。投与48時間後に動物を屠殺して、消化管、肝及びカーカスを採取した。

組織内分布（実験⑥）；低薬量単回経口投与後4、24、72、120及び168時間に雌雄各1匹を屠殺して、血液、肝、腎、肺、脳、眼、精巣、卵巣、脾、膵、副腎、甲状腺、消化管、子宮、筋肉、骨髄、脂肪組織及びカーカスを採取した。

オートラジオグラフィー（実験⑦）；1日1回7日間投与の最終経口投与後4、24、72、120及び168時間に各1匹の動物を屠殺して、全身オートラジオグラフを作製した。

試料の抽出及び酵素処理；投与後0～24時間の尿及び0～48時間の胆汁は、直接又はβ-グルクロニターゼ/スルファターゼで処理した後に、また肝、腎及び脂肪組織試料はプロテアーゼで処理した後に、窒素気流下、37℃で濃縮乾固し、少量のメタノール及び50%含水メタノールで抽出し、代謝物の濃度を測定した。糞中の放射能は直接抽出した。

放射能の測定；尿及び各抽出物中の放射能は直接、糞及びその他の固体試料中の放射能はサンプルオキシダイザー処理後、それぞれ液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定した。代謝物はTLCプレートのラジオクロマトグラムにより放射能量を求めた。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)；糞抽出物中の代謝物の分離は、逆相C-18カラムを装着したHPLCを用いて行った。HPLC溶出液中の代謝物の定量は、UV検出器及び放射能検出器を用いて行った。

薄層クロマトグラフィー(TLC)；0～24時間採取の糞のメタノール抽出画分について一次元TLCを行い、代謝物を分離精製し、MSにより同定した。

尿中の代謝物の精製；β-グルクロニターゼ/スルファターゼで処理した0～24時間採取の尿をアルカリ性下、続いて酸性下でいずれもジエチルエーテルで抽出した。抽出液を濃縮し、シリル化した後、直接GC-MSで測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果：

予備試験（実験①）： 50mg/kg
 量で単回経口投与後、 投与後120時間までに投与放射能量の約7～13%が尿中に排泄され、その大部分が投与後24時間までに排泄された。糞中には、両標識化合物とも、投与量の86～93%が投与後120時間までに排泄され、その大部分が投与後48時間までに排泄された。 標識化合物では、呼気中への放射能の排泄が僅かに認められたが、 標識化合物では検出限界以下であった。両標識化合物の排泄に差はみられなかった。したがって、以降の試験は 標識体の等量混合物（以下、混合標識体）を用いて行った。

標識化合物	投与量 (mg/kg)	検査試料	累積排泄率 (投与量に対する割合%)											
			0～8時間		0～24時間		0～48時間		0～72時間		0～96時間		0～120時間	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
50 mg/kg 単回投与	尿	3.83	3.14	10.08	10.75	10.92	12.50	11.03	12.69	11.08	12.74	11.11	12.77	
	ケージ洗浄液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	0.02	
	呼気	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	
	糞	—	—	73.36	45.07	84.07	81.59	86.40	84.78	87.02	85.85	87.18	85.87	
	カーカス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	
	合計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	98.32	98.66	
50 mg/kg 単回投与	尿	2.67	2.60	8.98	6.06	10.50	6.40	10.65	6.53	10.71	6.59	10.77	6.63	
	ケージ洗浄液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	0.17	
	呼気	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.41	0.12	
	糞	—	—	60.88	62.84	86.65	82.09	91.12	85.22	92.42	86.05	92.72	86.19	
	カーカス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	
	合計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	103.53	92.99	

血漿中濃度の推移（実験②）：低薬量及び高薬量投与群とも、血漿中の放射能濃度は投与後4～6時間後に最高値に達した。低薬量群では最高値が雄で0.55 μg当量/ml、雌で0.78 μg当量/mlであった。高薬量投与群では最高値は雄で6.4 μg当量/ml、雌で8.1 μg当量/mlであり、低薬量群の約10倍であった。高薬量を投与した場合低薬量に比べ吸収率が低いことが推測された。

	Tmax (時間)		Cmax (μg/等量ml)		T1/2 (時間)		AUC* [(μg/ml)・hr]	
	1mg/kg	50mg/kg	1mg/kg	50mg/kg	1mg/kg	50mg/kg	1mg/kg	50mg/kg
雄	4	6	0.55	6.4	11	11.5	8.50	126
雌	4	4	0.78	8.1	11	12	12.3	153

*: 申請者が台形法により算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

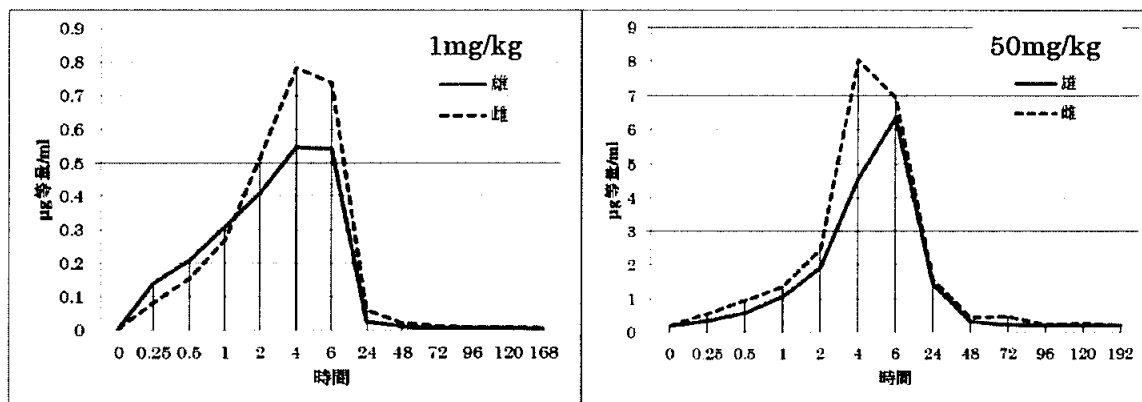


図1 血漿中のアクリナトリン濃度

放射能の排泄（実験③及び④）：結果の概要を次表に示す。

混合標識体を低薬量（1mg/kg）で単回投与した場合、投与後120時間までに投与放射エネルギーの34～46%が尿中に排泄され、55～68%が糞中に排泄された。尿中排泄量の大部分は、投与後24時間以内に排泄され、糞中排泄量の大部分は、投与後48時間以内に排泄された。

混合標識体を高薬量（50mg/kg）で単回投与した場合、投与後120時間までに投与放射エネルギーの8～11%が尿中に、投与量の91～92%が糞中に排泄され、低薬量単回投与に比較して尿中への排泄率が低かった。

非標識アクリナトリンを1mg/kgの薬量で14日間投与した後、アクリナトリン混合標識体を、低薬量（1mg/kg）で単回投与した場合、放射性化合物のみを単回投与した場合と比べて、放射能の排泄パターンに大きな差がみられなかった。

吸収・排泄試験結果

標識化合物	投与量 (mg/kg)	検査試料	累積排泄率（投与量に対する割合%）												
			0～8時間		0～24時間		0～48時間		0～72時間		0～96時間		0～120時間		
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
混合標識化合物	1 mg/kg 単回投与	尿	14.96	16.32	31.23	42.50	33.35	45.06	33.72	45.53	33.92	45.78	34.06	45.99	
		ケージ洗浄液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.30	0.18
		呼吸気	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		糞	—	—	60.19	41.69	67.16	54.76	67.53	55.13	67.66	55.25	67.70	55.34	
		カ—カス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.25	0.29
		合計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	102.32	101.81

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

吸収・排泄試験結果（続き）

標識化合物	投与量 (mg/kg)	検査試料	累積排泄率（投与量に対する割合%）											
			0～8時間		0～24時間		0～48時間		0～72時間		0～96時間		0～120時間	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
非標識／混合標識化合物	1 mg/kg 14日 ／ 1 mg/kg 単回投与	尿	12.75	16.42	29.51	35.76	32.71	39.47	33.21	40.13	33.41	40.60	33.52	41.01
		ケージ洗浄液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
		呼気	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		糞	—	—	43.31	42.12	57.28	58.66	58.46	60.11	58.67	60.36	58.91	60.56
		カーカス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.22	0.30
		合計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	92.65	101.87
混合標識化合物	50 mg/kg 単回投与	尿	1.91	2.19	7.75	6.28	10.11	7.43	10.37	7.62	10.46	7.72	10.54	7.82
		ケージ洗浄液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.10	0.55
		呼気	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		糞	—	—	60.99	74.07	90.48	89.82	91.98	90.95	92.12	90.99	92.17	91.11
		カーカス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<0.20	<0.20
		合計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	102.81	99.40

注) —：測定せず。 ND：検出限界以下

胆汁中への排泄：カニューレ試験結果の概要を次表に示す。低薬量（1mg/kg）を単回投与した場合、投与後48時間までに投与量の48～52%が胆汁中に排泄され、そのうちの64・87%が投与後24時間までに排泄された。一方、投与後48時間までに尿中に排泄された放射能は、投与量の17～22%であり、糞中に排泄された放射能は、投与量の16～24%であった。

高薬量（50mg/kg）を単回投与した場合では、投与後48時間までに投与量の13～16%が胆汁中に排泄され、そのうち75・78%が投与後24時間までに排泄された。投与後48時間までに尿中に排泄された放射能は、投与量の4～5%であり、残りの放射能のほとんど大部分は、糞中に排泄あるいは消化管にとどまった。

以上の結果よりアクリナトリンの吸収率を申請者が計算により求めたところ、低薬量（1mg/kg）を単回投与した場合、投与量48時間で投与量の71～72%が、高薬量（50mg/kg）を単回投与した場合、投与後48時間で投与量の21～25%が吸収されたと考えられた。

申請者注：吸収率の計算はOECDガイドライン417より
 (胆汁量 + 尿量 + 呼気量 + 消化管の内容物を含まないカーカス量) / 投与量 x 100
 に従って求めた。

呼気は計測されなかったが、微量であったので吸収率の計算に影響を与えなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

