

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

2) ラットを用いた繁殖試験

(資料 No. 6-1(2))

試験機関 :

報告書作成年 : 1990 年 [GLP 対応]

検体の純度 : 97.67% (グリホサート)

供試動物 : SD 系アルビノラット、1 群雌雄各 30 匹、投与開始時 7 週齢

投与期間 : P 世代 ; 投与開始から F1 児離乳時までの約 17 週間

F1 世代 ; 離乳時から F2a 離乳時までの約 19 週間、及びその後 F2b 離乳時まで約 9 週間

投与方法 : 検体を 0、2,000、10,000、30,000ppm 含有した飼料を自由に摂食させた。

用量設定根拠 ; 本試験に先立ち、1 群雌雄各 5 匹を用い、0、30,000、40,000、50,000ppm の投与量で 4 週の予備試験を実施したところ、30,000ppm 投与群の雌雄に軟便、40,000ppm 投与群及び 50,000ppm 投与群では軟便及び下痢がみられ、各投与群に体重増加減少がみられたため、本試験の最高投与量は体重減少による下痢症状とその 2 次的作用 (栄養バランス欠除、脱水症状及び死亡) を考慮し、30,000ppm とした。

交配、調整・選抜及び観察・検査項目 : 概要を表 1 にまとめた。

一般状態及び死亡率 ; 全動物の全試験期間に一般状態及び生死を 1 日 2 回観察した。

交配及び妊娠の確認 ; 雌雄を 1 対 1 で最長 7 日間同居させ、交尾を確認した日 (膣栓または膣垢像の確認) を妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する指標 ; 交尾、妊娠、出産及び哺育時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{雄交尾率} \quad (\%) = \frac{\text{交尾を認めた雄動物数}}{\text{交配に用いた雄動物数}} \times 100$$

$$\text{雌交尾率} \quad (\%) = \frac{\text{交尾を認めた雌動物数}}{\text{交配に用いた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{妊 娠 率} \quad (\%) = \frac{\text{妊娠した雌動物数}}{\text{交尾を認めた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{妊 孕 率} \quad (\%) = \frac{\text{雌を妊娠させた雄数}}{\text{交尾確認雄数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{正常分娩した雌動物数}}{\text{妊娠した雌動物数}} \times 100^{1)}$$

妊娠期間 = 交尾を確認した日から分娩完了までの日数

$$\text{平均産児数} = \frac{\text{総産児数}}{\text{正常出産雌数}}$$

$$\text{性比 (\%)} = \frac{\text{雄児総数}}{\text{総出産児数}} \times 100^{2)}$$

$$\text{哺育0日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育0日生存児数}}{\text{総出産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育4日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育4日生存児数}}{\text{哺育0日生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育14日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育14日生存児数}}{\text{哺育4日生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育21日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育21日生存児数}}{\text{哺育14日生存児数}} \times 100$$

<sup>1)</sup> 出産率は、日本モンサント株式会社が個体別表で1匹以上の生存児を産んだ母動物と妊娠動物数の比を求めた。

<sup>2)</sup> 性比は、日本モンサント株式会社が概要表から計算して求めた。

**臓器重量**；P、F<sub>1</sub>親動物の全動物の卵巢または精巢（精巢上体を含む）の重量を測定した。また、対体重比も求めた。

**病理組織学的検査**；対照群と30,000ppm投与群のP及びF<sub>1</sub>親動物全例について、卵巢、前立腺、精囊、皮膚／乳腺、精巢、精巢上体、子宮／膈、及び肉眼的異常部位を検査した。F<sub>1</sub>親動物を対象として、上記生殖器官の他に下垂体も検査した。

各腹雌雄各1匹のF<sub>2b</sub>離乳児については、腎臓について検査した。

表 1 交配、調整・選抜及び観察・検査項目の概要

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(11週)	7週齢より投与開始	体重、餌を週1回測定
	交配(1~2週)	雌雄1対1で交配 交尾は膣栓又は膣垢で確認(妊娠0日)	交配状況の観察
	妊娠(3週) 出産		妊娠0、7、14、21日目体重、摂餌量測定 出産状況の観察： 生存児数、死産児数、性別、同腹生存児数、 体重測定
	哺育(3週)	哺育4日目各同腹児数を雄4匹、 雌4匹に可能な限り調整	母動物の出産後0、4、14及び21日目体重、摂 餌量を測定 0、4、14、21日目に生存児数測定。 途中死亡及び4日目屠殺の哺乳児について肉 眼的病理検査実施
F <sub>1</sub>	離乳	継代用の各群雌雄各30匹を選抜	親動物全例について肉眼的病理検査実施 親動物の対照群及び30,000ppm投与群の組織学 的病理検査実施 また、継代用以外の子動物を屠殺し、肉眼的病 理検査実施
	生育(13週) 交配(1~2週) 妊娠(3週) 出産	} (P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
F <sub>2a</sub>	哺育(3週) 離乳		(P世代に準ずる) (F <sub>2a</sub> 児屠殺)
	F <sub>2b</sub>	生育(3週) 交配(1~2週) 妊娠(3週) 出産	} (P世代に準ずる)
哺育(3週) 離乳		(F <sub>2b</sub> 児屠殺)	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

結果：試験結果の概要を表2に示す。

一般状態及び死亡率；30,000ppm投与群の親動物雌雄に軟便がみられた。

児動物には検体投与に関連すると思われる異常及び死亡率の変動は認められなかった。

体重変化；親動物の2,000ppm投与群及び10,000ppm投与群の各世代の雌雄とも対照群と同等であった。30,000ppm投与群各世代親動物は、雌雄とも大部分の期間対照群に比較し、体重増加抑制がみられた。同群P世代では、育成期間中時間の経過と共に抑制が進み、対照群より約8%低下した。同群F<sub>1</sub>世代では、離乳時で対照群より軽く、そのまま推移し、対照群より平均して約10%低かった。

妊娠及び哺育中は、30,000ppm投与群の母動物の体重は低い傾向を示したが、体重増加量は対照群と同等以上で推移し、哺育期間終了時には体重も対照群とほぼ同じとなった。

対照群に対して有意差があった母動物の体重と体重増加の変動率(%)

世代	投与量 (ppm)	妊娠					哺乳				
		G <sub>0</sub>	体重 増加	G <sub>7</sub>	G <sub>14</sub>	G <sub>21</sub>	L <sub>0</sub>	L <sub>7</sub>	L <sub>14</sub>	体重 増加	L <sub>21</sub>
		体重		体重	体重	体重	体重	体重	体重		体重
P	2,000										
	10,000										
	30,000	▽93		▽94	↓94	▽94	↓95				↑466
F <sub>1a</sub>	2,000										↑29
	10,000	↓94	↑120								△38
	30,000	▽88		▽89	▽91	▽92	▽93	▽92	▽94		△63
F <sub>1b</sub>	20,000										
	10,000	↓94	△152								
	30,000	▽87	△147	▽91	▽91	▽92	▽91	↓94			

Dunnnettの多重比較検定    ↑ ↓ : <0.05    △▽ : <0.01

空欄は投与に関連する影響なし。

児動物では、30,000ppm投与群の哺育児に哺育14~21日までに体重増加抑制がみられた。この変動は、哺育終期に哺育児が検体混合飼料を摂取することに関係していると考えられた。10,000ppm投与群では、離乳時の哺育児に軽度（対照群に対し変動率93%~100%）の体重増加抑制がみられたが一過性であり、全世代の雌雄に一貫性のない現象であったため、検体の投与に関連はないと思われた。

摂餌量；30,000ppm投与群の親動物雌雄では、統計学的にはほとんど有意ではないものの対照群よりやや低い傾向がみられたが、10,000ppm投与群及び2,000ppm投与群では、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

対照群と同等であった。母動物の体重あたりの摂餌量は、P世代 30,000ppm 投与群の哺育最後の週に対照群よりやや低下したが、F<sub>1</sub>世代では対照群とほぼ同等か、多い傾向を示した。

検体摂取量;摂餌量、投与濃度及び体重から算出した親動物の1日あたりの平均検体摂取量は、下表の通りであった (P世代は生育期間 11週、F<sub>1</sub>世代は生育期間 14週の平均値)。

投与量 (ppm)	世代	検体摂取量 (mg/kg/日)	
		雄	雌
2,000	P	132	160
	F <sub>1</sub>	140	163
10,000	P	666	777
	F <sub>1</sub>	711	804
30,000	P	1,983	2,322
	F <sub>1</sub>	2,230	2,536

表中の検体摂取量は、日本モンサント株式会社が試験報告書付表 6 の検体摂取量の要約 (表 1、2) から P 世代では投与後 1~72 日、F<sub>1</sub> 世代では、投与後 129~219 日の生育期間における数値の平均として求めた。

繁殖成績;親動物の交尾率、妊娠率、妊孕率、出産率及び妊娠期間の各繁殖成績は対照群と同等であり、有意な差は認められなかった。出産率は、日本モンサント株式会社が個体別表で 1 匹以上の生存児を産んだ母動物と妊娠動物数の比を求めたが、その結果、各出産時、各群とも 100% であった。

児動物の性比、哺育 0、4、21 日生存率に、検体投与による影響と考えられる変動は見られなかった。30,000ppm 投与群の P 世代に平均産児数の軽度の減少が見られたが、F<sub>1</sub> 世代の F<sub>2a</sub> 児出産時は差が小さく、これらの差は統計学的に有意ではなかった。しかし、確認のため同じ F<sub>1</sub> 世代で F<sub>2b</sub> の繁殖を行ったところ、出産児数の減少はみられなかった。以上のように、出産児数の減少が統計学的に有意でなかったこと、また、各世代に一貫していなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理所見;親動物及び児動物の各群とも検体投与による影響と思われる異常はなかった。

臓器重量;30,000ppm 投与群の F<sub>1a</sub> 雄に精巣の対体重値の軽度の増加が見られたが、この群の最終体重値が低かったためであった。

病理組織学的検査;親動物、児動物、各群とも検体投与による影響と思われる異常はなかった。

以上の結果より、2 世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、30,000ppm 投与群の親動物に軟便がみられ、体重増加抑制がみられた。児動物には検体投与に関連する影響は見ら

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

れなかった。繁殖能については何ら影響がみられなかった。

したがって、親動物の無毒性量は 10,000ppm (P 世代 雄 666mg/kg/日 雌 777mg/kg/日、F<sub>1</sub> 世代 雄 711mg/kg/日 雌 804 mg/kg/日)、児動物の無毒性量は 30,000ppm (P 世代 雄 1,983mg/kg/日 雌 2,322mg/kg/日、F<sub>1</sub> 世代 雄 2,230 mg/kg/日 雌 2,536mg/kg/日) と判断される。繁殖については、最高用量の 30,000ppm (P 世代 雄 1,983mg/kg/日 雌 2,322mg/kg/日、F<sub>1</sub> 世代 雄 2,230mg/kg/日 雌 2,536mg/kg/日) でも影響はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表2 結果の概要

世代		親:P				児:F1				親:F <sub>1</sub>		児:F2a、F2b	
投与量(ppm)		対照群		2,000		10,000		30,000		対照群		30,000	
動物数	雄	a	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
		b	-	-	-	-	-	30	29	30	30	30	30
	雌	a	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
		b	-	-	-	-	-	30	30	30	30	30	30
一般状態													軟便
死亡率(%)	雄	a	0	0	0	0	0	0	1/30 -3.3	0	0	0	0
		b	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1/30 -3.3	0
	雌	a	0	0	1/30 -3.3	0	0	0	0	0	0	0	0
		b	-	-	-	-	-	0	2/30 -6.7	0	0	0	0
体重変化(g) (数値は週を示す)	雄							↓5,6,8 ▽7,9~					↓1 ▽2~
	雌							↓2 ▽3~					↓1 ▽2~
摂餌量(g/日) 対照群との有意差	雄												↓2,5 ▽1
	雌							▽1			↓11 ▽3		↓3,7,9,10 ▽1,5,11
摂餌量(g/kg体重/日)	雄							▽L14-21					△G0-7 △G7-14 ↑G14-21
	雌	a											↑G0-7 △G14-21
臓器重量(対体重比)	雄												△精巣
	雌												
肉眼的病理検査													
病理組織学的検査													
交尾率(%)	雄	a	86.7	93.3	93.1	90	93.3	86.7	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3
		b	-	-	-	-	90	69	70	80	80	80	80
	雌	a	96.7	100	100	100	100	93.3	96.7	96.7	96.7	96.7	96.7
		b	-	-	-	-	83.3	83.3	80	86.7	86.7	86.7	86.7
妊娠率(%)	a	82.8	96.7	96.6	93.3	93.3	85.7	82.8	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7
	b	-	-	-	-	64	84	79.2	96.2△	96.2△	96.2△	96.2△	96.2△
出産率(%)*	a	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	b	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100
妊娠期間(日)	a	22.3	22.2	22.5	22.6	22.4	22.6	22.6	22.6	22.6	22.6	22.6	22.6
	b	-	-	-	-	22.4	22.6	22.4	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
妊孕率(%)	a	80.8	96.4	96.3	92.6	96.4	84.6	92	96	96	96	96	96
	b	-	-	-	-	66.7	85	85.7	95.8↑	95.8↑	95.8↑	95.8↑	95.8↑

Dunnettの多重比較検定 ↑↓:<0.05 △▽:<0.01 (体重、摂餌量、臓器重量)

未補正カイ二乗検定(繁殖能力指標)

空欄は投与に関連する影響なし。

a: F1親の第1回目繁殖で、児はF2aとした。

b: F1親の第2回目繁殖で、児はF2bとした。

G0-7: 妊娠0-7日を示す。

L14-21: 哺育14-21日を示す。

\*: 申請者註。出産率は申請者において算出して表示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 2 結果の概要 (続き)

世 代		親 : F <sub>0</sub>		児 : F <sub>1</sub>		親 : F <sub>1</sub>		児 : F <sub>2</sub> a、F <sub>2</sub> b	
投与量 (ppm)		対照群	2,000	10,000	30,000	対照群	2,000	10,000	30,000
平均出産児数	a	13.3	12.5	12.7	11.5	12	12.3	11.5	10.8
	b	-	-	-	-	11.9	10.9	13.2	10.7
性 比 (%)	a	49.6	47.2	51.2	50.4	45	52	47.8	49.1
	b	-	-	-	-	49.6	56	54.5	48.6
哺育 0 日生存率 (%)	a	100	98.4	99.2	99.1	99.2	97.6	98.3	100
	b	-	-	-	-	99.2	98.2	98.5	98.1
哺育 4 日生存率 (%)	a	96.4	97.5	99.4↑	100△	96.7	90.9	96.2	99.4
	b	-	-	-	-	98.8	91.1	96.5	96.9
哺育 14 日生存率 (%)	a	99	99.6	99.6	98.4	100	96.7	99.5	100
	b	-	-	-	-	100	99.3	94.1	100
哺育 21 日生存率 (%)	a	99	99.6	99.6	98.4	100	96.7	99.5	99.5
	b	-	-	-	-	100	99.3	94.1	100
児動物 児体重 (g) (a=F2a 児 b=F2b 児 を示す)	0 日 雄								
	0 日 雌								
	4 日 雄								
	4 日 雌								
	7 日 雄								
7 日 雌									
14 日 雄								▽b	
14 日 雌								↓ a,b	
21 日 雄				↓	▽			↓ a	▽a,b
21 日 雌					▽			↓ a	▽a,b
一般状態	雄								
一般状態	雌								
肉眼的病理検査									
病理組織学的検査									

Bartlett の検定と Dunnett の検定または Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : <0.05 △ ▽ : <0.01

空欄は投与に関連する影響なし。

a : F1 親の第 1 回目繁殖で、児は F2a とした。

b : F1 親の第 2 回目繁殖で、児は F2b 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日本モンサント株式会社にある。

3) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 6-2)

試験機関 :

報告書作成年 : 1980 年

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

供試動物 : Charles River COBS® CD®系ラット 1 群 25 匹、開始時約 14 週齢

試験期間 : 交配開始から最終の帝王切開までの期間 26 日間 (1979 年 4 月 16 日~5 月 12 日)

交配及び妊娠の確認 ; 交配は同一投与群内の雌雄各 1 匹を同居させ、精子及び膣栓により交尾が確認された日を妊娠 0 日とした。

投与方法 : グリホサートを 0.5% Methocel (メチルセルロース) 水溶液に懸濁し、10mL/kg の定容に 300、1,000 及び 3,500mg/kg の用量で妊娠 6 日から妊娠 20 日までの 15 日間、毎日 1 回強制経口投与した。なお、対照群には 10mL/kg の 0.5% Methocel のみを投与した。

用量設定根拠 ; 本試験に先立ち、0、100、300、900、1,500、3,000、6,000 及び 10,000mg/kg/日の投与量で、予備試験を実施した結果、6,000 及び 10,000mg/kg/日投与群の全雌動物が妊娠 8~13 日に死亡した。また、母動物の体重増加の抑制が 1,500 及び 3,000mg/kg/日投与群にみられ、初期吸収胚数及び死胚数の増加が 3,000mg/kg でみられた。これらの結果から本試験では最高用量を 3,500mg/kg/日とし母動物に毒性のみられなかった 1,000 及び 300mg/kg/日の中及び低用量群として選んだ。

観察・検査項目 :

母動物 ; 一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠 0、6、9、12、16 及び 20 日に測定した。妊娠 20 日に帝王切開し、生存、及び死亡胎児数及び位置、初期及び後期吸収胚数、総着床数及び黄体数を検査した。

胎児 ; 全胎児は個体別に体重を測定し、性別、外表奇形及び異変を調べた。このうち半数については内臓検査、残りの半数は骨格検査を行った。

結果 : 概要を表 1 に示した。

3,500mg/kg/日投与群において母動物に軟便、下痢、呼吸喘鳴音、行動の不活発がみられ、体重増加が抑制され、死亡率の増加がみられた。

300 及び、1,000mg/kg/日投与群の平均生存胎児数、初期あるいは後期吸収胚数、黄体数、性比及び平均胎児体重に対照群と比較して生物学的に意味のある差異は認められず、各投与群とも死亡胎児は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

300mg/kg/日投与群における平均着床数及び生存胎児数については統計学的に有意な減少がみられたが、偶発的な変化であった。

3,500mg/kg/日投与群では、後期吸収胚数に変化はみられなかったが、初期吸収胚の軽度な増加により着床後死胚の平均値に統計学的に有意な増加がみられた。この投与群では、平均総着床数、生存胎児数及び平均胎児体重にも統計学的に有意な減少がみられ、平均黄体数もわずかに減少した。投与前に完了している排卵及び着床の後における総着床数及び黄体数の減少は、投与に関連した変化とはみられない。3,500mg/kg/日投与群における性比には、対照群と比較して生物学的に意味のある差、あるいは統計学的な有意差は認められなかった。

300及び1,000mg/kg/日投与群には奇形児は認められなかった。3,500mg/kg/日投与群における奇形児を伴う腹数は対照群と同等であった。しかし、矮小あるいは内臓異常を伴う曲尾に分類される奇形をもつ胎児数例がそれぞれ同一の腹に観察され、その結果、この群における奇形胎児数及び内臓異常は対照群と比して増加を示した。過去の対照データにおいて、同一の腹に内臓異常を伴う曲尾または矮小の奇形を持つ胎児数例が観察された例があることから、この増加は遺伝的な原因によるものと考えられた。

	胎児数 (腹数)	
	3,500mg/kg/日投与群	過去の対照データ
矮小	3 (1)	5 (1)
曲尾	6 (1)	5 (1)

300及び1,000mg/kg/日投与群における発生遺伝学的差異については、対照群と同等であった。3,500mg/kg/日投与群にみられた胸骨の未化骨胎児を伴う腹数の増加は発生学的な変異と考えられた。

申請者注) これらの発生学的変異を伴う腹数の統計学的に有意な増加は、投与に関連して観察された母動物に対する死亡を含む重度の毒性の二次的影響と考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与した場合、最高用量の3,500mg/kg/日において母動物に臨床症状及び体重増加抑制が認められ、また、児動物にも体重の抑制傾向が認められたため、母動物及び児動物における無毒性量は1,000mg/kg/日であった。また、最高用量の3,500mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 1 結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照群	300	1,000	3,500	
1 群当たり動物数		25	25	25	25	
母動物	一般状態	異常なし	異常なし	異常なし	軟便・下痢・呼吸喘鳴音・行動の不活発	
	死亡率	0%	0%	0%	24%	
	体重増加(g) (妊娠 0-20 日)	146	133	142	112	
	妊娠率(数)	88%(22)	80%(20)	84%(21)	92%(23)	
	着床所見	黄体数	15.9	15.2	16.1	14.8
		総着床数	15	12.1**	14.8	12.8*
		生存胎児数	14.4	11.9*	14.3	11.5*
初期吸収胚数		0.6	0.2	0.5	1.2	
後期吸収胚数		0.0	0.0	0.0	0.0	
体重(g)	3.5	3.7	3.6	3.2**		
性比(%)	雄	50.3	50.2	56.0	49.5	
	雌	49.7	49.8	44.0	50.5	
外表検査胎児数		316	237	300	196	
骨格検査胎児数		161	118	150	99	
内臓検査胎児数		155	119	150	97	
胎児動物	奇形を有する総胎仔数		胎仔 数 % 腹 数 %	胎仔 数 % 腹 数 %	胎仔 数 % 腹 数 %	胎仔 数 % 腹 数 %
	奇形を有する総腹数		3 0.9	0 0.0	0 0.0	10** 5.1
	奇形					
	小泉門上に 1mm の小胞					1 0.5 1 6.3
	脳異常		1 0.3 1 4.5			
	矮小					3 1.5 1 6.3
	フォーク状肋骨		1 0.3 1 4.5			
	糸状尾、鎖肛		1 0.3 1 4.5			
	曲尾					6** 3.1 1 6.3
	遺伝発生的変異					
	骨格異常					
	27 前仙椎			1 0.8 1 5.3		
	第 14 番目の痕跡肋骨		18 11.2 9 40.9	19 16.1 8 42.1	25 16.7 14 66.7	13 13.1 8 50.0
第 7 番目の頸肋骨		1 0.6 1 4.5	1 0.8 1 5.3			
舌骨未化骨		2 1.2 2 9.1		4 2.7 3 14.3		
頭蓋骨の化骨不全		1 0.6 1 4.5	2 1.7 2 10.5	1 0.7 1 4.8		
第 5 ないし 6 胸骨分節の未化骨		13 8.1 8 36.4	7 5.9 5 26.3	17 11.3 8 38.1	28*** 28.3 11* 68.8	
その他の胸骨分節の未化骨		1 0.6 1 4.5			6* 6.1 3 18.8	
内臓異常						
右鎖骨下動脈の食道背側走行					1 1.0 1 6.3	
腎乳頭の未発達ないし尿管の拡張		3 1.9 3 13.6	1 0.8 1 5.0	4 2.7 3 14.3	4 4.1 4 25.0	