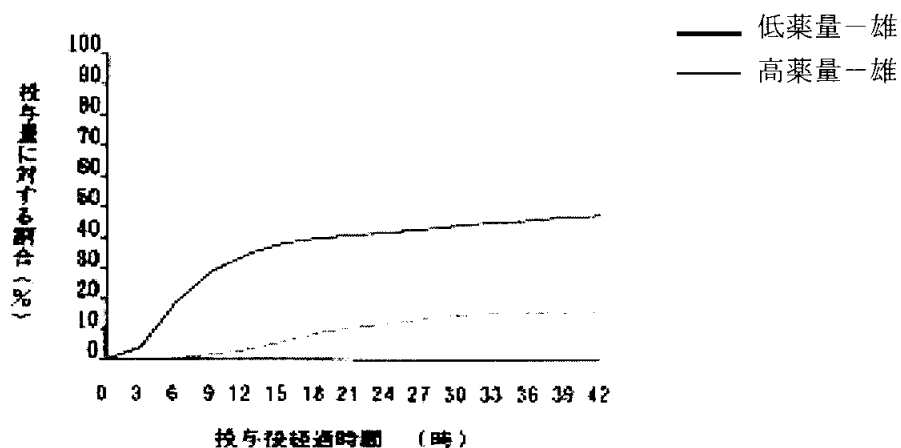
試料	放射能量 (投与量に対する割合,%)							
	1mg/kg単回投与				50mg/kg単回投与			
	0~24時間		0~48時間		0~24時間		0~48時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	18.41	9.16	22.19	17.25	3.04	2.73	4.97	4.12
ケージ洗浄液	—	—	0.42	1.10	—	—	0.83	0.84
胆汁	41.78	33.53	47.99	52.13	11.96	10.47	15.87	13.34
糞	7.43	6.83	16.36	24.13	3.97	13.36	44.83	52.63
肝	—	—	0.28	0.17	—	—	0.16	0.08
消化管	—	—	11.12	2.97	—	—	27.49	14.94
カーカス	—	—	1.57	1.14	—	—	3.63	3.86
合計	—	—	99.92	98.89	—	—	97.78	89.81

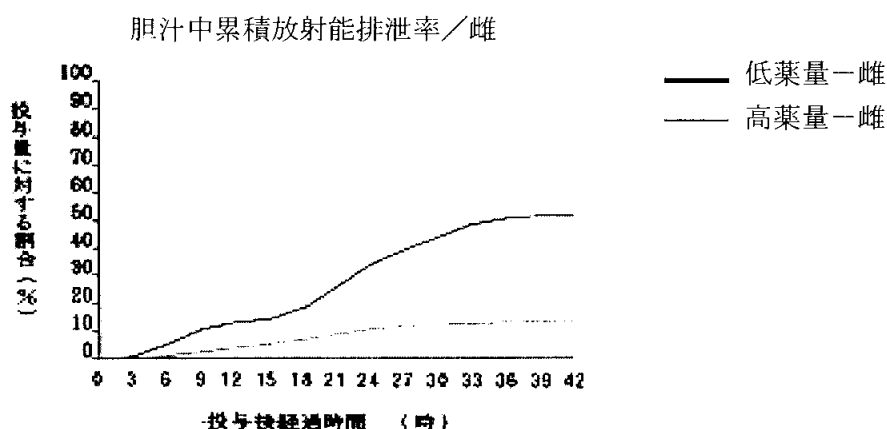
注) — : 測定せず

低薬量及び高薬量を投与したラットにおける胆汁中累積放射能排泄率を下図に示した。低薬量を投与した雄では、投与後15時間まで、胆汁中への放射能の排泄は速やかで、その後の排泄は緩慢であった。低薬量を投与した雌では、投与後18時間まで胆汁への排泄は比較的緩慢であったが、その後急速に増加し、総胆汁排泄率は雄とほぼ同等であった。高薬量を投与した雌雄では、胆汁排泄率の推移に差がみられず、総排泄率は低薬量投与群に比べてはるかに低かった。

以上の結果から、本化合物は経口投与後消化管から吸収され、その一部分は、腸肝循環を経て糞中に排泄される。高薬量を投与した場合には、吸収率が低いことが推測された。

胆汁中累積放射能排泄率/雄





組織内分布（実験③及び④）：混合標識体投与後120時間における放射能の組織内分布の概要を次表に示す。低薬量単回投与群では、副腎、卵巣及び甲状腺に比較的高い放射能が検出された（0.06-0.2 μ g等量/g）。脂肪、肝臓、膵臓、骨髄及び子宮で中等度の放射能が検出された（0.01-0.05 μ g等量/g）。非標識化合物を1mg/kgの薬量で14日間投与した後標識化合物を投与した場合、脂肪、副腎、肝臓、骨髄、甲状腺に比較的高い放射能を検出した。高薬量単回投与群では相対的に各組織内の放射能が高かった。

検査組織	投与後120時間における放射能の分布（検体相当量 μ g/g）					
	1mg/kg 単回投与		1mg/kg 反復投与 ^{a)}		50mg/kg 単回投与	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.055	0.187	<0.021*	0.015	<1.52*	<0.919*
骨髄	0.012	0.042	0.005	<0.015*	<0.406*	<0.878*
脳	0.003	0.009	<0.002*	<0.002*	<0.093*	<0.124*
脂肪	0.027	0.049	0.025	0.015	0.473	0.345
消化管	0.002	0.005	0.003	0.005	0.134	0.106
心	0.005	0.015	0.004	0.005	0.247	0.195
腎	0.006	0.013	0.005	0.006	0.187	0.135
肝	0.014	0.017	0.017	0.019	0.583	0.357
肺	0.004	0.011	0.002	0.002	<0.098*	<0.132*
筋肉	0.002	0.004	0.002	<0.002*	<0.095*	<0.127*
卵巣	—	0.126	—	0.007	—	<0.359*
膵	0.005	0.035	0.004	0.003	<0.102*	0.157
血漿	0.003	0.005	0.003	0.004	0.090	0.091
精巣	0.002	—	<0.002*	—	<0.094*	—
甲状腺	<0.094*	<0.146*	<0.080*	<0.104*	<6.17*	<5.35*
子宮	—	0.023	—	0.004	—	<0.191*
全血	0.003	0.006	0.002	0.003	0.089	0.080

注) —：該当せず

a)：非標識体を1日1回14日間投与後、15日目に標識体を1回投与した。

*：定量限界以下（バックグラウンドデータの総放射能の2倍以下の値）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

低薬量を単回投与したラットにおける組織内放射能分布の経時的変化の概要を下表に示す。投与後4時間に、消化管及び肝臓で最も高い放射能が検出された。これら両組織を含め全ての検査組織で、時間の経過とともに放射能の減少が認められ、特定の組織における放射能の滞留はみられなかった。

	組織内放射能分布 (検体相当量 $\mu\text{g/g}$) の経時的変化									
	4 時間		24 時間		72 時間		120 時間		168 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.343	0.502	0.166	0.112	0.095	0.062	0.145	0.076	0.098	0.037
骨髄	0.088	0.133	0.024	0.048	0.013	ND	0.011	0.018	0.009	ND
脳	0.034	0.044	0.011	0.002	0.003	0.003	0.003	ND	0.003	ND
眼	0.062	0.150	0.014	0.006	0.005	ND	0.003	0.003	ND	ND
脂肪	0.129	0.108	0.187	0.062	0.088	0.029	0.041	0.026	0.048	0.035
消化管	12.8	9.04	1.58	0.284	0.015	0.023	0.003	0.005	0.002	0.011
心	0.193	0.315	0.028	0.018	0.014	0.009	0.007	0.006	0.005	0.004
腎	0.302	0.608	0.119	0.041	0.016	0.011	0.007	0.008	0.007	0.007
肝	0.550	1.17	0.145	0.084	0.029	0.027	0.013	0.019	0.010	0.013
肺	0.157	0.259	0.025	0.013	0.009	0.006	0.006	0.011	0.005	0.003
筋肉	0.042	0.056	0.010	0.003	0.006	0.002	0.006	ND	0.002	ND
卵巣	—	0.564	—	0.108	—	0.065	—	0.057	—	0.017
膵	0.145	0.321	0.051	0.023	0.013	0.016	0.021	0.009	0.018	0.008
血漿	0.387	0.827	0.063	0.038	0.007	0.007	0.002	0.004	0.001	0.003
脾	0.087	0.156	0.022	0.012	0.012	0.009	0.008	0.006	0.007	0.004
精巣	0.064	—	0.014	—	0.002	—	ND	—	ND	—
甲状腺	0.340	1.93	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
子宮	—	0.332	—	0.044	—	0.028	—	0.008	—	0.006
全血	0.276	0.523	0.041	0.024	0.006	0.010	0.006	0.009	0.005	0.006

注) — : 該当せず。 ND : 検出限界以下

全身オートラジオグラフィーにおける放射能分布を次頁に示した。投与後4時間では消化管で最も多い放射能の分布が認められ、膀胱及び胆管でも多くの放射能の分布がみられた。しかし、いずれの組織でも時間経過とともに放射能は減少し、組織内分布の分析に供さなかった組織でも放射能が特に多く分布する組織及び、放射能の減少の遅い組織は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

全身オートラジオグラフィにおける放射能分布

器官		単回投与 24時間 後	7日間連続投与後時間				
			4	24	72	120	168
中枢神経系	脳		○				
	脊髄		○				
内分泌腺	副腎	○	○	○			
	下垂体		○				
	胸腺		○				
	甲状腺		○				
外分泌腺	眼窩外涙腺		○				
	ハーダー腺	○	○	○			
	眼窩内涙腺		○	○			
	唾液腺		○				
脂肪	貯蔵脂肪	○	○	○	○	○	○
	褐色脂肪	○	○	○	○	○	○
消化器系	盲腸	●	●	●	○	○	○
	小腸	●	●	●	○	○	○
	胃	●	●	●	●		○
	大腸	●	●	●	○	○	○
生殖腺	精巣上体		○				
	前立腺		○				
	精巣		○				
筋肉	心筋		○	○	○	○	○
	骨格筋		○				
	舌		○	○			
泌尿器	膀胱	◎	●	◎	○		
	腎臓	○	◎	○	○	○	○
その他	胆管	●	●	●			
	血液	○	◎	○			
	骨髓		○				
	肝臓	○	◎	○	○	○	○
	肺	○	◎	○			
	鼻粘膜	○	◎	◎	○	○	
	膵臓		○				
	皮膚	○	○	○			
	脾臓		○	○			
歯髄		◎	○				

●は高度、◎中度、○小程度の放射能を検出、無印は視覚的に検出せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