\*(p<0.05) \*\*\*(p<0.01)

カイ二乗検定及び Fisher の直接確率検定法 (胎児性比、奇形を伴う腹数)

Mann-Whitney の U-検定 (初期及び後期吸収胚数(着床後死胚数))

Bartlett の検定及び Dunnett の多重比較表を用いた Steel と Torrie による T 検定

(平均生存胎児数、総着床数、黄体数、平均胎児体重)

申請者注) 原報告書では上記以外についての有意差検定を行っていないため、日本モンサントが Fisher の直接確率法を用いて実施した。

Fisher の直接確率法 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

4) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No. 6-3)

試験機関 :

報告書作成年 : 1980 年

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

供試動物 : Dutch Belted 系ウサギ 1 群 16 匹、開始時約 7 ヶ月齢

試験期間 : 人工受精開始から最終の帝王切開までの期間 31 日間 (1979 年 4 月 10 日 ~ 1979 年 5 月 11 日)

交配及び妊娠の確認 ; 交配は同一投与群内の雌雄各 1 匹を同居させ、精子及び膣栓により交尾が確認された日を妊娠 0 日とした。

投与方法 : グリホサートを 0.5% Methocel (メチルセルロース) 水溶液に懸濁し、75、175 及び 350mg/kg の投与量で 1mL/kg 定容で妊娠 6 日から妊娠 27 日までの 22 日間、毎日 1 回ゴム管により強制的に経口投与した。なお、対照群には 1mL/kg 相当の溶媒のみを同様に投与した。

用量設定根拠 ; 本試験に先立ち、0、125、500、1,250 及び 2,500mg/kg/日の投与量で予備試験を実施した結果、1,250 及び 2,500mg/kg/日投与群の全雌及び 500mg/kg/日投与群の 4/5 の雌が投与期間中に死亡した。125 及び 250mg/kg 投与群の動物には繁殖毒性、一般毒性とも認められなかった。この結果に基づき最高用量を 350mg/kg/日とした。

観察・検査項目 :

母動物 ; 一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠 0、6、12、18、24 及び 28 日に測定した。妊娠 28 日目に帝王切開し、生存及び死亡胎児の数、初期及び後期吸収胚数、総着床数、黄体数を検査した。

胎児 ; 全胎児は個体別に体重を測定し、性別、外表奇形及び変異を検査した。また全胎児につき内臓及び骨格異常を検査した。

結果 : 概要を表 1 に示した。

投与期間中、全ての群に軟便と下痢がみられたが、175mg/kg/日以上投与群では対照群と比較して増加が認められ、350mg/kg/日投与群では鼻汁も対照群に比較して増加した。

全ての投与群に母動物の妊娠中の死亡がみられ、投与量に対応して死亡数が増加した。剖検により 5 匹の死因が確定したが (次表)、他の 8 匹については、死因は剖検で決定できなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

母動物番号	投与濃度 (mg/kg/日)	死	因
2243	75	肺	炎
2267	175	胃	腸炎
2286	350	腸	炎
2278	350	呼吸器	疾患
2280	350	胃腸炎及び盲腸潰瘍	

申請者注) 350mg/kg/日群の死亡 10 匹のほとんどは、死因の明らかになっている 3 匹を含め投与に関連したものと考えられる。175mg/kg/日群では 2 匹の死因が認められた。本試験の予備試験では 250mg/kg/日を投与した 5 匹中死亡は認められなかった。従って、本試験における 175mg/kg/日群の死亡は投与に関連しない可能性が高いと考えた。下記に予備試験と本試験の親動物の死亡動物数を示す。

投与量 (mg/kg/日)		0	75	125	175	250	350	500	1,250	2,500
死亡動物数	予備試験	—	—	0/5	—	0/5	—	4/5	4/5	5/5
	本試験	0/16	1/16	—	2/16	—	10/17	—	—	—

どの群にも死亡胎児は存在せず、初期及び後期吸収胚数の平均値、総着床数、黄体数、胎児体重、胎児の性比はどの投与群でも対照群に比べ生物学的に意味のある差、あるいは統計学的な有意差はなかった。

生物学的には有意ではないが、統計学的に有意な生存胎児数の平均値の増加が 75mg/kg/日投与群で認められたが、これは偶発的なものであった。

胎児の平均体重は、全投与群で対照群 (33.4g) に対し変動率 87.7%~92.5%の割合でやや減少しているが、過去の対照動物のデータ (30.9g) からみて平均胎児体重に匹敵するものであった。

奇形は投与群にのみ認められたが、腹数において用量反応相関がないこと、内臓異常を伴う場合も同腹に限られること (350mg/kg/日投与群)、投与群、胎児により奇形の性質がそれぞれ異なること、頻度が過去の対照動物の値を上まわっていないことから投与に関係したものではないと考えられる。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したとき、母動物における無毒性量は 75mg/kg/日であった。児動物に対する毒性影響は、最高投与量の 350 mg/kg/日においても認められなかった。また、最高投与量の 350mg/kg/日においても胎児に対して催奇形性作用を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表1 結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照群		75		175		350		
1群当り動物数		16		16		16		17		
一般症状		-		-		軟便・下痢のわずかな増加		鼻汁、軟便、下痢の増加		
母動物	死亡動物	数	%	数	%	数	%	数	%	
	体重増加(g) (妊娠0-28日)	72		132		-25		114		
	妊娠数	14		16		14		16		
	流産数	2		0		1		1		
	黄体数	9.0		10.1		10.5		8.5		
	着床所見	総着床数	5.9		8.0		6.1		7.2	
	生存胎児数	5.3		7.6*		5.9		6.3		
	初期吸収胚数			0.3		0.1		0.5		
	後期吸収胚数	0.3		0.1		0.1		0.3		
	胎児動物	体重(g)	33.4		30.9		29.9		29.3	
	性比(%)	雄	44.4	46.5		49.2		44.7		
		雌	55.6	53.5		50.8		55.3		
	外表検査胎児数	63		114		65		38		
	内臓検査胎児数	63		114		65		38		
	骨格検査胎児数	63		114		65		38		
	奇形を有する総胎仔数	胎仔数	胎仔%	胎仔数	胎仔%	胎仔数	胎仔%	胎仔数	胎仔%	
	奇形を有する総腹数	0	0.0	3	2.6	2	3.1	2	5.3	
	奇形									
	外脳症					1	1.5	1	9.1	
	無頭症							1	2.6	
	肋骨奇形を伴う			2	1.8	2	13.3			
	脊柱側湾症									
	第1肋骨欠損					1	1.5	1	9.1	
	手根骨屈曲							1	2.6	
	頸椎椎体癒合			1	0.9	1	6.7			
	遺伝発生的変異									
	骨格異常									
	27前仙椎 (腰椎過剰、1ヶ)	6	9.5	5	41.7	7	6.1	3	20.0	
	第13番目の痕跡肋骨	5	7.9	3	25.0	14	12.3	6	40.0	
	第13番目の肋軟骨を有する肋骨	3	4.8	3	25.0	10	8.8	4	26.7	
	舌骨弓屈曲			2	1.8	1	6.7	1	1.5	
	舌骨体未化骨	6	9.5	2	16.7	2*	1.8	2	13.3	
	頭頂化骨不全	1	1.6	1	8.3			1	1.5	
	第5、6胸骨未化骨	6	9.5	3	25.0	13	11.4	7	46.7	
	恥骨未化骨	4	6.3	1	8.3	1	0.9	1	6.7	
	距骨未化骨	3	4.8	1	8.3	0*	0.0	5	7.7	
	頸椎部の化骨核過剰							1	1.5	
	頸椎の位置外化骨中心							1	1.5	
	内臓異常									
	大血管異常	11	17.5	6	50.0	14	12.3	8	53.3	

\* (p<0.05) \*\* (p<0.01)

カイ二乗検定及びFisherの直接確率検定法 (胎児性比、奇形を伴う腹数)

Mann-WhitneyのU-検定 (初期及び後期吸収胚数(着床後死胚数))

Bartlettの検定及びDunnnettの多重比較表を用いたSteelとTorrieによるT検定

(平均生存胎児数、総着床数、黄体数、平均胎児体重)

申請者注) 原報告書では上記以外についての有意差検定を行っていないため、日本モンサントがFisherの直接確率法を用いて実施した。

Fisherの直接確率法 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(9) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 No. 7-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1978 年

検体の純度 : 98.4% (グリホサート)

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA1538, TA98) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *hcr* 株) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は、10mg/mL までは滅菌蒸留水 (H<sub>2</sub>O) に溶解し、それ以上の濃度では、懸濁状態で用いた。試験は 2 連制とし、2 回行った。

設定用量 ; 慣行により 5,000  $\mu$ g/プレート を最高濃度として、0、10、50、100、500、1,000、5,000  $\mu$ g/プレートの 7 濃度区で実施した。

(申請者注 : 最高濃度の 5,000  $\mu$ g/プレートでも、検体の析出は認められなかった。)

検体の毒性 (抗菌性) を確認する予備試験は実施しなかった。

試験結果 : 結果を表 1 に示した。

2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、最高用量である 5,000  $\mu$ g/プレートの濃度においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた  $\beta$ -プロピオラクトン、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレンではすべての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を認めた。また、2-アミノアントラセンは、S-9 Mix を加えることにより活性化され、試験に用いたすべての菌株に、明らかな復帰変異を誘発した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表1 結 果