- 6) 代謝物の分析：尿、糞、胆汁、肝臓、腎臓及び脂肪組織における代謝物を分離、精製し、TLC 及び MS により同定した。結果を次頁の表にまとめた。また推定代謝経路図を表の後に示した。

標識体をラットに経口投与した場合、尿中には未変化のアクリナトリンは検出されず、多くの代謝物が検出された。

標識体を投与したラットの糞中代謝物のパターンはほぼ同じであり、未変化のアクリナトリン[A]が同定された。

本化合物は消化管中で分解を受けにくく、未吸収のものはほとんどが未変化のまま排泄される

まとめ：

本化合物は経口投与後速やかに糞及び尿中に排泄される。放射能の消化管からの吸収率が低く、特に高薬量を投与した場合、大部分が未変化のまま糞中に排泄される。組織内の放射能は投与後経時的に減少し、120時間後では組織内の残留は僅かであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

予備試験

供試標識 化合物	投与量 方法	試料	性別	投与量に対する割合 (%)								
				[A] (親化 合物)							合 計	
	50mg/kg 単 回	24 時間 尿	雌雄	ND								10.3
		48 時間 糞		40.4								82.3
	50mg/kg 単 回	24 時間 尿	雌雄	ND								7.2
		48 時間 糞		42.0								84.4

本試験

供試標識 化合物	投与量 方法	試料	性別	投与量に対する割合									
				[A] (親化 合物)							合 計		
	1 mg/kg 単 回	24 時間 尿	雄	ND								31.2	
			雌	ND								42.5	
		48 時間 糞	雄	14.7								67.2	
			雌	13.3								54.8	
		48 時間胆汁	雄	ND								48.0	
			雌	ND								52.1	
		4 時 間	肝	雌雄	ND								0.87
				腎	雌雄	ND							0.42
				脂肪	雌雄	ND							0.085
		1 mg/kg 反復 ^c	24 時間 尿	雄	ND								29.5
	雌			ND								35.8	
	48 時間 糞		雄	12.4								57.3	
			雌	11.9								58.7	
	50 mg/kg 単 回	24 時間 尿	雄	ND								7.8	
雌			ND								6.3		
48 時間 糞		雄	52.7								90.5		
		雌	65.3								89.8		
48 時間胆汁		雄	ND								15.9		
		雌	ND								13.3		

c : 非標識アクリナトリンを14日間投与した後、標識化合物を単回投与した。
 ND : 検出限界以下

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

動物における推定代謝経路図

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(2) アクリナトリンを用いたラット排泄試験
(資料No.49)

供試標識化合物： 標識アクリナトリン

化学名： (S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル (Z)-(1R, cis)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

供試動物：Sprague Dawley (OFA) SPF系ラット雄5匹、平均体重200g

方法：

投与及び試料の採取；ポリエチレングリコール200に懸濁した

標識アクリナトリン50mg/kg量を、単回経口投与した後、個体別に代謝ケージに収容し、尿および糞を24時間毎に4日間採取した。また、ケージを0.01N HCl、0.01N NaOHおよびメタノール（2回）で24時間毎に洗浄した。試験終了時に動物を屠殺し、凍結した。

放射能の測定；採取した試料は、そのまま、あるいはサンプルオキシダイザーで燃焼した後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシーケミカルズ株式会社にある。

結果：結果の概要を下表に示す。

試料	累積排泄量(投与量に対する割合%)			
	1日	2日	3日	4日
尿 a)	6.79	6.92	7.01	7.03
糞	96.00	98.32	98.39	98.39
動物体内	—	—	—	ND
合計	102.79	105.23	105.40	105.42

—：検出せず

ND：検出されず

a)：洗浄液の放射能を含む。

アクリナトリンをラットに経口投与すると、ほとんどの放射能が1日で排泄され、4日後の動物体内には放射能は検出されなかった。主排泄経路は糞であった。

申請者注：本試験では、ラベル体が低い比放射能活性であったため、1mg/kgの低用量の試験は実施せず、50mg/kgの高用量でのみ実施した。しかし、高用量を用いた他のラベル位置のラット代謝試験(資料No.48)では少量の代謝物しかとらえられないことが明らかだったため、吸収と排泄のみを調べて代謝までは行わなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2. 植物における代謝試験

(1)

アクリナトリンを用いたりんごにおける代

謝試験

(資料No.50)

供試化合物：下記の2種の標識アクリナトリン

化学名：(S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル (Z)-(1R, cis)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

(1)

標識アクリナトリン

(2)

標識アクリナトリン

試験植物；屋外のコンテナ内で矮性台木に接ぎ木された2-3年生のりんご幼木（品種 James Grive 3本およびWorcester Permaine 1本）

方法：

処理及び試料の採取；提供されたアクリナトリンのトルエン溶液を窒素気流下で濃縮乾固させ、残渣に製剤の白試料を加えて懸濁させた。この検体懸濁液を水で希釈し、野外で栽培中の矮性りんごの果実及び葉に塗布した。処理時期及び処理濃度は以下の通りである。用量選択の根拠記載なし。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

処理時期	収穫期前8週		収穫期前4週	
供試化合物				
処理濃度 (mg a.i./ml)	0.405	0.418	0.400	0.396

収穫期の8週前に処理した区からは、処理直後、1, 2, 3, 4, 6及び8週間後に葉を採取し、処理直後、4及び8週間後に果実を採取した。また、収穫期の4週前に処理した区からは、処理直後及び4週間後に葉及び果実を採取した。

代謝物の分離及び分析；採取した葉及び果実の表面をアセトニトリルで洗浄し、洗液を分取した。洗浄後の葉及び果実をアセトニトリル、アセトニトリル/水 (1:1) で順次抽出した。処理8週間後に採取した果実の一部は、果皮と果肉に分け、それぞれ上記と同様に抽出した。各抽出液中の代謝物は、標準化合物との薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分析した。

放射能の測定；洗液および抽出液は直接、抽出残渣及び一部の抽出液は乾燥セルロース粉末とともに燃焼した後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。TLCプレート上の放射能は、走査によってラジオクロマトグラムを作成し、代謝物の割合を求めた。

結 果：

放射能の分布；結果の概要を表1に示す。

標識体のいずれを処理した場合も、葉残留放射能の大部分は表面に存在し、処理後8週間でも総残留放射能の80%以上であった。標識体処理葉では、放射能はほとんど減少せず、標識体では徐々に減少した。一方、果実ではいずれの標識化合物でも果皮表面の放射能は、処理後4週間までに急速に減少し、その後8週までほとんど減少しなかった。表面洗浄後、果実残留放射能の大部分は果皮に存在し、処理後8週で果皮中放射能は総残留放射能の40%以上を占め、果肉中放射能は13%~18%であった。

代謝物分析；結果の概要を表2に示す。

いずれの標識化合物も、葉の総残留放射能の大部分は親化合物[A]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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

*申請者注：原報告書には硫酸抱合体は植物体による代謝物とは考えられないと記述されているが、植物中においても硫酸抱合体が生成されることが近年報告されている。

一方、果実では、総残留放射能のほとんど大部分は親化合物
[A]であり、が僅かに検出された。

以上のように、りんごの葉及び果実に処理したアクリナトリンは植物組織内に浸透しにくく、処理放射能のほとんどが葉及び果実の表面に残留していた。総残留放射能のほとんどが未変化の親化合物[A]であり、僅かにが検出された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表1

処理時期	供試化合物	試料	画分	総残留放射能に対する割合 (%)							
				0週	1週	2週	3週	4週	6週	8週	
収穫期前8週	アクリナトリン	葉	表面洗浄液	83.8	93.0	77.9	88.7	83.8	88.6	80.1	
			MeCN画分	15.5	6.4	16.2	3.9	4.1	2.8	6.8	
			MeCN/水面分	0.1	0.1	4.8	4.7	7.5	5.4	8.8	
			抽出残渣	0.5	0.7	1.3	2.7	4.7	3.3	5.1	
			総残留放射能**	78	111	135	72	95	79	99	
		果実	表面洗浄液	86.7	—	—	—	35.9	—	40.6	
			MeCN画分	10.0	—	—	—	27.2	—	6.4*	
			MeCN/水面分	—	—	—	—	12.4	—	2.5*	
			抽出残渣	3.3	—	—	—	24.7	—	3.7*	
			総残留放射能**	2.12	—	—	—	0.47	—	0.37 ^{a)}	
		果皮	MeCN画分	—	—	—	—	—	—	22.2	
			MeCN/水面分	—	—	—	—	—	—	4.7	
	抽出残渣		—	—	—	—	—	—	20.1		
	アクリナトリン	葉	表面洗浄液	92.8	93.6	—	90.4	85.4	87.8	83.6	
			MeCN画分	4.4	5.7	—	5.2	7.3	5.5	5.3	
			MeCN/水面分	0.6	0.1	—	3.8	4.9	4.5	7.7	
			抽出残渣	2.3	0.7	—	0.8	2.5	2.3	3.5	
			総残留放射能**	166	137	—	116	114	87	68	
		果実	表面洗浄液	85.3	—	—	—	42.8	—	41.0	
			MeCN画分	11.6	—	—	—	35.4	—	10.2*	
			MeCN/水面分	0.8	—	—	—	6.5	—	2.7*	
			抽出残渣	2.3	—	—	—	15.4	—	4.6*	
			総残留放射能**	2.05	—	—	—	0.96	—	1.34 ^{a)}	
		果皮	MeCN画分	—	—	—	—	—	—	27.2	
MeCN/水面分			—	—	—	—	—	—	2.3		
抽出残渣	—		—	—	—	—	—	11.9			
収穫期前4週	アクリナトリン	葉	表面洗浄液	92.6	—	—	—	77.1	—	—	
			MeCN画分	6.0	—	—	—	10.9	—	—	
			MeCN/水面分	1.1	—	—	—	7.3	—	—	
			抽出残渣	0.4	—	—	—	4.8	—	—	
			総残留放射能**	112	—	—	—	53	—	—	
		果実	表面洗浄液	86.9	—	—	—	16.0	—	—	
			MeCN画分	11.1	—	—	—	60.4	—	—	
			MeCN/水面分	1.6	—	—	—	8.3	—	—	
			抽出残渣	0.5	—	—	—	15.3	—	—	
			総残留放射能**	0.66	—	—	—	0.29	—	—	
		アクリナトリン	葉	表面洗浄液	85.2	—	—	—	82.0	—	—
				MeCN画分	10.7	—	—	—	9.8	—	—
	MeCN/水面分			3.5	—	—	—	6.4	—	—	
	抽出残渣			0.8	—	—	—	1.9	—	—	
	総残留放射能**			99	—	—	—	53	—	—	
	果実		表面洗浄液	82.2	—	—	—	35.7	—	—	
			MeCN画分	13.0	—	—	—	43.0	—	—	
			MeCN/水面分	3.2	—	—	—	9.2	—	—	
			抽出残渣	1.5	—	—	—	12.3	—	—	
	総残留放射能**	0.84	—	—	—	2.33	—	—			