薬 物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ plate)	S-9 Mix	復帰変異 コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対 照 (H <sub>2</sub> O)		-	20	6	167	9	10	24
			24	14	129	10	13	23
検 体	10	-	22	2	130	3	17	27
			21	5	160	7	24	28
	50	-	12	5	151	5	15	33
			25	5	159	6	15	40
	100	-	18	4	143	8	17	20
			20	5	160	8	24	20
	500	-	21	3	118	11	7	31
			26	1	143	9	15	24
	1,000	-	15	9	87	10	18	21
			18	12	120	10	12	23
	5,000	-	*	6	58	3	6	10
			*	6	87	3	7	3
対 照 (H <sub>2</sub> O)		+	17	6	139	7	8	22
			22	5	140	5	11	16
検 体	10	+	25	4	110	3	16	19
			18	1	135	3	11	23
	50	+	27	9	123	7	13	21
			22	5	131	9	17	26
	100	+	33	5	129	11	18	9
			17	7	115	6	14	20
	500	+	28	3	138	12	15	19
			30	3	111	5	7	26
	1,000	+	29	11	97	11	20	15
			24	4	88	7	11	23
	5,000	+	25	5	51	6	11	19
			34	7	36	3	15	22
2-アミノ アントラセン	10	-	23	8	179	18	23	40
			16	11	201	13	21	48
	10	+	98	376	>3,000	370	>3,000	>3,000
			79	335	>3,000	388	>3,000	>3,000
陽性対照		-	1,672a	315b	1,024c	>10,000d	>3,000e	326f
			2,272	358	1,150	>10,000	>3,000	296

\* 菌株の生育阻止を認める

a) 0.25  $\mu\text{g}/$ プレート AF-2

c) 0.05  $\mu\text{g}/$ プレート AF-2

e) 50  $\mu\text{g}/$ プレート 2-ニトロフルオレン

b) 50  $\mu\text{g}/$ プレート  $\beta$ -プロピオラクトン

d) 200  $\mu\text{g}/$ プレート 9-アミノアクリジン

f) 0.1  $\mu\text{g}/$ プレート AF-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日本モンサント株式会社にある。

- ② チャイニーズハムスター卵巣由来細胞系ヒポキサンチン-グアニン-フォスホリボシル転移酵素 (CHO/HGPRT) を用いた *In Vitro* 遺伝子突然変異試験 (資料 No. 7-3)

試験機関 :

報告書作成年 : 1983 年 [GLP 対応]

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

試験方法 : チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) の *In Vitro* 培養系でのヒポキサンチン-グアニン-フォスホリボシル転移酵素 (HGPRT) 遺伝子座位における突然変異誘発能を調べた。通常 CHO 細胞は、6-チオグアニン (6-TG) の毒性に対し感受性であるが、変異細胞は耐性を示す。従って、6-TG 存在下において変異細胞はコロニーを形成するが変異しない細胞は死滅する。

突然変異試験では CHO 細胞懸濁液に検体を Arochlor 誘導ラット肝マイクロゾーム画分 (S-9 Mix) の存在下あるいは非存在下で処理した。同様に S-9 Mix 存在下での陽性対照としてベンゾ(a)ピレン、非存在下での陽性対照としてエチルメタンサルホン酸の処理も行った。陰性対照区も設けた。3時間の薬剤処理後、CHO 細胞を遺伝子の表現型の発現期間として7~9日間平板培養し、このうち約106個の細胞をとり出して6-TGを含む培地でさらに8~12日間培養した。

クローン形成率は6-TG非存在下で200細胞を培養して以下の式で求めた。

$$\text{クローン形成率 (CE)} = \frac{\text{コロニー形成数}}{\text{プレートした細胞数}}$$

6-TG 存在下で8~12日間培養した後形成された変異体コロニー数を数えて以下の式による突然変異体発生率を求めた。

$$\text{突然変異体発生率 (M.F.)} = \frac{\text{変異体コロニー数}}{\text{プレートした細胞数}} \times \frac{1}{\text{CE}}$$

統計学的解析は Snee と Irr (Mutation Research, 85:77-93, 1983) に基づき線形性に関する分散分析及び Student の t-検定による対照群と処理群の組比較を行い、溶媒対照群と同一である確率  $p < 0.05$  で有意差なしとした。

用量設定根拠 ; 検体の CHO 細胞に対する毒性を S-9 Mix 存在下及び非存在下において用量範囲決定試験で判定した。検体は、25mg/mL までの濃度では 90%細胞毒性を示さなかったが、30mg/mL では 90%細胞毒性が認められたので最高用量を 20~25mg/mL と決定した。次に、至適 S-9 Mix 濃度を決定し突然変異誘発能の最初の推定をするために、検体はそれぞれ相対生存率が約 100%、50%及び 10%になるような用量、S-9 Mix 濃度は 0、1、2、5 及び 10%を用いて、突然変異予備試験を実施した。この予備試験で各種の S-9 Mix 濃度 (0-10%) において、検体は 22.5mg/mL までの濃度において突然変異体発生率の有意な増加を示さなかったことから、平均的 S-9 Mix 濃度として、5%を本試験に用いることとした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

本試験ではS-9 Mix 非存在下で2、5、10、15及び20mg/mL、5%S-9 Mix 存在下では5、10、15、20及び25mg/mLを用いた。

結果：結果を次表に示した。

表1 結果

薬物	濃度 (mg/mL)	S-9 Mixの有無	細胞毒性 <sup>a)</sup>	変異原性	
				突然変異体 <sup>b)</sup> 発生率×10 <sup>-6</sup>	p <sup>c)</sup>
対照(培地)	0	-	1.0	11.3	
検体	2	-	0.99	3.5	0.1789
	5	-	0.93	11.3	0.9994
	10	-	0.90	10.8	0.6314
	15	-	1.04	20.8	0.5318
	20	-	0.38	10.1	0.8695
陽性対照 (エチルメタンサルホン酸)	0.200	-		135.4	
対照(培地)	0	+	1.0	7.7	
検体	5	+	1.15	5.7	0.8536
	10	+	0.99	13.1	0.9040
	15	+	1.13	9.9	0.9552
	20	+	0.97	14.9	0.4811
	25	+	0.46	13.1	0.7291
陽性対照 (ベンゾ(a)ピレン)	0.002	+		76.8	

a) 対照に対する生存率 (2連の平均)

b) クローン形成細胞 10<sup>6</sup>当りの突然変異 (2連の平均)

c) Snee と Irr(1981)の統計学的解析方法により求められた、対照と同一である確率。

平均生存率はS-9 Mix 非存在下で38%~100%、S-9 Mix 存在下では46%~100%であった。このように、S-9 Mixの有無を問わず、検体はどの濃度においても突然変異体発生率の有意な増加を引き起こさなかった。

一方、陽性対照のベンゾ(a)ピレン及びエチルメタンサルホン酸では明確な突然変異体発生率の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験の条件下において、遺伝子突然変異誘発能を有しないものと判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

## 2) 染色体異常誘発性

① ラットの骨髄細胞を用いた *In Vivo* 細胞遺伝学的試験 (資料 No. 7-4)

試験機関 :

報告書作成年 : 1983 年 [GLP 対応]

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

供試動物 : Charles River CD-Sprague Dawley 系ラット 1 群雌雄各 6 匹 (体重 150~250g 若齢ラット)

試験方法 : 検体を Hank の平衡塩類溶液 (HBSS) に懸濁し、0、1,000mg/kg の用量で雌雄各 18 匹のラットに腹腔内投与した。陽性対照として 25mg/kg のシクロホスファミド、陰性対照として溶媒の Hank の平衡塩類溶液 (HBSS) を雌雄各 6 匹に腹腔内投与した。

細胞周期のさまざまな時期の細胞を得るため各群の投与後 6、12 及び 24 時間において雌雄各 6 匹を屠殺した。分裂中期像を得るために屠殺 2 時間前に 2mg/kg のコルヒチンを全動物に投与した。動物の骨髄を採取し HBSS 中に 37°C のインキュベータで保存した。細胞の生存率を確認するため、アクリジンオレンジおよびエチジウムブロミドを用いた染色方法を使用した。骨髄細胞は、分裂指数測定のため、カルノア液で固定した後冷凍保存した。計数にあたって固定液に懸濁した細胞を 1~2 滴よく洗浄した湿ったスライドガラスに滴下し、空気乾燥させた後、2% ギムザ溶液で 15-20 分間染色処理した。スライドを水で洗浄し、空気乾燥させてから、カバーガラスをかけた。1 スライド標本について約 500 細胞を検査した。

1 群 300 細胞 (1 動物から 50 細胞) の分裂中期像を観察した。染色分体の異常を欠失 (deletions)、相互交換 (Interchanges)、内部交換 (Intrachanges) 及びギャップ (gap) に分類して計測した。また、異数性細胞数も計測した。

異常を有する細胞の出現頻度は、Student の t 検定により溶媒対照群と同一である確率  $p$  が 0.05 以下の場合、有意差有り (陽性) とした。

用量設定根拠及び有効性確認のための試験 ; 細胞遺伝学的試験の他に、用量設定とその有効性を確認するため以下の試験を実施した。

1) 検体のラット骨髄細胞に対する作用

2) 腹腔内投与による検体のラットにおける血漿及び骨髄中の濃度確認試験

1) の試験では、細胞遺伝学的試験に用いるのに適切な用量を選択するために 200~1,000mg/kg の用量でラットに腹腔内投与し、骨髄細胞の死亡細胞数、分裂指数の減少を調べたが有意な影響が認められなかったことから、本試験の用量として 1,000mg/kg を選択した。

2) の試験では  $^{14}\text{C}$ -標識グリホサート (98% Lot No code C-6971) を 1 群雌雄各 9 匹のラットに約 1,000mg/kg の用量で腹腔内投与した。実際の投与量は、雄で 1,150 ± 3.3mg/kg、雌で 1,150 ± 7.5mg/kg であった。

投与後 0.25、0.50、1、2、4、6 及び 10 時間に 3~6 匹の動物から採血した。また、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

投与後 0.5、4 及び 10 時間と雌雄各 3 匹を屠殺し大腿部骨髄を採取した。これらの試料から血漿中及び骨髄中の放射能濃度を測定した。その結果血漿及び骨髄中の濃度は投与後 0.5 時間で最大となり、血漿中で 340ppm、骨髄中で 1,940ppm であった。血漿中濃度は比較的急速に減少したが、骨髄中では 10 時間の間ほぼ一定であった。以上の結果から、検体を腹腔内投与すると、骨髄に到達し短時間で有意な濃度になることが確認された。

結 果：結果を下表に示した。

投与後 試料採 取時間	薬 物	投与量 (細胞数)	異常を有する細胞数					統計学的分析結果			
			染色体 欠失 2)	染色体 相互交換	染色体 内部交換	3) ギャップ	異数性 4) 細胞数	染色体欠失		ギャップ	
								発生率	有意差	発生率	有意差
6時間	溶媒対照 (HBSS)	10mL/kg (600)	7	1	0	5	35	0.012		0.0083	
	検 体	1,000mg/kg (600)	6	0	0	12	43	0.01	有意差 なし	0.002	(p=0.08) -
12時間	溶媒対照 (HBSS)	10mL/kg (575)	2	0	0	3	48	0.0035		0.0052	
	検 体	1,000mg/kg (577)	5	0	0	9	42	0.0087	(p=0.26) -	0.0016	(p=0.08) -
24時間	溶媒対照 (HBSS)	10mL/kg (565)	4	0	0	8	46	0.0071		0.014	
	検 体	1,000mg/kg (492)	7	0	0	6	35	0.0142	(p=0.26) -	0.012	有意差 なし
	陽性対照 (シクロホス ファミド)	25mg/kg (277)	231	77	6	37	23	0.8339	+	0.134	+

- 1) 表中の数値は雌雄合計値  
p : 溶媒対照群と同一である確率 (p<0.05 で有意差有)
- 2) この項目には、染色体欠失、同位染色体欠失及び染色体型終期異常 (同位染色体欠失と区別できないもの) が含まれる。
- 3) 染色体型ギャップは異常とは考えられない。この項は、欠失と染色体型ギャップが区別された事を示すため記録した。
- 4) 異数性体のほとんどすべてが、染色体が 1 つ少ないものであった。スライドを炎にあてたため、これらの細胞がアーティファクトを受けたと思われた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

検体は1,000mg/kgまでの用量において、溶媒対照群に対して統計学的に有意な染色体あるいは染色分体異常の発現頻度の増加を引き起こさなかった。

一方、陽性対照として用いたシクロホスファミド投与群では顕著な染色体異常の増加が見られた。

以上の結果から、本試験の条件下において検体はラットの骨髄細胞に対して細胞遺伝学的異常を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

② グリホサートのマウスにおける優性致死試験

(資料 No. 7-5)

試験機関 :

報告書作成年 : 1980 年

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

供試動物 : Charles River CD-1 系マウス 1 群雄 10 匹 交配用雌 160 匹

試験方法: 検体を 0.5% Methocel (メチルセルロース) 水溶液に溶解し、0、200、800 及び 2,000mg/kg の用量で雄マウスに単回経口投与した。

同時に設けた陰性対照群には、0.5% Methocel 水溶液のみを経口摂取させ、陽性対照群には Cytosan (シクロフォスファミド) 240mg/kg を腹腔内注射した。

雄への薬剤投与後すぐに、薬剤投与していない性成熟に達した同系統の処女マウスを無作為に 2 匹ずつ選抜して各マウスと 7 日間同居させた。この手順で 8 週間にわたり各雄当り合計 16 匹の雌マウスと同居交配を行った。

雌は交配のため雄と同居させた週の中日から数えて 13 日目に屠殺し、子宮を観察し、生存、死胚数、着床の位置と数及び黄体数を記録した。

試験期間中、全動物の死亡及び毒性の一般症状を観察し、体重を記録した。

用量設定根拠 ; 本試験に先立って 100、300、1,000、2,000、4,000 及び 8,000mg/kg の投与量を用いた用量設定のための予備試験を実施し、各群の死亡率はそれぞれ 0/10、0/10、1/10、0/10、4/10、及び 8/10 であったため、2,000mg/kg を無影響レベルとした。体重に対する影響はどの群にもあらわれなかった。そこで、本試験の高用量として 2,000mg/kg を選択した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

結 果：

薬剂	陰性対照 (溶媒のみ)	陽性対照 (シクロホスファミド)	検 体			
			投与量	0	240mg/kg	200mg/kg
動物数：雄	10	10	10	10	10	10
a 雌(第1交配)	2	2	2	2	2	2
b 雌(第2交配)	2	2	2	2	2	2
c 雌(第3交配)	2	2	2	2	2	2
d 雌(第4交配)	2	2	2	2	2	2
e 雌(第5交配)	2	2	2	2	2	2
f 雌(第6交配)	2	2	2	2	2	2
g 雌(第7交配)	2	2	2	2	2	2
h 雌(第8交配)	2	2	2	2	2	2
中毒症状		投与に関連した異常なし	投与に関連した異常なし	投与に関連した異常なし	投与に関連した異常なし	投与に関連した異常なし
死亡率(%) 雄	0	0	0	0	0	10
a 雌	0	0	0	0	0	10
b 雌	0	0	10	0	0	0
c 雌	0	0	0	10	0	0
d 雌	0	0	0	0	0	0
e 雌	0	0	0	0	0	0
f 雌	0	0	0	0	0	0
g 雌	0	0	0	0	0	0
h 雌	0	0	0	0	0	0
体重変化(g) 雄	-2	-2	-1	-2	-2	-1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

結 果 (続き):

薬剤	投与量	陰性対照 (溶媒のみ)	陽性対照 (シクロホスファミド)	検 体		
		0	240mg/kg	200mg/kg	800mg/kg	2,000mg/kg
妊 娠 数	a	17	15	15	16	17
	b	17	16	16	18	18
	c	14	16	18	18	17
	d	19	13	17	17	14
	e	20	12	17	18	18
	f	18	14	19	17	15
	g	19	12	19	18	15
	h	18	14	18	20	16
平均黄体数	a	12.9	11.5	13.1	11.8	13.2
	b	13.2	9.1**	13.4	13.1	13.4
	c	13.3	10.9**	14.4	13.1	12.3
	d	12.5	13.5	11.9	13.2	12.0
	e	13.3	13.1	12.3	12.2	12.6
	f	13.8	13.4	13.9	12.9	14.1
	g	13.5	11.8	13.3	13.2	13.6
	h	12.7	13.5	14.1	12.4	13.9
平均総着床数	a	12.5	9.1	11.3	11.6	12.2
	b	12.2	7.4	12.5	11.6	13.1
	c	12.6	9.8	13.4	12.2	11.6
	d	12.1	12.7	11.6	12.5	10.8
	e	12.5	12.3	11.6	12.0	11.8
	f	12.8	13.1	13.4	12.2	12.3
	g	13.2	11.4	12.1	11.8	13.0
	h	12.0	12.6	12.9	11.2	11.9
平均生存胚数	a	11.8	4.1**	10.5*	10.5*	11.6
	b	11.1	3.3**	11.4	10.1	12.1
	c	12.0	4.8**	12.0	11.4	10.3*
	d	10.4	10.9	10.8	11.3	9.9
	e	11.3	11.7	10.8	10.4	10.4
	f	11.8	11.6	12.6	11.4	11.3
	g	11.8	10.3	11.4	11.1	12.3
	h	11.4	11.4	10.7	10.4	10.3
平均初期 吸収胚数	a	0.6	4.9**	0.7	0.8	0.4
	b	0.9	4.1**	1.0	0.7	0.8
	c	0.5	4.4**	1.3	0.8	0.6
	d	0.8	1.5	0.6	1.2	0.9
	e	0.4	0.5	0.5	1.5	0.9
	f	0.8	1.2	0.6	0.6	0.9
	g	1.3	1.0	0.6	0.4	0.5
	h	0.5	0.7	0.9	0.6	1.1

\* p<0.05 (Dunnett: 多重比較)

\*\* p<0.01 平均初期吸収胚数はカイ 2 乗検定



結 果 (続き) :

薬剤	投与量	陰性対照 (溶媒のみ)	陽性対照 (シクロホスファミド)	検 体		
		0	240mg/kg	200mg/kg	800mg/kg	2,000mg/kg
平均後期 吸収胚数	a	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1
	b	0.2	0.0	0.1	0.8	0.2
	c	0.1	0.6	0.1	0.1	0.8
	d	0.9	0.2	0.2	0.0	0.0
	e	0.8	0.1	0.3	0.1	0.4
	f	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1
	g	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3
	h	0.1	0.5	1.3	0.3	0.6
平均死胚数	a	0.6	5.1**	0.8	1.1	0.5
	b	1.1	4.1**	1.1	1.5	1.0
	c	0.6	4.9**	1.4	0.8	1.4
	d	1.7	1.8	0.8	1.2	0.9
	e	1.2	0.6	0.8	1.6	1.3
	f	1.0	1.5	0.7	0.8	1.0
	g	1.4	1.2	0.6	0.7	0.7
	h	0.6	1.2	2.2	0.8	1.6

\*\* p<0.01 平均死胚数は Mann-Whitney の U 検定

2,000mg/kg 投与群雄 1 例が試験 6 週時に死亡、2,000mg/kg 投与群の雄と交配した雌 1 例が試験 2 週時に死亡、200mg/kg 投与群の雄と 2 番目に交配した雌が試験 3 週時に死亡、及び 800mg/kg 投与群の雄と交配した 3 番目の雌が試験 5 週時に死亡した。これらの死因を剖検により究明することはできなかった。

投与期間を通じ、検体投与群と各対照群の平均体重及び体重変化に生物学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照群の交配期間の初めの 3 週間に生存胚数の統計学的に有意な減少及び平均初期吸収胚数及び死胚数の統計学的に有意な増加によって示された初期胎児死亡数の割合の増加が認められた。この結果は優性致死作用及び精子形成の有糸分裂後の段階での作用があることを示していた。

800mg/kg 投与群の交配 1 週時及び 2,000mg/kg 投与群の交配 3 週時に平均生存胎児数にやや減少が認められた。しかし、これらの減少には初期胎児死亡数の増加が伴っていないことから、この 2 用量において検体に変異原性作用があるとはいえない。

検体投与群と溶媒対照群の間に統計学的有意差も生物学的意味のある違いも認められなかった。

陽性対照群の交配期間のうち、初めの 3 週間に平均着床数の減少を観察した。この減少は該当する週の黄体数の減少により示される排卵率の減少に起因していると思われる。この減少は交配 2 及び 3 週時に観察した対照群の値と比較して統計学的に有意な減少であった。

以上の結果から、本試験の条件下において検体は優性致死作用を示さないと判断される。

③ ヒトの末梢リンパ球を用いた *In Vitro* 染色体異常試験 (資料 No. 7-7)

試験機関 :  
報告書作成年 : 1995 年 [GLP 対応]

検体の純度 : 96% (グリホサート)

試験方法 : 48 時間培養した健常成人男性のリンパ球を用い、代謝活性化系 (Aroclor-1254 誘導ラット肝臓 S-9 Mix) の存在下及び非存在下、染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に懸濁して用いた。陽性対照物質として、シクロホスファミド (S-9 Mix 存在下) 及びマイトマイシン C (S-9 Mix 非存在下) を用いた。

細胞の毒性傷害による有糸分裂出現の遅延を考慮し、細胞を処理開始後 24 時間 (24 時間固定時間) 及び 48 時間 (48 時間固定時間) で回収した。染色体異常の評価は、独立した 2 回の試験として実施し、観察は 1 濃度あたり 100 個の分裂中期像についてそれぞれ 2 回ずつ行った。

用量設定根拠 ; 染色体異常試験に先立ち、S-9 Mix の非存在下及び存在下で用量設定試験を実施した。検体は、1,000  $\mu$ g/mL で培地中に沈殿したことから、1,000  $\mu$ g/mL を最高濃度とする下表の濃度とした。陰性対照として溶媒 DMSO を用いた。

試験	S-9 Mix	固定時間	供試濃度 ( $\mu$ g/mL)	染色体異常測定濃度 ( $\mu$ g/mL)
用量設定	-	24	0、10、33、100、333、1,000	-
		48	0、10、33、100、333、1,000	-
	+	24	0、10、33、100、333、1,000	-