注) * : 果皮を除いた果肉の抽出部分

** : 単位は親化合物相当量 ppm。

a) : 収穫期前8週の処理後8週時の総残留放射能は果肉および果皮の合計。

— : 試料を採取しなかったか、又は分析を行わなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 2

処理 時期	供試 化合物	試料	代 謝 物	濃度 (親化合物相当量 ppm)						
				0週	1週	2週	3週	4週	6週	8週
収穫期 前8週	アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	77 (98.7)	105 (94.6)	124 (91.9)	64 (88.9)	79 (83.2)	65 (82.3)	77 (77.8)
			総残留放射能	78	111	135	72	95	79	99
		果実	アクリナトリン[A]	2.05 (96.7)	— —	— —	— —	0.25 (53.2)	— —	0.19 (51.4)
			総残留放射能	2.12	—	—	—	0.47	—	0.37
			アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	161 (97.0)	119 (86.9)	— —	98 (84.5)	94 (82.5)
総残留放射能	166	137			—	116	114	87	68	
果実	アクリナトリン[A]	2.00 (97.6)		— —	— —	— —	0.71 (74.0)	— —	0.98 (73.1)	
	総残留放射能	2.05		—	—	—	0.96	—	1.34	

注) () の数値は総残留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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表2 (続き)

処理 時期	供試 化合物	試料	代 謝 物	濃度 (親化合物相当量 ppm)						
				0週	1週	2週	3週	4週	6週	8週
収穫期 前4週	アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	109 (97.3)	—	—	—	41 (77.4)	—	—
			総残留放射能	112	—	—	—	53	—	—
	果実	アクリナトリン[A]	0.66 (100)	—	—	—	0.19 (65.5)	—	—	
		総残留放射能	0.66	—	—	—	0.29	—	—	
アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	95 (96.0)	—	—	—	41 (77.4)	—	—	
		総残留放射能	99	—	—	—	53	—	—	
	果実	アクリナトリン[A]	0.83 (98.8)	—	—	—	1.92 (82.4)	—	—	
		総残留放射能	0.84	—	—	—	2.33	—	—	

注) () の数値は総残留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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

りんごにおける推定される代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(2) アクリナトリンのぶどうにおける代謝と分解

(資料 No.63)

供試化合物： 2種の標識アクリナトリン

化学名：(S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル (Z)-(1R, cis)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

供試作物： 屋外で栽培されたぶどう樹(品種：Traminer)

1区：1樹/ステンレスコンテナ(0.79m²)

試験方法：

散布； アクリナトリンの各 標識化合物を 75g/L 乳剤に製剤した。 及び
標識化合物それぞれ実用薬量の 22.5g/ha を 1 回目散布は、ぶどう植物の発育段階(BBCH77；房の完成期)、2 回目散布は、1 回目散布の 13 日後、ぶどう植物発育段階(BBCH81；房成熟開始期)に行った。追加試験として、ジメチル標識化合物の 10 倍量散布 225g/ha(17.8mg/0.79m²)を行った。

試料調製；アクリナトリンの 標識各化合物の散布後、ぶどうの果実及び葉を、次の時期に採取した：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

1. 0日；1回目散布当日(水滴乾燥後)、「房の完成期」
 2. 13日；2回目散布直前、「房の成熟開始期」
 3. 27日；2回目散布14日後、「果実の着色期」
 4. 41日；2回目散布28日後、「果実の軟化期」
- 採取された各試料は、各分析に供するまで凍結保存された。

分析方法；

・果実 標識アクリナトリンを処理した果実を1%蟻酸で酸性化されたアセトニトリル/水溶液(4/1)で洗浄して、表面に付着している放射能を回収した。洗浄液中の放射能は、その一部が、直接的に液体シンチレーションカウンター(LSC)で、計数されたが、大部分の洗浄液は、濃縮され、アセトニトリルに溶解され、同定及び定量分析試料として、逆相及び順相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。洗浄された果実は、ホモジネートされた。ホモジネートの一部は燃焼、LSCにより放射能を計測した。残りのホモジネートは、アセトニトリル/0.1%蟻酸水溶液(9/1)で抽出、遠心分離により上清と沈殿とに分けた。沈殿は、さらに、アセトニトリル/0.1%蟻酸水溶液(1/1)で抽出と遠沈処理を4回繰り返した。果実の上清は、全てを合わせてアセトニトリル相と水相に分画した。アセトニトリル画分は、濃縮、1mlのアセトニトリル/0.1%蟻酸(1/1)に再溶解し、分析試料とした。上清濃縮液は、その一部をLSCで放射能を計数し、残りの試料は、同定及び定量分析試料として、逆相及び順相HPLCで分析した。逆相HPLCで保持されない極性分解物は、酸性及びアルカリ条件下で加水分解を行った。加水分解物は、逆相HPLCで分析した。果実の抽出残渣は、0.1N酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.6)に懸濁し、セルラーゼ及びマセロザイムR-10を加えて、35°Cで1日間振盪培養した。培養物を遠沈し、上清をろ過後、ろ液中の放射能をLSCで計数した。

・葉部は果実と同様の手法で分析した。

・散布前後における散布液中での被験物質の安定性は順相HPLC及びLSCで、長期保存植物検体中の被験物質の安定性は、逆相HPLCおよびLSCで確認した。

抽出及びその後の処理法は以下に示す通りであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

試験結果：

1) 散布前後における散布液中の化合物の安定性

薬液調製後の散布前薬液と散布後にスプレー装置に残った薬液を、順相 HPLC による分画と LSC による計数の結果、両標識体ともに散布前後でその質的变化はなかった

1 倍量 散布	供試溶 液				
1 回目	散布前				
	散布後				
2 回目	散布前				
	散布後				

2) 長期保存検体中の化合物の安定性

10 倍量 標識アクリナトリン処理の 8 ヶ月間凍結保存したぶどう果実及び葉収穫物から得た抽出物を逆相 HPLC 及び LSC により分析した結果、これから得られた HPLC のプロフィールは、凍結保存前に得た HPLC プロフィールと同じで、少なくとも 8 ヶ月間、代謝物/分解物及び異性体の安定性を示した。

3) 総放射性残留量

標準散布液で散布した 及び 標識アクリナトリン処理検体の果実及び葉部位の総放射性残留物量(TRR)の推移を採取日別に次頁の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

総放射性残留物量(TRR)の概要分析

i) 標識アクリナトリン (標準薬量) 処理区の放射性残留物

採取日	葉部位放射性残留物			果実部位放射性残留物		
	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg
処理当日	洗浄液	1.01	1.3	洗浄液	0.023	0.051
	抽出物	0.24		抽出物	0.026	
	抽出残渣	0.0032		抽出残渣	0.0023	
13日(2回目 散布前)	洗浄液	0.15	0.46	洗浄液	0.002	0.028
	抽出物	0.27		抽出物	0.021	
	抽出残渣	0.033		抽出残渣	0.004	
27日	洗浄液	0.34	1.12	洗浄液	0.018	0.13
	抽出物	0.74		抽出物	0.11	
	抽出残渣	0.05		抽出残渣	0.0064	
41日	洗浄液	0.15	0.85	洗浄液	0.007	0.105
	抽出物	0.60		抽出物	0.081	
	抽出残渣	0.099		抽出残渣	0.016	

ii) 標識アクリナトリン (標準薬量) 処理区の放射性残留物

採取日	葉部位放射性残留物			果実部位放射性残留物		
	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg
処理当日	洗浄液	0.86	1.05	洗浄液	0.033	0.059
	抽出物	0.18		抽出物	0.023	
	抽出残渣	0.0040		抽出残渣	0.004	
13日(2回目 散布前)	洗浄液	0.23	0.57	洗浄液	0.002	0.032
	抽出物	0.31		抽出物	0.027	
	抽出残渣	0.036		抽出残渣	0.0033	
27日	洗浄液	0.24	1.2	洗浄液	0.010	0.129
	抽出物	0.85		抽出物	0.11	
	抽出残渣	0.071		抽出残渣	0.0086	
41日	洗浄液	0.21	0.73	洗浄液	0.008	0.084
	抽出物	0.45		抽出物	0.063	
	抽出残渣	0.068		抽出残渣	0.013	

ii) 標識アクリナトリン (10倍薬量) 処理区の放射性残留物

採取日	葉部位放射性残留物			果実部位放射性残留物		
	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg	項目	mg/kg	総放射性残留物 mg/kg
処理当日	洗浄液	7.4	8.4	洗浄液	0.29	0.36
	抽出物	1.02		抽出物	0.061	
	抽出残渣	0.048		抽出残渣	0.0023	
13日(2回目 散布前)	洗浄液	3.3	5.6	洗浄液	0.045	0.21
	抽出物	2.1		抽出物	0.15	
	抽出残渣	0.21		抽出残渣	0.022	
27日	洗浄液	3.8	9.0	洗浄液	0.29	0.82
	抽出物	5.0		抽出物	0.51	
	抽出残渣	0.21		抽出残渣	0.015	
41日	洗浄液	3.4	6.9	洗浄液	0.18	0.62
	抽出物	3.1		抽出物	0.39	
	抽出残渣	0.36		抽出残渣	0.047	

申請者注：概要分析は方向付けのみに用いられたもので、代謝物・分解物の分析(詳細分析)のTRRの計算には用いられていない。

標準薬量区の果実中あるいは表面上の TRR は、処理当日から処理 13 日目(2 回目処理前)の間に、
 標識では 0.051mg/kg から 0.028mg/kg に、
 標識では 0.059mg/kg から 0.032mg/kg に減少した。収穫時(それぞれ、1 回目処理 41 日後、2 回目処理 28 日後)のぶどう果実中あるいは表面上の TRR は、0.105mg/kg(標識)及び 0.084mg/kg(標識)であった。