S-9 Mix の存在下、検体を 3 時間処理した細胞を 5mL の HBSS で洗浄し、5mL の培地でさらに 20~22 時間 (24 時間固定時間) 培養した。S-9 Mix 非存在下で 24 時間または 48 時間検体を処理した細胞は洗浄せずに直ちに 24 時間 (24 時間固定時間) 及び 48 時間 (48 時間固定時間) 培養した。培養期間の最後の 3 時間にコルヒチンを加え、細胞分裂を停止させた後、培養細胞を固定し、スライドを作製、細胞 1,000 個当たりの分裂中期像数を記録し、各培養液の分裂指数を測定した。結果を表 1 に示す。

染色体異常試験の供試濃度と染色体異常を観察した濃度を次頁の表に示す。

用量設定試験の分裂指数より第 1 回試験の用量を選択し、第 1 回試験の分裂指数より染色体異常を観察する濃度を選択した。第 2 回試験は用量設定試験及び第 1 回試験の分裂指数より用量を選択し、第 2 回試験の分裂指数より染色体異常を観察する用量を選択した。すなわち、24 時間固定時間では、約 50% 以上の分裂指数の抑制がみられた濃度、最低用量として分裂指数が溶媒対照とほぼ同じである濃度、これらの中間濃度の 3 用量、48 時間固定時間では適切な 1 用量を選択し、染色体異常の観察を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

試験	S-9 Mix	固定時間	供試濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	染色体異常測定濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
第1回	-	24	0、33、56、100、133、178、237	0、33、100、237
		48	0、56、100、133、178、237、333	0、237
	+	24	0、33、100、133、178、237、333、562	0、237、333、562
		48	0、100、133、178、237、333、562	0、562
第2回	-	24	0、33、100、133、178、237、333	0、33、237、333
	+	24	0、100、333、422、562	0、333、422、562

結果：染色体異常試験の結果を表2及び3に示した。

検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、染色体異常を有する細胞数に統計学的及び生物学的に有意な増加を生じなかった。

一方、陽性対照物質のシクロホスファミド (S-9 Mix 存在下) 及びマイトマイシン C (S-9 Mix 非存在下) では染色体異常を有する細胞の出現率が統計学的に有意に増加した。

以上の結果より、代謝活性化系を含む本試験の条件下で検体はヒトリンパ球に対し染色体異常誘発性を有しないと判断される。

表 1 用量設定試験における培養細胞の分裂指数

薬物	濃度	処理時間	固定時間	S-9 Mix	細胞1,000個当たりの中期像数	
					絶対数	対照に対する百分率
溶媒対照 DMSO	0.9 % v/v	24 時間	24 時間	-	36	100
検体	10 $\mu$ g/mL				27	75
	33				32	89
	100				25	69
	333				0	0
	1,000 <sup>1)</sup> $\mu$ g/mL				0	0
溶媒対照 DMSO	0.9 % v/v	48 時間	48 時間	-	44	100
検体	10 $\mu$ g/mL				40	91
	33				31	70
	100				28	64
	333				15	34
	1,000 <sup>1)</sup> $\mu$ g/mL				0	0
溶媒対照 DMSO	0.9 % v/v	3 時間	24 時間	+	63	100
検体	10 $\mu$ g/mL				68	108
	33				61	97
	100				55	87
	333				12	19
	1,000 <sup>1)</sup> $\mu$ g/mL				58	92

1) 培地中に検体が沈殿

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表2 結果：第1回試験

薬物	濃度	培養液	処理時間	固定時間	観察細胞数	S-9 Mix	異常細胞数 +キ・ヤブ	異常細胞数 -キ・ヤブ	染色体異常								異常総数 +キ・ヤブ	異常総数 -キ・ヤブ			
									染色分体 型キ・ヤブ	染色体型 ギャップ	染色分体 型切断	染色体型 切断	微小断片	2微小断片	交換形	2動原体染 色体			染色分体 欠損	その他	
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A	24 時間	24 時間	100	-	2	2					2				2	2			
		B			100		2	1	1			1				2	1				
		A+B			200		4	3										2	1		
検体	33 μg/mL	A			100		2	1			1								2	4	3
		B			100		2	1	1			1						2	2	1	
		A+B			200		4	2													
	100	A			100		1	1						1						1	1
		B			100		1	0	1											1	0
		A+B			200		2	1													
237	A	100			2		2					2						1	2	2	
	B	100			3		1	2										1	3	1	
	A+B	200			5		3														
陽性対照 MMC-C	0.2 μg/mL	A	100	38	27	7	10	6	11	3		8			1	46	29				
		B	100	33	23	11	10	11	8			7				47	26				
		A+B	200	71 ***	50 ***																
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A	3 時間	24 時間	100	+	1	1					1				1	1			
		B			100		5	3	1	1	1	1	1			1	5	3			
		A+B			200		6	4													
検体	237	A			100		2	0	2										2	0	
		B			100		0	0											0	0	
		A+B			200		2	0													
	333	A			100		2	1	1			1						1	2	1	
		B			100		1	1								1	1	1	1	1	
		A+B			200		3	2													
562	A	100			1		1	1									4	3	2		
	B	100			3		3				2		1	1			2	4	4		
	A+B	200			4		4														
陽性対照 CP	15	A	100	57	37	22	21	25	23			6			1	97	54				
		B	100	32	16	13	13	10	2			4			2	53	27				
		A+B	200	89 ***	53 ***																
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A	48 時間	48 時間	100	-	1	1					2				2	2			
		B			100		3	0	2	1							3	0			
		A+B			200		4	1													
検体	237	A			100		0	0										1	0	0	
		B			100		1	0	1									1	0		
		A+B			200		1	0													
陽性対照 MMC-C	0.2 μg/mL	A			100		36	32	16	5	9	24			8	2		64	43		
		B			100		45	35	12	9	6	17			17		2	62	41		
		A+B			200		81 ***	67 ***													
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A			3 時間		48 時間	100	+	1	0	1								1	0
		B						100		0	0									0	0
		A+B						200		1	0										
検体	562	A	100	0		0												0	0		
		B	100	0		0												0	0		
		A+B	200	0		0															

対照群と有意差あり (カイ二乗検定) \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表3 結果：第2回試験

薬物	濃度	培養液	処理時間	固定時間	観察細胞数	S-9 Mix	異常細胞数 +ギャップ	異常細胞数 -ギャップ	染色体異常								異常総数 +ギャップ	異常総数 -ギャップ		
									染色分体 型ギャップ	染色体型 ギャップ	染色分体 型切断	染色体型 切断	微小断片	2微小断片	交換形	2動原体染 色体			染色分体 欠損	その他
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A	24 時間	24 時間	100	-	0	0									0	0		
		B			100		1	0	1							1	0			
		A+B			200		1	0												
検体	33 μg/mL	A			100		0	0											0	0
		B			100		2	0	2									2	0	
		A+B			200		2	0												
	237	A			100		4	3	1			3							4	3
		B			100		1	0	1										1	0
		A+B			200		5	3												
333	A	100			2		1	1			1							2	1	
	B	100			2		1	1			1					1		2	1	
	A+B	200			4		2													
陽性対照 MMC-C	0.2 μg/mL	A	100	25	25	1		21	8			2				32	31			
		B	100	26	26		2	16	7			6				31	29			
		A+B	200	51***	51***															
溶媒対象 DMSO	0.9 % v/v	A	100	3	2	1		2								3	2			
		B	100	1	1			1								1	1			
		A+B	200	4	3															
検体	333	A	100	3	2	1		2						1		3	2			
		B	100	4	3	1		2	1							4	3			
		A+B	200	7	5															
	422	A	100	2	2			2								2	2			
		B	100	2	0	2										2	0			
		A+B	200	4	2															
562	A	100	1	0	1										1	0				
	B	100	2	1	1			1							2	1				
	A+B	200	3	1																
陽性対照 CP	15	A	100	26	26			27	9			8				44	44			
		B	100	27	27	1		25	11			7	1			45	44			
		A+B	200	53***	53***															

対照群と有意差あり (カイ二乗検定) \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

### 3) DNA 損傷誘発性

#### ① 細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec-Assay)

(資料 No. 7-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1978 年

検体の純度 : 98.4% (グリホサート)

試験方法 : 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い賀田らの Rec-assay 法で DNA の損傷の誘発性を検定した。

検体は、10mg/mL までは滅菌蒸留水 (H<sub>2</sub>O) に溶解し、10mg/ml 以上の濃度では、懸濁状態で用いた。

用量設定根拠 ; 慣行により 2,000  $\mu$ g/ディスクを最高濃度として実施した。

結 果 : 結果を次表に示した。

薬 物	濃 度 ( $\mu$ g/ディスク)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照 (H <sub>2</sub> O)		0	0	0
検 体	20	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
	2,000	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10	7	5	2
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	11	0	11

検体投与群では、最高濃度である 2,000  $\mu$ g/disk においても両株に生育阻止を認めなかった。一方陽性対照として用いたのマイトマイシン C では、M-45 に著明な生育阻止帯を生じ、H-17 に対し明らかな生育阻止の差を示した。陰性対照として用いたカナマイシンでは、両株に同程度の生育阻止帯を生じた。

以上の結果より、検体は本試験の条件下において、DNA 損傷の誘発性がないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

② ラット肝細胞を用いた DNA 修復過程における不定期 DNA 合成誘発試験 (資料 No. 7-6)

試験機関 :

報告書作成年 : 1983 年

検体の純度 : 98.7% (グリホサート)

供試動物 : Fischer-344 系ラット 雄 1 匹

試験方法 : ラットを麻酔し、Williams ら<sup>1)</sup> の灌流方法を用いて肝細胞を単離し、トリパンプルーで染色し生存細胞を識別した。DNA 修復試験では Williams<sup>2,3)</sup> の開発した方法に準拠し、0.0125、0.125、1.250、12.50、125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の検体及びトリチウムで標識した 3H-チミジンを添加した培地で肝細胞を 37°C で 18 時間培養した。溶媒対照 (NaOH) 及び無処理対照、また陽性対照としてベンゾ (a) ピレンを用い、陽性対照の溶媒対照 (DMSO) も設けた。

肝細胞のスライド標本のオートラジオグラフィーを実施し、次にヘマトキシリンエオジン染色を行った。

自動グレインカウンターを用いて核及び細胞質上のグレイン数を各用量細胞につき計数した。正味の核のグレイン数は、核のグレイン数から核に隣接した細胞質の核 3 つ分の領域のグレイン数を減じて算出した。陽性反応の判定は、細胞毒性のない用量で、正味の核のグレイン数が 5 以上となった場合とした。

用量設定根拠 ; 検体の溶媒 (NaOH) に対する最大の溶解濃度は 12.5mg/mL である。この濃度のストック溶液を調製し、溶媒で希釈して各供試濃度を調製した。12.5mg/mL のストック溶液 20  $\mu\text{L}$  を 2mL の検定用培地に加え、最高濃度とした。

結 果 : 結果を次表に示した。

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	(正味のグレイン数/核)	細 胞 性 毒 性	評 価
溶媒対照 (0.1N NaOH)	10	0.3 $\pm$ 0.1		
検 体	0.0125	0.1 $\pm$ 0.1	無	—
	0.125	0.2 $\pm$ 0.2	"	—
	1.250	0.0 $\pm$ 0.0	"	—
	12.5	0.1 $\pm$ 0.2	"	—
	125	1.4 $\pm$ 0.5	"	—
溶媒対照 (DMSO)	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup> モル	0.3 $\pm$ 0.5	"	
陰性対照 (ピレン)	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup> モル	0.4 $\pm$ 0.4	"	—
陽性対照 (ベンゾ (a) ピレン)	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup> モル	22.9 $\pm$ 9.7	"	+
無処理	—	0.2 $\pm$ 0.3		



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

注) 評価は細胞毒性がない用量で正味のグレイン数/核が5以上で陽性(+)とする。

本試験における検体の溶解度の限界 125  $\mu$ g/mL であっても細胞毒性は認められなかった。また、検体を供試したどの濃度においても正味の核のグレイン数は5以上とならなかった。一方、陽性対照として用いたベンゾ(a)ピレンを処理した細胞では、正味の核のグレイン数が約23となり顕著な増加が見られた。

同様の濃度で再試験を行い、自動グレインカウンターではなく、顕微鏡下で観察したが前回と同様の結果が得られた。

以上の結果から本試験の条件下において、検体はラットの単離肝細胞に対するDNA損傷誘発能を有しないと判断される。

#### 参考文献

- 1) Williams, G.M., Bermudez, E., and Scaramuzzino D. (1977). IN VITRO 13:809-817.
- 2) Williams, G.M. (1977). Cancer Res. 37:1845-1851.
- 3) Williams, G.M. (1980). In:Chemical Mutagens. Vol. VI ed. F.J. deSerres and Hollaender, Plenum Press, New York, pp. 61-79.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(10) 生体の機能に及ぼす影響

1) 薬理学的研究

(資料 No. 8-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : ①~③グリホサートイソプロピルアミン塩 64.50% (グリホサート酸として 47.80%)

④グリホサートイソプロピルアミン塩 63.20% (グリホサート酸として 46.80%)

界面活性剤 MON0818 (ラウンドアップ製剤用) 100%

ラウンドアップ製剤 (グリホサート液剤)

(グリホサートイソプロピルアミン塩 41%含有 (グリホサート酸として 30.40%)、

界面活性剤 MON0818 15%含有)

① 犬における血中動態

供試動物 : 純系ビーグル犬 体重 10~12kg 雄 3 頭

投与方法 : ネンブタール 25mg/kg で麻酔し、空気による人工呼吸下、大腿静脈にテフロンカニューレを挿入し乳酸加リンゲル液を毎時 10mL/kg で点滴静注した。持続的に心電図、動脈圧をモニターした。

グリホサート 200mg/kg (酸換算) を橈側皮静脈により静注し、経時的に注入後 10、20、30、45 分、1、1.5、2、3、4、5 及び 6 時間に採血した。血漿中のグリホサート濃度を高速液体クロマトグラフィーにより分析し、血中濃度曲線を得た。これに基づき、薬物動力学のパラメーターを求めた。

結果 : グリホサートの血中濃度 (C) は時間 (t) で次の 2 コンパートメントモデルの式で表わせた :  $C = 784e^{-0.024t} + 427e^{-0.009t}$

薬物動力学のパラメーターの値は以下の通りであった :

消失速度定数	Kel :	0.015 ± 0.003	min <sup>-1</sup>
	K12 :	0.004 ± 0.002	min <sup>-1</sup>
	K21 :	0.014 ± 0.003	min <sup>-1</sup>
中枢コンパートメントの容量	Vc :	0.17 ± 0.02	L/kg
分布容量	Vd :	0.28 ± 0.005	L/kg
半減期	t <sup>1/2</sup> :	82.3 ± 22.5	分
クリアランス	cl :	2.5 ± 0.6	mL/分/kg
	AUC :	1,232.9 ± 277.3	μg·hr/mL

グリホサートの分布容量 0.28±0.005L/kg は、体重 50kg と仮定するとみかけの分

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

布容量は 14L であり比較的小さい。K21 が K12 の約 3.5 倍であるため中枢コンパートメントにグリホサートが集まりやすく、さらにクリアランスから考えると排泄も速いと考えられる。消失半減期が約 82 分であるため、強制利尿はできるだけ早く行った方がよいと考えられる。分布容量が小さいことから、グリホサートは血中に多く存在することが考えられ、中毒時には、直接血中から除去する血液灌流や血液透析の効果が期待できる。

② グリホサート、界面活性剤及びラウンドアップの犬の循環動態へ及ぼす影響

供試動物：純系ビーグル犬 体重 11~14kg 雌 9 頭 (1 群 3 頭)

投与方法：ネブタール麻酔、人工呼吸下に大腿静脈に 7F スワンガンツカテーテルを挿入し、乳酸加リンゲル液を毎時 10mL/kg で点滴静注した。反対側大腿動脈にテフロンカニューレを挿入し、持続的に動脈圧を測定し心電図も同時にモニターした。

1 群 3 頭の犬にグリホサート (41%)、界面活性剤 15%あるいはその合剤を、グリホサートでは 20mL/時、界面活性剤及び合剤では、10mL/時でスワンガンツカテーテルの注入側孔ルーメンハブにより持続注入し、平均動脈圧がコントロール値の 50%以下になるまで続けた。

循環動態パラメーターとして、心拍数 (HR)、平均動脈圧 (MAP)、心拍出量 (CO)、平均肺動脈圧 (MPAP)、肺動脈楔入圧 (PCWP)、中心静脈圧 (CVP) を注入前並びに注入開始 15、30、45 及び 60 分後、または血圧が 50%以下に低下した時測定し、これらの値から体血管抵抗係数 (SVRI)、肺血管抵抗係数 (PVRI) 及び左室仕事量係数 (LVSWI) を算出した。

グリホサートの血中濃度をグリホサート注入開始 15、30、45 及び 60 分後に、合剤注入群では血圧が 50%以下に低下した時に測定した。動脈血液ガス分析を注入前及び 60 分値または、血圧が 50%に低下したときに実施した。

結 果：結果を下表に示した。

パラメーター	グリホサート	界面活性剤	ラウンドアップ製剤
肺動脈圧 (MPAP)	▲	↓	↓
肺血管抵抗係数 (PVRI)	▲	↑	↑
心拍数 (HR)	↑	↓	↓
平均動脈圧 (MAP)	▲	▼	▼
左室仕事量係数 (LVSWI)	↑	▼	▼
心拍出量 (CO)	↑	▼	▼
pH	▼	—	—
pCO <sub>2</sub>	▲	—	—
BE	▼	—	—

↑ ↓ 統計学的有意差のない変動

△ ▼ T-検定 p<0.05

— 著変なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

グリホサート注入により、肺動脈圧、肺血管抵抗係数が上昇し、心拍数、平均動脈圧及び左室仕事量係数も増加傾向がみられた。また pH の低下、 $pCO_2$  の増加 BE の低がみられた。一方製剤、界面活性剤では血圧低下がみられ、正常値の 50%まで低下した時、心拍数、平均動脈圧、心拍出量が減少、左室仕事量係数も低下した。

ラウンドアップ中毒時の血圧低下アシドーシス等の循環動態と、本試験で観察した成分別のデータを検討すると、グリホサート注入により血圧の低下はみられず、逆に上昇し、製剤及び界面活性剤注入群の循環動態がほぼ同じ傾向を示し、血圧が低下したことから、製剤に含まれる界面活性剤が血圧低下の原因の 1 つと考えられ、その作用は心抑制であると思われた。グリホサート注入群でアシドーシスがみられ、製剤群でわずかなアシドーシスしかみられなかったことから、アシドーシスの原因はグリホサートによる直接血液の酸性化及び代謝性アシドーシスが考えられた。

これらの結果から、治療方法としてはアシドーシスの補正を行いながら血液灌流、透析などの血液浄化法により薬物除去を行い、循環動態を常にモニターしながら対症的治療を行う必要があると判断された。

### ③ グリホサートの *In Vitro* における各種吸着剤に対する吸着の検討

方 法：生理食塩水と  $Na^+$  濃度が等しくなるよう NaCl を添加した。日本薬局 X1 崩壊試験法の第 1 液 (pH1.2) 及び第 2 液 (pH6.8) 中に 50~20,000  $\mu g/mL$  の濃度となるようにグリホサートを加え試験溶液を作成した。この試験溶液 5mL に活性炭、ケイキサレートあるいはコレスチラミン 100mg 加え、37°C の恒温槽中で 24 時間攪拌した。攪拌停止後溶液を濾過し、HPLC により濾液中のグリホサート濃度を測定した。

結 果：各吸着剤に対するグリホサートの吸着は、活性炭及びケイキサレートではほとんどみられず、コレスチラミンではいずれの濃度においても約 20% の吸着がみられた。いずれの吸着剤についてもラングミュアー型の単分子吸着はみられず、したがって飽和吸着量は算出できなかった。

この結果からコレスチラミンには経口吸着剤、あるいは血液灌流における吸着剤としてある程度の有効性が期待できる。

### ④ 犬の胃及び小腸に対する腐食性

供試動物：純系ビーグル犬 体重 12~15kg 雄 1 群 4~8 頭

方 法：1 日絶食したビーグル犬をケタミン及びスキサメソニウム麻酔下で開腹し、電気メスにて胃を大湾に沿って切開後、胃前壁を反転して粘膜を露出した。胆汁などの逆流を防ぐため食道及び幽門部にガーゼをつめた。胃粘膜を絹糸で吊り上げ胃後壁の漿膜側にガーゼをつめて胃体部に直径 3 cm 程度の陥凹を二つ作り、この陥凹にグリホサートのイソプロピルアミン塩 41%、界面活性剤 15% あるいはラウンドアップ製剤原液の検体を入れ、それぞれ 30 分間静置した。また、液体がこぼれたり減ったりした場合は、そのつど追加した。同様の方法で対照として 0.25 規定塩酸も投与した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

一方、小腸は血流を妨げないように注意し、約 10 cm幅で両側を絹糸で結紮した。テフロンカテーテルを管腔内に挿入し、このカテーテルから、それぞれの検体を投与し、胃と同様に 30 分間静置した。

接触終了後、胃を素早く生理食塩液で洗浄し、検体接触部位を切り出した。また、小腸は管壁を切開し粘膜を露出後、同様に生理食塩液で洗浄した。採取した胃及び小腸は、10%緩衝ホルマリンにて固定し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。これらの標本を光学顕微鏡にて観察し、胃及び小腸の粘膜障害を比較検討した。

結 果：結果を下表に示した。

胃	グリホサート	界面活性剤	ラウンドアップ	0.25N 塩酸
粘膜上皮の浮腫	+~++	+~++	++	+~++
粘膜上皮の充血	+~+++	-~++	++~+++	-~++
表面粘液上皮の変性	+	+	+	+~++