標準薬量区果実の第 1 回処理直後の洗浄液中放射量は、(洗浄後の)果実に含まれる放射量にほぼ匹敵する量であったが、2 回目の散布前では洗浄液中の比率は小さくなり、果実部でも特に抽出物中の割合が多くなった。ぶどう葉中あるいは表面上の TRR は、処理当日から処理 13 日目(2 回目処理前)で、
 標識では 1.3mg/kg から 0.45mg/kg へ、
 標識では 1.1mg/kg から 0.57mg/kg へ減少した。収穫時の葉中あるいは表面上の TRR は、0.85mg/kg(標識)及び 0.73mg/kg(標識)であった。
 標準薬量の葉部において処理直後は洗浄液中に多くの放射能が見られたが、2 回目の散布前では洗浄液中の比率は洗浄後の葉部に比して小さくなった。このことはアクリナトリンが植物体表面より葉のワックス層に浸透していることを示した。

10 倍量薬量区の葉部および果実の残留は、標準薬量と同様な減少を示した。

4) 薬液散布後のぶどう果実及び葉部位の放射性アクリナトリンの定量

及び
 標識アクリナトリンを散布後の各採取日における果実及び葉部の洗浄液及び抽出物中のアクリナトリン量を下表に示した。

i) 標識アクリナトリン (標準薬量) 処理区の残留アクリナトリン

採取日	葉部位のアクリナトリン			果実部位のアクリナトリン		
	項目	mg/kg	(計)mg/kg (%TRR)*	項目	mg/kg	(計)mg/kg (%)*
処理当日	洗浄液	0.96	0.99 (76)	洗浄液	0.020	0.030 (59)
	抽出物	0.029		抽出物	0.010	
	TRR	1.3		TRR	0.051	
13 日(2 回目散布前)	洗浄液	0.066	0.13 (28)	洗浄液	0.0004	0.012 (43)
	抽出物	0.066		抽出物	0.011	
	TRR	0.46		TRR	0.028	
27 日	洗浄液	0.17	0.44 (39)	洗浄液	0.006	0.020 (15)
	抽出物	0.27		抽出物	0.014	
	TRR	1.12		TRR	0.13	
41 日	洗浄液	0.048	0.21 (25)	洗浄液	0.002	0.026 (25)
	抽出物	0.16		抽出物	0.024	
	TRR	0.85		TRR	0.105	

* : TRR 量に含まれるアクリナトリン割合% (申請者の計算)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

ii) 標識アクリナトリン（標準薬量）処理区の残留アクリナトリン

採取日	葉部位のアクリナトリン			果実部位のアクリナトリン		
	項目	mg/kg	(計)mg/kg (%TRR*)	項目	mg/kg	(計)mg/kg (%TRR*)
処理当日	洗浄液	0.84	1.02 (97)	洗浄液	0.031	0.050 (84)
	抽出物	0.18		抽出物	0.020	
	TRR	1.05		TRR	0.059	
13日(2回目散布前)	洗浄液	0.077	0.20 (35)	洗浄液	0.001	0.013 (41)
	抽出物	0.12		抽出物	0.012	
	TRR	0.57		TRR	0.032	
27日	洗浄液	0.10	0.32 (27)	洗浄液	0.003	0.011 (9)
	抽出物	0.21		抽出物	0.008	
	TRR	1.2		TRR	0.129	
41日	洗浄液	0.079	0.21 (29)	洗浄液	0.002	0.029 (35)
	抽出物	0.13		抽出物	0.026	
	TRR	0.73		TRR	0.084	

*: TRR 量に含まれるアクリナトリン割合% (申請者の計算)

標識アクリナトリン散布後、果実部位のアクリナトリン量は、TRR に対して処理当日は、59%であったが、41日目には、TRR 量の25%になった。同様に、標識アクリナトリン散布後、果実部位のアクリナトリン量は、TRR に対して、処理当日は、84%であったが、41日目には、アクリナトリン量は、TRR 量の35%になった。葉部においても同様の結果を得た。以上の結果からアクリナトリンは、ぶどう組織内あるいは、組織表面上で代謝あるいは、分解されていることを示唆している。

5) 代謝物/分解物の分析

41日後収穫されたぶどう果実における放射性残留物

	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10倍量散布		
	mg当量/kg	%TRR	mg当量/kg	%TRR	mg当量/kg	%TRR	
洗浄液	0.007	7	0.008	9	0.20	31	
非抽出性	0.016	16	0.013	14	0.06	9	
抽出物	アセトニトリル層	0.063	62	0.055	60	0.31	48
	水層等*	0.016	16	0.016	17	0.08	12
合計	0.102	100	0.092	100	0.65	100	

*: 抽出物の水層等の数値は、抽出物の合計からアセトニトリル層の抽出物を引いたもの(申請者の計算)

41日後収穫されたぶどう果実におけるアクリナトリン残留

	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10倍量散布	
	mg当量/kg	%TRR	mg当量/kg	%TRR	mg当量/kg	%TRR
表面(洗浄液)	0.0025	2.4	0.0029	3.1	0.167	25.7
果実抽出液	0.0341	35.2	0.0281	34.6	0.165	28.2
合計	0.0366	37.6	0.0310	37.7	0.332	53.9

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

ぶどう果実抽出物中の放射性残留物の主要成分はアクリナトリン(TRR の約 35%)であった。表面洗浄液のアクリナトリンの割合は、標準散布では約 2%、10 倍量散布では約 26%であった。ぶどう果実表面及び果実中の総アクリナトリン残留物は、標準散布では 0.031-0.037mg/kg(TRR の 38%)であり、10 倍量散布では、0.33mg/kg(TRR の 54%)であった。

41 日後果実上及び果実中の放射能物質の HPLC 分析結果

代謝物	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10 倍量散布	
	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR
P1(アクリナトリン)	0.037	38	0.031	38	0.33	54
合計	0.071	73	0.064	77	0.51	84

HPLC/LSC により計測された代謝物ピークは、アクリナトリンを除いてどれも TRR の 10%を超えず、標準量で散布された植物から収穫されたぶどう果実の表面及び果実中の代謝物・分解物のピークのいずれも 0.01mg/kg を超えなかった。

41 日後収穫されたぶどう葉中における放射性残留物

	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10 倍量散布		
	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR	
洗浄液	0.15	17	0.21	28	3.4	50	
非抽出性	0.10	12	0.07	9	0.4	6	
抽出物	アセトニトリル層	0.27	31	0.24	32	1.6	24
	水層等*	0.34	40	0.22	30	1.4	21
合計	0.86	100	0.74	100	6.8	100	

*: 抽出物の水層等の数値は、抽出物の合計からアセトニトリル層の抽出物を引いたもの(申請者の計算)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

41 日後葉上および葉中のアクリナトリン残留

	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10 倍量散布	
	mg 当量 /kg	%TRR	mg 当量 /kg	%TRR	mg 当量 /kg	%TRR
表面(洗浄液)	0.038	4.4	0.059	8.0	2.65	39.0
葉抽出液	0.098	11.4	0.080	10.8	0.83	12.2
合計	0.136	15.8	0.139	18.8	3.48	51.2

葉の抽出物中のほとんどの放射性残留物はアクリナトリンであった(TRR の約 10%)。表面洗浄液中のアクリナトリンは、1 倍量散布では、約 4-8%、10 倍量散布では、約 39%であった。葉中あるいは葉の表面での全アクリナトリン残留物は、標準散布では、約 0.14mg/kg(TRR の 16-19%)、10 倍量散布では、3.5mg/kg(TRR の 51%)であった。

41 日後葉上および葉中の放射能物質の HPLC 分析結果

RP-HPLC ピーク割り当て	標識 標準散布		標識 標準散布		標識 10 倍量散布	
	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR	mg 当量/kg	%TRR
P1(アクリナトリン)	0.136	16	0.139	19	3.5	51
合計	0.40	46	0.41	58	5.0	73

検出されたどのピークも TRR の 10%を超えなかった。

		葉				果実			
		葉中 TRR%	比率%	葉表面 TRR%	比率%	果実中 TRR%	比率%	果実表面 TRR%	比率%
標識 標準散布	アクリナトリン	11.4	77	4.4	70	35.2	82	2.4	73
標識 標準散布	アクリナトリン	10.8	79	8	78	34.6	91	3.1	78
標識 10 倍量散布	アクリナトリン	12.2	87	39	94	28.2	92	25.7	95

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

アクリナトリンは、光によりぶどう樹表面で異性化された。異性体の濃度は1回目の処理直後と41日目の収穫後に葉と果実の洗浄液を調べられ、主に洗浄液中で高い比率で検出された

いずれの場合も

異性体の総量は、常に残留アクリナトリン量の10%以下であった。アクリナトリン及び異性体のピーク以外の代謝物ピークは、いずれも微量で既知の基準物質とコクロマトグラムによる合致はなかった。

結論：

- ・水/アセトニトリルの酸性混合液は、ぶどう果実から TRR の 84%以上を、ぶどう葉から TRR の 88%以上を遊離させる優れた抽出溶液であることが明らかになった。
- ・アクリナトリンの異性体は植物表面において主に形成された。植物抽出物中には、それらは、極少量が観察されたのみであった。総計で、アクリナトリンの異性体はぶどう果実中あるいは葉中において TRR の約 3%を超えることはなかった。
- ・ぶどう果実及び葉の表面洗浄液及び抽出物中の結果を総合すると、アクリナトリンは、残留物の主要成分である。従って、残留分析において、アクリナトリンが分析対象化合物である。他の含有成分はマイナー代謝物で、それぞれは通常薬量散布後において、TRR の 10%、あるいは、ぶどう果実で 0.01mg 当量/kg、葉で 0.05 mg 当量/kg を超過しなかった。ぶどうにおけるアクリナトリンの代謝を下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(3) および アクリナトリンを用いたキャベツにおける
代謝試験
(資料No.51)

供試化合物： 2種の標識アクリナトリン

化学名：(S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル (Z)-(1R, cis)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

試験植物； 購入したキャベツ苗木（品種 Stinehead F1 Hybrid Espoir）をポットで育成、最終的に250リットルコンテナーに定植し屋外で育てた。

方 法：

処理及び試料の採取：提供された 標識アクリナトリンのトルエン溶液を窒素気流下で濃縮乾固させ、残渣に製剤の白試料を加えて懸濁させた。この検体懸濁液を水で希釈し、野外で栽培中のキャベツの選択された中心葉に塗布した。処理時期及び処理濃度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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