-変化なし、+極く軽度、++軽度、+++中程度、++++高度

小 腸	グリホサート	界面活性剤	ラウンドアップ	0.25N 塩酸
絨毛の充血	+~+++	-~+++	+~++++	+++~++++
絨毛先端部の浮腫	+~++	+~++	+~++	++
吸収上皮の変性・剥離	+~+++	+~+++	+~+++	++
陰窩の拡張	-~++	-	-~++	-~+

-変化なし、+極く軽度、++軽度、+++中程度、++++高度

ラウンドアップ製剤、グリホサート及び界面活性剤の胃及び小腸に対する障害はいずれも軽度であり、これらの障害の程度は 0.25 規定の塩酸に相当した。また、胃よりも小腸の方が強く傷害される傾向にあった。

胃及び小腸の浮腫及び上皮の剥離は、充血に伴う微小循環障害により間質に滲出が起こるために生じるものと考えられ、特に小腸では、絨毛の充血により吸収上皮と基底膜との間隙に浮腫が生じ、これにより上皮が押し上げられて固有層から剥離・脱落すると思われる。

服毒自殺に使われる塩酸は、およそ 7 から 9 規定のものが多く重篤な組織障害を引き起こすが、今回ラウンドアップの組織障害が 0.25 規定の塩酸とほぼ同等のものであったことは、ラウンドアップの胃及び小腸に対する障害が比較的弱く治療可能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日本モンサント株式会社にある。

2) グリホサートアンモニウム塩の薬理試験

(資料 No. 8-2)

試験機関 :

報告書作成年 : 1992 年 [GLP 対応]

検体の純度 : アンモニウム塩 94.78% (グリホサート酸として 86.12%)

中枢神経系に対する作用

① 雌雄マウスの一般症状

供試動物 : ICR 系 SPF マウス、1 群雌雄各 3 匹、開始時約 9 週齢 (体重雄 32.3~40.8g、雌 25.9~32.6g)

投与方法 : 検体を 0.9%NaCl 生理食塩水に溶解して (NaOH で pH を 5 に調整)、0、78.1、313、1,250、5,000mg/kg の用量を 20mL/kg の容量で腹腔内に投与し、マウスの行動を多元観察した。観察は検体投与当日には投与前、投与後 5 分、0.5、1、3、6 時間後に、翌日以降は 1 日 1 回、7 日目まで行った。マウスは観察終了後に殺処分した。マウスの行動は Irwin の方法に従って観察した。

結果 : 雌雄マウスとも 1,250mg/kg 以上の投与群に認知力、運動性、中枢神経系興奮、姿勢、運動失調、筋緊張、反射、自律神経系の項目に異常が認められた。これらの異常は投与 30 分以内に発現し、1,250mg/kg 投与群では投与 1 時間以降に正常に回復した。雌雄マウスとも 5,000mg/kg 投与群の全例が投与 30 分以内に死亡した。313mg/kg 以下の投与群に明確な異常は認められなかった。

② 雄ウサギの一般症状

供試動物 : 日本白色種 SPF ウサギ、1 群雄 3 匹、開始時約 12 週齢 (体重 2.27~2.81kg)

投与方法 : 検体を 0.9%NaCl 生理食塩水に溶解して (NaOH で pH を 5 に調整)、0、7.81、31.3、125、500mg/kg の用量を 2mL/kg の容量で静脈内投与し一般症状を多元観察した。観察は検体投与当日には投与前、投与後 5 分、0.5、1、3、6 時間後に、翌日以降は 1 日 1 回、7 日目まで行った。ウサギは観察終了後に殺処分した。

結果 : 500mg/kg 投与群に自発運動の減少と呼吸数の増加が観察された。これらの異常症状は投与 0.5 時間以内に発現し、投与 3 時間目には正常に回復した。125mg/kg 以下の投与群には、検体投与によると思われる異常症状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日本モンサント株式会社にある。

### ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

供試動物：日本白色種 SPF ウサギ、1 群雄 3 匹、開始時約 12 週齢（体重 2.27~2.81kg）

投与方法：検体を 0.9%NaCl 生理食塩水に溶解して（NaOH で pH を 5 に調整）、ウレタン麻酔下の雄ウサギに 0、7.81、31.3、125、500mg/kg の用量で静脈内投与し、呼吸、血圧、心電図、心拍数に対する影響を調べた。呼吸、血圧、心電図、心拍数は同一個体からポリグラフを用いて投与後 4 時間まで観察・記録した。

結果：結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg)	呼 吸 (回数/分)					血 圧 (mmHg)					心拍数 (回数/分)				
	0*	7.81	31.3	125	500	0*	7.81	31.3	125	500	0*	7.81	31.3	125	500
投与前	176	150	154	117	197	75	77	66	70	80	325	343	326	321	318
投与中	-	-	-	-	-	76	79	57	50	59	-	-	-	-	-
投与後 直後	172	135	169	123	97	81	85	71	75	23	320	338	319	317	178
5 分	167	120	143	105	-	75	82	67	77	-	321	338	322	318	-
0.5h	166	119	139	87	-	74	80	62	72	-	323	339	320	317	-
1h	177	111	132	78	-	73	78	61	71	-	321	343	317	326	-
2h	174	116	146	83	-	69	76	58	72	-	315	334	312	319	-
3h	171	119	129	84	-	71	71	61	70	-	315	330	314	312	-
4h	154	119	144	81	-	73	66	62	72	-	314	330	317	310	-

\*対照群には溶媒の 0.9%NaCl 生理食塩水を投与。

「-」 測定しなかった

「+」 動物が死亡したため測定不能

31.3mg/kg 以上の投与群で投与中に一過性の血圧低下が観察された。この血圧低下は投与後数分以内に正常に回復した。しかしながら、500mg/kg 投与群の全例が、血圧低下、呼吸数低下、心拍数低下、心電図の QRS 電位の減少を示し、投与数分以内に死亡した。7.81mg/kg 投与群には明確な変化は認められなかった。

以上の結果から、グリホサートアンモニウム塩の急性毒性は弱く、非常に大量を摂取した場合を除き、重篤な急性中毒が発現する可能性は低いと予想された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

グリホサートアンモニウム塩の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
<b>【中枢神経系に対する作用】</b>							
一般状態 [Irwin 法]	マウス	腹腔内 (0.9%NaCl 生理食塩水)	0、78.1、 313、 1,250、 5,000	雄3 雌3	1,250	313	死亡：5,000mg/kg で雌雄 各3/3 1,250mg/kg 以上で認知 力、中枢神経系興奮、姿 勢、運動失調、筋緊張、 反射、自律神経系の項目 の異常
一般状態	ウサギ	静脈内 (0.9%NaCl 生理食塩水)	0、7.81、 31.3、125、 500	雄3	500	125	死亡は認められなかった 500mg/kg で自発運動の 減少と呼吸数の増加
<b>【呼吸・循環器系に対する作用】</b>							
呼吸 血圧 心電図 心拍数	ウサギ	静脈内 (0.9%NaCl 生理食塩 水)	0、7.81、 31.3、125、 500	雄3	31.3	7.81	死亡：500mg/kg で3/3 31.3mg/kg 以上で一過性 の血圧低下 500mg/kg で呼吸数減少、 血圧低下、心拍数低下、 心電図 QRS 電位減少



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

## 2. 原体混在物及び代謝物

### (1) 急性毒性

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 参考-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1973 年

検体の純度 : 不明 (アミノメチルホスホン酸)

供試動物 : Sprague-Dawley 系アルビノラット、体重 : 雄 215~245g、雌 : 205~250g、1 群各 5 匹 (雌雄各 2 又は 3 匹)

観察期間 : 7 日間

試験方法 : おおよその最少致死量を測定後、各群の雌雄ラットへの投与量を、毒性範囲に適用される常用対数の実数が 0.1 間隔の 4 段階に増加させ、E. J. de Beer の方法に従って LD<sub>50</sub> 値を計算した。

投与方法 : 検体をコーンオイルで 40% 懸濁液とし、胃挿管法により強制経口投与した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び臓器を肉眼的に観察した。

結 果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5,010、6,310、7,940、10,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 8,300 (範囲 7,300~9,460)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 1 日から開始、投与後 2 日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 1 日から発現、投与後 3 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5,010

中毒症状は、食欲及び活動性の減退 (生存動物では投与後 1~3 日)、衰弱、軽度の下痢、虚脱及び死亡であった。

剖検所見では、軽度の肝臓の変色及び急性胃腸炎が認められた。

生存動物は投与 7 日後に屠殺し、内臓は肉眼的観察において正常であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) ウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料No. 参考-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1973 年

検体の純度 : 不明 (アミノメチルホスホン酸)

供試動物 : ニュージーランドホワイト系ウサギ、1 群雄 2 匹、雌 1 匹

観察期間 : 7 日間

投与方法 : 水で湿らせた 0.5g の検体を、刈毛した無傷の皮膚に適用 (1 インチ四方) し、閉塞貼付した。暴露時間は 24 時間とした。

観察項目 : 暴露終了後 1、24、48、72、120 及び 168 時間に適用部分の刺激性変化を観察し、Draize, Woodard, and Calvery 法 (Journal of Pharm. and Exp. Therapeutics, Volume 82, December, 1944) に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性評点は以下の表のとおりである。

動物 番号	最高 評点	暴露後時間					
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	120 時間	168 時間
1	8	0	0	0	0	0	0
2	8	0	0	0	0	0	0
3	8	0	0	0	0	0	0
合計	24	0	0	0	0	0	0
平均	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) 表の点数は 1 匹毎の数値。

いずれの観察時点にも皮膚に変化は認められず、7 日間の評点は、最高評点 8 の条件下で平均最大評点が 0.0 であった。

以上の結果から、微粉末を水で湿らせた検体はウサギの無傷な皮膚に対して無刺激性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

2) ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. 参考-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1973 年

検体の純度 : 不明 (アミノメチルホスホン酸)

供試動物 : アルビノウサギ、1 群雄 1 匹、雌 2 匹

観察期間 : 7 日間

投与方法 : 微粉末の検体 100.0mg を右眼結膜囊に入れ、炎症の有無を観察し、24 時間暴露後、眼を温等張食塩液で洗浄した。左眼は対照とした。

観察項目 : 適用後 1、24、48、72、120 及び 168 時間に Draize らの方法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物 番号	最高 評点	適用後時間					
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	120 時間	168 時間
1	110	10	6	2	0	0	0
2	110	10	8	4	0	0	0
3	110	10	8	2	2	0	0
合計	330	30	22	8	2	0	0
平均	110	10	7.3	2.6	0.6	0.0	0.0

適用直後に軽度の不快感、適用後 10 分~1 時間に軽度の紅斑、非常に軽度の浮腫、大量の分泌物、適用後 24 時間に軽度から中等度の紅斑、白色の滲出液を含んだ中程度の分泌物、適用後 48 時間に軽度から中等度の紅斑、適用後 72 時間に 1 例に軽度の紅斑が認められたが、適用後 120 時間以降はすべての試験眼は正常であった。適用後 168 時間に試験を終了した。評点は最高評点 110 の条件下で、平均最大評点が 1 時間の 10.0 であった。

以上の結果から、検体は雌雄ウサギの眼に軽度の刺激性があるものと思われる。