処理時期	収穫期前8週		収穫期前4週	
供試化合物				
処理濃度 (mg a. i. /ml)	0.356	0.373	0.364	0.374

収穫期前8週に処理した区からは、処理直後、4及び8週間後に、また、収穫期前4週に処理した区からは、処理直後、2及び4週間後に処理葉を採取した。用量選択の説明は記載なし。

代謝物の分離及び分析;採取した葉の表面をアセトニトリルで洗浄し、洗液を分取し、洗浄後の葉をアセトニトリル中で摩砕抽出し、アセトニトリル/水 (1:1) 及び水で順次抽出した。

抽出残渣を4MのHClで還流し、HCl抽出液を20MのNaOHで中和し凍結乾燥した後メタノールで抽出した。各抽出液中の代謝物は、標準化合物との薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

放射能の測定;抽出液は直接、抽出残渣及び一部の抽出液は乾燥セルロース粉末とともに燃焼した後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。TLCプレート上の放射能は、走査によってラジオクロマトグラムを作成し、代謝物の割合を求めた。

結果: 各採取時期における葉の各画分への放射能分布を表1にまとめた。いずれの標識化合物も、処理葉の表面に残留する放射能は経時的に減少し、溶媒及び酸還流抽出液及び抽出残渣中の放射能が増加した。処理葉における代謝物分析の結果を親化合物相当量 (ppm) として表2にまとめた。親化合物[A]の減少は速やかであった。いずれの標識化合物を処理した場合にも、主要な放射性成分は親化合物[A]であった。また、極少量ではあるが、親化合物の異性体が検出されたが、立体構造は特定されなかった。

以上のように、キャベツに処理したアクリナトリンは経時的に減少し、非抽出性放射能が増加した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 1

供試化合物	試料	画分	総残留放射能に対する割合 (%)					
			収穫 8 週間前処理			収穫 4 週間前処理		
			0 週	4 週	8 週	0 週	2 週	4 週
アクリナトリン	葉	表面洗浄液	94.2	43.4	17.9	70.1	55.1	27.8
		溶媒抽出液	5.5	35.8	43.4	24.9	30.6	41.7
		還流抽出液	0.1	7.1	8.7	1.7	5.4	9.3
		抽出残渣	0.2	13.7	30.0	3.4	9.0	21.2
		総残留放射能*	8.82	1.26	0.70	7.33	3.49	1.75
アクリナトリン	葉	表面洗浄液	94.8	37.6	8.9	74.9	49.3	21.7
		溶媒抽出液	5.0	40.3	46.1	19.7	34.4	55.5
		還流抽出液	0.1	9.4	18.2	3.5	7.5	9.0
		抽出残渣	0.1	12.7	26.8	2.0	8.8	13.7
		総残留放射能*	8.66	0.67	0.16	8.30	2.30	1.14

* : 単位は親化合物相当量ppm

表2 (処理葉全体)

供試化合物	試料	代謝物	濃度 (親化合物相当量ppm)					
			収穫8週間前処理			収穫4週間前処理		
			0週	4週	8週	0週	2週	4週
アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	8.46 (95.9)	0.66 (52.4)	0.22 (31.4)	6.58 (89.8)	2.24 (64.2)	0.80 (45.7)
		総残留放射能	8.82	1.26	0.70	7.33	3.49	1.75
アクリナトリン	葉	アクリナトリン[A]	8.38 (96.8)	0.33 (49.3)	0.03 (18.8)	7.30 (88.0)	1.29 (56.1)	0.51 (44.7)
		総残留放射能	8.66	0.67	0.16	8.30	2.30	1.14

注) () の数値は総残留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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(4) キャベツにおける代謝試験（未同定代謝物の同定）

（資料 No.51-1）

方 法：作物、処理、収穫は HRC 報告書（資料 No.51）の通り

試料送付；表面洗浄液、アセトニトリル抽出液、アセトニトリル／水抽出液、水抽出液及び塩酸還流抽出液はドライアイスと共に送付された。

保存中安定性；表面洗浄液及び抽出液（アセトニトリル、アセトニトリル／水及び水抽出液を合わせた）を想定代謝物標品との一元薄層クロマトグラフィー（TLC/ARG）に供し、の分析値と比較した。

代謝物の分析；表面洗浄液及び各抽出液はそのままラジオ高速液体クロマトグラフィー（Radio/HPLC）に供し、想定代謝物標品と保持時間を比較した。塩酸還流抽出液は水酸化ナトリウムで pH6 に調整後、乾固しメタノールに溶解し Radio/HPLC に供した。

極性代謝物の誘導化；アセトニトリル抽出液、アセトニトリル／水抽出液及び水抽出液について実施した。

（アセトニトリル抽出液） 体の収穫 4 週間前処理 2 週後の試料(DM16)を C-18 Sep-Pak カートリッジに乗せ、脱塩水ついでアセトニトリルで溶出した。脱塩水溶出液はグラジェント HPLC で、保持時間 0~6 分及び 6~20 分の溶出画分を分取した。各画分の一部を室温でピリジン中無水酢酸によりアセチル化し、一部を 6M 塩酸中で 4 時間還流加水分解した。各処理後 Radio/HPLC に供し、処理前のクロマトグラムと比較・検討した。

（アセトニトリル／水抽出液） 体の収穫 4 週間前処理 2 週後の試料（DM17）及び 4 週後の試料(DM18)をエーテル中ジアゾメタンによ

りメチル化した。処理後 Radio/HPLC に供し、処理前のクロマトグラムと比較・検討した。

(水抽出液) 体の収穫 4 週間前処理 2 週後の試料 (DM16) を室温でピリジン中無水酢酸によりアセチル化した。処理後 Radio/HPLC に供し、処理前のクロマトグラムと比較・検討した。

体の収穫 8 週前処理 8 週後の試料 (BE1) 及び

体の収穫 4 週間前処理 2 週後の試料 (DM19) をジアゾメタンで、その一部はついで無水酢酸処理をした。処理後 Radio/HPLC に供し、各処理前のクロマトグラムと比較・検討した。

試料 (BE1 及び DM19) の一部はセルラーゼあるいは β -グルコシダーゼと pH5 の緩衝液中 35°C で 19.5 時間インキュベートし、処理後 Radio/HPLC に供し、各処理前のクロマトグラムと比較・検討した。

試料 (BE1 及び DM19) は TLC に乗せ、溶媒系 8b (HRC の方法) で展開後、原点に留まる放射能をメタノールで抽出した。つぎにこの放射能を極性の高い溶媒系、n-ブタノール/酢酸/水 (6:1:1) で展開した。

体の収穫 4 週間前処理 2 週後の試料 (BE14) はグラジェント HPLC で極性代謝物を分離した。

結 果 :

保存中安定性 ; 保存後の TLC/ARG 分析値を保存前の分析値 (HRC) とともに、下表に示す。

画 分	代謝物	放射能の割合 (%)							
		収穫 8 週前処理				収穫 4 週前処理			
		4 週後		8 週後		2 週後		4 週後	
		PTRL	HRC	PTRL	HRC	PTRL	HRC	PTRL	HRC
表面洗淨液	アクリナトリン	75	88	80	79	82	91	89	79
	アクリナトリン異性体	4	4	4	3	11	5	—	4
	その他	1	—	3	—	—	—	—	—
	極性代謝物	20	8	13	18	7	4	11	17
抽出液	アクリナトリン					32	37	53	52
	アクリナトリン異性体					4	5	7	5
	その他					3	—	5	—
	極性代謝物					61	58	35	43

空欄 : 試料なし — : 検出されず

その他の代謝物が保存中に 1~5% 生成したが、アクリナトリン、異性体及び極性代謝物の割合には、凍結保存中に大きな変化が認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

代謝物の分析：

表面洗浄液；

試料の Radio/HPLC 分析結果を下表に示す。

(2 連制で分析した試料は平均値で示した。次頁以降も同様)。

標識体	代謝物	記号	残留濃度 [アクリナトリン当量 ppm]					
			収穫 8 週前処理			収穫 4 週前処理		
			0	4	8 週後	0	2	4 週後
	アクリナトリン (異性体を含む)	A	8.34 (99.6)	0.52 (94.6)	0.09 (82.4)	6.28 (100)	1.86 (96.3)	0.53 (97.2)
	アクリナトリン (異性体を含む)	A	8.24 (100)	0.21 (92.8)	0.01 (71.6)	6.71 (99.9)	1.20 (97.0)	0.20 (91.5)

() : 試料中放射能に対する割合 (%) - : 検出されず

表面洗浄液中の極性代謝物は<0.01~0.02ppm 低レベルで存在し、大部分 (72~100%) はアクリナトリンであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

アセトニトリル抽出液;HRC より送付された試料の Radio/HPLC 分析結果を下表に示す。

標識体	代謝物	記号	残留濃度 [アクリナトリン当量 ppm]					
			収穫 8 週前処理			収穫 4 週前処理		
			0	4	8 週後	0	2	4 週後
	アクリナトリン (異性体を含む)	A				0.32 (57.8)	0.28 (85.7)	

(): 試料中放射能に対する割合 (%) 空欄: 試料なし - : 検出されず

体処理 2 週後のキャベツのアセトニトリル抽出液中に、極性代謝物が 0.11ppm 相当存在した。従って、この試料については極性代謝物の検索を進めた。

アセトニトリル/水抽出液;HRC より送付された試料の Radio/HPLC 分析結果を下に示す。

標識体	代謝物	記号	残留濃度 [アクリナトリン当量 ppm]					
			収穫 8 週前処理			収穫 4 週前処理		
			0	4	8 週後	0	2	4 週後
	アクリナトリン (異性体を含む)	A				0.03 (12.1)	0.06 (27.7)	

(): 試料中放射能に対する割合 (%) 空欄: 試料なし - : 検出されず

2 及び 4 週後の試料に 0.04~0.07ppm 相当の極性代謝物が存在し、さらに検討を加えた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

水抽出液 ;HRC より送付された試料の Radio/HPLC 分析結果を下表に示す。

標識体	代謝物	記号	残留濃度 [アクリナトリン当量 ppm]					
			収穫 8 週前処理			収穫 4 週前処理		
			0	4	8 週後	0	2	4 週後
	アクリナトリン (異性体を含む)	A	—	—	—	—	—	—
	アクリナトリン (異性体を含む)	A		<0.01 (0.20)		<0.01 (3.43)	<0.01 (1.15)	<0.01 (0.42)

() : 試料中放射能に対する割合 (%)

空欄 : 試料なし

— : 検出されず

本抽出画分には極性代謝物が<0.01~0.06ppm 存在した。極性代謝物の検討には、
体の収穫 8 週前処理 8 週後、収穫 4 週前処理 2 週後
また、
体の収穫 4 週前処理 2 週後および収穫 4 週前処理 4 週後の試料を用いた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

代謝物の分析；未同定代謝物と称される成分は Radio/HPLC 分析において 2 つのグループに分類される。

- 1) 逆相 HPLC カラムのボイド容量又はその付近で溶出する極性代謝物
- 2) 中程度の極性を有する多数の未同定代謝物

水抽出液（抽出液 3）を主に、アセトニトリル抽出液（抽出液 1）およびアセトニトリル／水抽出液（抽出液 2）の極性代謝物および未同定代謝物を、HPLC で分離した。分離ピークは >0.05、0.05～0.01 および <0.01ppm にランク分けし、その濃度に相当するピーク数を下表に示した。

標識体	試料		試料 濃度 Ppm	極性代謝 物の濃度 ppm	未同定代謝物 濃度 ppm	未同定極性代謝物のピーク数				
						>0.05 ppm	0.05～0.01 ppm	<0.01 ppm		
	収穫 8 週前 処理	4 週後	洗浄液	0.402	0.013	0.017 (4.26)	—	1	1	
			抽出液 3	0.048	0.015	0.026 (53.7)	—	—	12	
		8 週後	洗浄液	0.109	0.015	0.002 (1.89)	—	—	1	
			抽出液 3	0.043	0.017	0.021 (47.7)	—	—	16	
	収穫 4 週前 処理	2 週後	洗浄液	1.598	—	0.010 (0.61)	—	1	—	
			抽出液 3	0.114	0.061	0.045 (39.1)	—	—	12	
		4 週後	洗浄液	0.740	—	—	—	—	—	
			抽出液 3	0.068	0.027	0.037 (54.9)	—	—	13	
	収穫 8 週前 処理	4 週後	洗浄液	0.261	0.022	0.002 (0.72)	—	—	2	
			抽出液 3	0.024	0.010	0.006 (27.0)	—	—	12	
		8 週後	洗浄液	0.012	<0.01	0.003 (21.7)	—	—	19	
			抽出液 3	0.010	分析せず	分析せず	分析せず			
		収穫 4 週前 処理	2 週後	洗浄液	1.489	0.020	0.012 (0.82)	—	1	—
				抽出液 1	0.587	0.119	0.116 (19.8)	—	6	9
	抽出液 2			0.231	0.062	0.130 (56.5)	—	4	13	
	抽出液 3			0.110	0.083	0.016 (14.9)	—	—	8	
	4 週後		洗浄液	0.219	0.012	—	—	—	—	
			抽出液 1	0.354	0.036	0.002 (0.44)	—	—	1	
			抽出液 2	0.161	0.039	0.079 (49.04)	—	2	12	
			抽出液 3	0.057	0.038	0.014 (24.01)	—	—	12	
		還流抽出液	1	0.122	0.021	0.101 (82.8)	—	1	7	
	2		0.143	0.040	0.103 (72.0)	—	2	10		

() : 画分中放射能に対する割合 — : ピークなし

溶媒抽出液：1 (アセトニトリル)、2 (アセトニトリル／水) および 3 (水)

還流抽出液：1 (4M 塩酸)、2 (4M 塩酸)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

極性代謝物のピークは 2 週間後の抽出液で 0.12～0.06ppm であったが、抽出液 1 及び 3 についてはアセチル化、抽出液 2 についてはメチル化により多数の極性成分よりなることが確認された。4 週及び 8 週後ではすべて 0.04～0.02ppm の低いレベルで存在していた。

全ての試料で未同定代謝物は多数のピークに分離された。ピークの大多数は <0.01ppm であり、0.05～0.01ppm のピークもあったが、0.05ppm 以上のピークはなかった。

以上のように、極性代謝物は 4 週又は 8 週後で全て 0.05ppm 以下であった。また、未同定代謝物は HPLC で多くの成分に分離され、各成分の濃度は低く全て 0.05ppm 以下であり、大多数は 0.01ppm 以下であった。

これら成分はカルボキシル基、フェノールあるいはアルコール性の水酸基を有することが誘導化の検討で確認出来た。また、酵素処理により、グルコース抱合体の存在が示唆された。

従って極性代謝物と中程度の極性を有し、数多くの成分からなる未同定代謝物は 4 週後では、いずれも 0.05ppm 以下の数多くの成分から構成されていることが示された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

極性代謝物の誘導；水抽出液を主に、アセトニトリル抽出液、アセトニトリル/水抽出液について検討した結果を下表に示した。

方法	抽出画分		
	アセトニトリル抽出液	アセトニトリル/水抽出液	水抽出液
アセチル化後 HPLC	極性代謝物のピークが消えて、保持時間が延長した多数のピークが観察された。水酸基の存在が推測される。(DM16)		アセトニトリル抽出と同様な結果。(DM16)
6M 塩酸還流後 HPLC	還流前の HPLC クロマトグラムと変わらず、抱合体は存在しないと推測される。(DM16)		
メチル化後 HPLC		極性代謝物のピークが消えて、保持時間が延長した多数のピークが観察された。カルボン酸の存在が推測される。(DM17、DM18)	メチル化前後の HPLC クロマトグラムに変化がみられない。カルボン酸は存在せず。(BE 1、DM19)
セルラーゼ あるいは β -グルコシダーゼ 処理後 HPLC			処理前後で HPLC クロマトグラムが変化し、フェノキシ安息香酸(E)が遊離した。両酵素処理後のクロマトグラフは同じであり、グルコース抱合体が存在した。(BE 1、DM19)
TLC 原点物質を再 TLC			BE 1 は原点に留まり、抱合体の可能性。DM19 は多数の極性物質に分離。(BE 1、DM19)
グラジエント HPLC			極性代謝物は多数の成分に分離した。(BE14)

これら極性代謝物はカルボキシル基あるいは水酸基を有し、また一部はグルコース抱合体を受けた多数の成分からなっていた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

キャベツにおける代謝推定経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(5) きゅうりにおける代謝試験

(資料 No.64)

供試化合物： 3種の標識アクリナトリン

化学名：(S)- α -シアノ-3-フェノキシベンジル (Z)-(1R, cis)-2,2-ジメチル-3-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1-トリフルオロメチルエトキシカルボニル)ビニル]シクロプロパンカルボキシレート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

供試植物：施設内で栽培されたきゅうり（品種：Cucumis sativus）

試験方法：

処理溶液の調整；

希釈原液：各標識体の保存溶液（約 9mg/ml）0.75ml にトルエン 4.35ml を加え希釈原液（約 1.3mg/ml）を調製した。

希釈液：各希釈原液 10 μ l を 10ml のトルエンに加え、希釈液を調製した。

散布溶液：各標識体の希釈液中の標識体重量が 1.312 μ g となるよう秤取し（約 1ml）、メタノールを加えて 50ml とした。

処理方法及び処理量設定根拠；

各標識体に対して 4 株を供した

1 回目処理：1 株につき、調製した処理溶液 50ml を手動噴霧装置を用いて全ての果実、花、さらにできるだけ多くの茎葉に散布した。

2 回目処理：1 回目処理 14 日後に、1 回目と同様の処理を行った。

処理量は予想最大投下薬量（31.75g/acre=78.5g/ha）とした。

試料採取時期；

1 回目処理直後、2 回目散布直前及び 2 回目散布 28 日後に果実を収穫した。茎葉は 2 回目散布 28 日後にのみ収穫した。各標識 4 株は 2 株ずつ試料 1 および試料 2 として分析した。

分析方法；

果実：収穫後アセトニトリルで果実表面を洗浄した。試料をドライアイスとともに磨砕し、そのうち 0.5g を採取し、直接サンプルオキシダイザーにより放射能を測定した。試料（10g）を遠沈管に秤り取り、アセトニトリル：水（9:1）10ml を加え振とうした後遠心した。抽出液を採りだし、残留物にアセトニトリル：水（1:1）10ml を加え同様の操作を行った。各々の抽出液を合わせ減圧濃縮した。濃縮操作の前後で抽出液の放射能を測定した。濃縮液及び果実表面洗浄液を HPLC 分析に供した。

標識体及び

標識体処理区の 2 回目及び 3 回目

収穫試料は極性代謝物を調べるために別途、上記と同様に抽出した。減圧濃縮によりアセトニトリルを留去した後、濃縮液を pH5 に調製し、ジクロロメタンで 3 回抽出し、抽出液を合わせ減圧濃縮した。濃縮液及び水層を TLC 分析に供しアクリナトリンの有無を調べた。残りの水層を 3 つに分け（試料 A、B、C）各々を凍結乾燥により水を除去した。

試料 A はアセトニトリル：水（1:1）で溶解後、HPLC 及び TLC に供した。

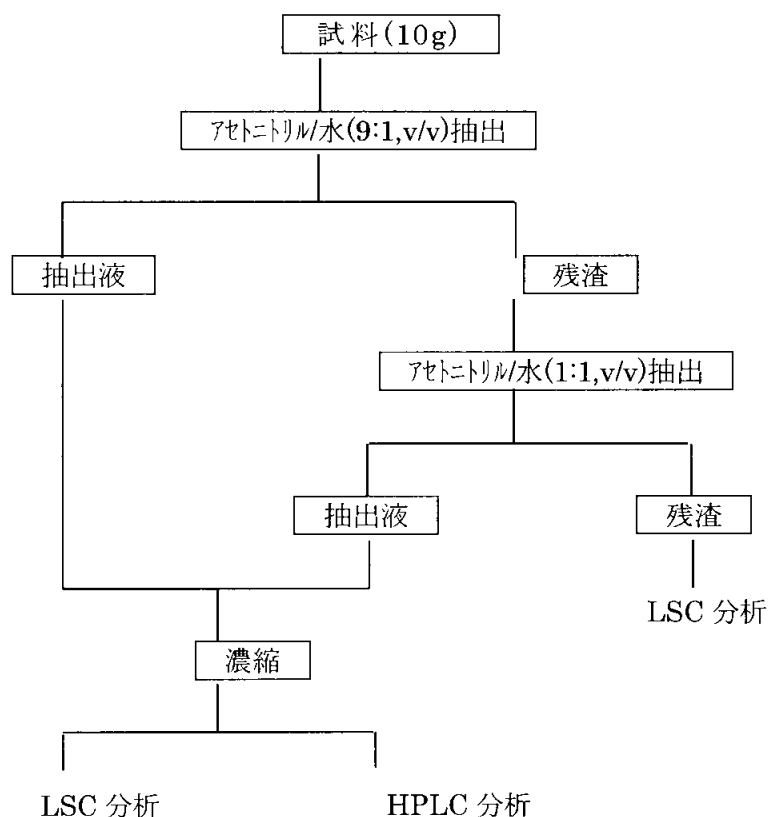
試料 B は酵素による加水分解に供した。試料をセルラーゼ溶液 1ml に溶解し、37 $^{\circ}$ C で 60 時間インキュベーションした。酵素処理後、試料を HPLC 及び TLC に供した。

試料 C は強酸による加水分解に供した。試料を 6N 塩酸に溶解し 80-90°C で 1 時間加熱した。72 時間室温に放置した後、水酸化ナトリウムで中和し、最終的に硫酸で pH4~7 に調整後、HPLC 及び TLC に供した。ベンジル標識体処理区試料については加水分解後の放射エネルギーが少なく分析ができなかった。

茎葉：試料をドライアイスとともに磨碎し、そのうち 0.5g を採取し、直接サンプルオキシダイザーにより放射能を測定した。

試料 (10g) を遠沈管に秤り取り、アセトニトリル：水 (9:1) 10ml を加え振とうした後遠心した。抽出液を採りだし、残留物にアセトニトリル：水 (1:1) 10ml を加え同様の操作を行った。各々の抽出液を合わせ減圧濃縮した。濃縮操作の前後で抽出液の放射能を測定した。濃縮液を HPLC 分析に供した。

抽出分析操作フローチャート (果実)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

機器分析：

総放射能測定：

各抽出液および固体試料（抽出残渣を含む）について総放射能を測定した。固体試料はサンプルオキシダイザー（OX6000）で燃焼し生成した¹⁴C¹⁴O₂を捕集し、液体シンチレーションカウンター（5000CE）で放射能を測定した。抽出液についてはそのまま液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

HPLC 分析：

分解物と標準品とのクロマトグラフを行い分解生成物の同定及び定量を行った。通常の分解生成物の分析には HPLC 分析法 I（Supelcosil C18 を用いた逆相 HPLC）を適用した。異性体の組成分析には HPLC 分析法 II（YMC pack CN を用いた順相 HPLC）を適用した。

TLC 分析：

展開溶液にブタノール：酢酸：水（6:1:1、v/v/v）を用い、主に高極性分解生成物の分離同定を行った。

結果：

1) 放射能分布

果実、花及び茎葉に処理された被験物質は各部に分布したが、直接散布されていない果実中（2回目処理 28 日後採取）の放射能が低かったことから移行性は低いものと考えられた。各部における総残留濃度および分布率を表 1 に示した。

表 1 各部における総残留濃度および分布率

	果実					茎葉
	表面洗浄液		洗浄後果実		合計 (ppm)	残留濃度 (ppm)
	残留濃度 (ppm)	分布率 (%)	残留濃度 (ppm)	分布率 (%)		
標識体						
1 回目処理直後	0.384	64.4	0.212	35.6	0.596	—
2 回目処理直前	0.003	10.0	0.027	90.0	0.030	—
2 回目処理 28 日後	0.001	7.7	0.012	92.3	0.013	0.297
標識体						
1 回目処理直後	0.303	65.2	0.162	34.8	0.465	—
2 回目処理直前	0.002	6.9	0.027	93.1	0.029	—
2 回目処理 28 日後	<0.0005	0.0	0.015	100.0	0.015	1.547
標識体						
1 回目処理直後	0.305	69.3	0.135	30.7	0.440	—
2 回目処理直前	0.011	8.4	0.120	91.6	0.131	—
2 回目処理 28 日後	0.002	8.7	0.021	91.3	0.023	1.105

2) 代謝

①残留放射能の特徴付け

各試料の残留放射能の大部分がアセトニトリル/水により抽出された。2回目散布直前及び2回目散布28日後の試料の一部については抽出液を濃縮後さらにジクロロメタンで抽出した結果、放射能の多くが水層に認められた。各標識体における抽出画分毎の放射能濃度を表2-1~3に示した。

表2-1 果実中の放射能濃度 (標識体)

	1回目散布直後		2回目散布直前				2回目散布28日後			
			試料1		試料2		試料1		試料2	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アセトニトリル/水抽出	0.202	95.5	0.032	91.5	0.017	87.5	0.006	91.7	0.015	92.5
ジクロロメタン抽出 ジクロロメタン層 水層										
アセトニトリル/水抽出残渣	0.010	4.5	0.003	8.5	0.002	12.5	0.001	8.3	0.001	7.5
合計	0.212	100.0	0.035	100.0	0.019	100.0	0.007	100.0	0.016	100.0

空欄は分析せず

表2-2 果実中の放射能濃度 (標識体)

	1回目散布直後		2回目散布直前				2回目散布28日後			
			試料1		試料2		試料1		試料2	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アセトニトリル/水抽出	0.152	94.2	0.023	82.2	0.019	78.8	0.006	83.7	0.022	96.2
ジクロロメタン抽出 ジクロロメタン層 水層			0.007 0.018						0.003 0.016	
アセトニトリル/水抽出残渣	0.009	5.8	0.005	17.8	0.005	21.2	0.001	16.3	0.001	3.8
合計	0.162	100.0	0.028	100.0	0.025	100.0	0.007	100.0	0.023	100.0

空欄は分析せず

表 2-3 果実中の放射能濃度 (標識体)

	1 回目散布 直後		2 回目散布直前				2 回目散布 28 日後			
			試料 1		試料 2		試料 1		試料 2	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アセトニトリル/水抽出	0.126	93.0	0.153	86.2	0.050	81.3	0.023	87.2	0.013	82.5
ジクロロメタン抽出										
ジクロロメタン層			0.014						0.003	
水層			0.042						0.019	
アセトニトリル/水抽出残渣	0.010	7.0	0.024	13.8	0.012	18.7	0.003	12.8	0.003	17.5
合 計	0.135	100.0	0.178	100.0	0.062	100.0	0.026	100.0	0.016	100.0

空欄は分析せず

②代謝物の同定

アセトニトリル/水抽出液は LSC 分析とは別に、代謝物の同定のため HPLC による標準物質とのコクロマトグラフを行った。さらにラジオ TLC によるコクロマトグラフも行った。

果実表面洗浄液中の放射能はいずれの収穫時においても、その大部分は未変化体のアクリナトリンであった。果実内の放射能については大部分が高極性の代謝物であった。TLC 分析によりこれらが多数の少量 (0.001ppm 以下) 代謝物により構成されていることが判明したが、同定には至らなかった。また、極性代謝物を酵素処理あるいは強酸による加水分解を行った結果、その一部は抱合体であることが示唆された。

各標識体処理区試料の代謝物の濃度を表 3-1~3-3 に示した。

③まとめ

散布直後の試料を除いて、処理放射能の 90%以上が果実内に分布していた。それらの放射能はアセトニトリル/水抽出により、いずれの試料においても総放射能の 80%以上が抽出された。抽出液をさらにジクロロメタン転溶したところ、ジクロロメタンに抽出された放射能は 20%前後であり、放射能の多くは水層に認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

果実中の主要な放射能は未変化のアクリナトリン及び未同定の極性代謝物であり、いずれの試料においてもそれらを合わせると TRR の約 90%を占めていた。

以上のことから、果実内に取り込まれたアクリナトリンは比較的安定ではあるが一度分解が始まると短時間で極性代謝物にまで分解されると考えられる。

アクリナトリンのきゅうり果実における推定代謝経路を図1に示した。

なお、果実表面上に残存するアクリナトリンは異性化を受け、様々な異性体が生成されたが、表面洗浄後の果実中には異性体がほとんど検出されていないことから、果実内においては異性化が極めて起こりにくいことが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 3-1 果実中の代謝物濃度 (標識体)

	1 回目散布直後				2 回目散布直前								2 回目散布 28 日後			
	洗浄液		抽出液		試料 1				試料 2				試料 1*		試料 2	
	濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アクリナトリン	0.384	100.0	0.192	94.9	0.004	99.6	0.029	89.7	0.001	100.0	0.011	62.3			0.014	92.3
アクリナトリン	0.113	29.4													0.010	70.8
合計	0.384	100.0	0.202	100.0	0.004	100.0	0.032	100.0	0.001	100.0	0.017	100.0	0.006		0.015	100.0

空欄は検出されず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 3-2 果実中の代謝物濃度 (標識体)

	1 回目散布直後				2 回目散布直前								2 回目散布 28 日後			
	洗浄液		抽出液		試料 1				試料 2				試料 1*		試料 2	
	濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アクリナトリン	0.303	100.0	0.134	88.0	0.001	94.6	0.010	43.6	0.002	98.9	0.009	45.7			0.001	3.5
アクリナトリン	0.164	54.1	0.127	94.5			0.008	75.8			0.007	73.3				
合計	0.303	100.0	0.152	100.0	0.001	100.0	0.023	100.0	0.003	100.0	0.019	100.0	0.006	100.0	0.021	100.0

空欄は検出されず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 3-3 果実中の代謝物濃度（ジメチルシクロプロピル標識体）

	1回目散布直後				2回目散布直前								2回目散布 28 日後			
	洗浄液		抽出液		試料 1				試料 2				試料 1		試料 2	
	濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR		濃度 (ppm)		%TRR	
	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR	濃度 (ppm)	%TRR
アクリナトリン	0.305	100.0	0.114	90.2	0.014	86.3	0.132	86.5	0.005	100.0	0.001	2.6	0.001	3.6		
アクリナトリン	0.103	33.7					0.115	87.2								
合計	0.305	100.0	0.126	100.0	0.016	100.0	0.153	100.0	0.005	100.0	0.050	100.0	0.023	100.0	0.013	100.0

空欄は検出されず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

図1 きゅうりにおける推定代謝経路