

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。

(6) ラットにおける ^{14}C 標識グリホサートを用いた 14 日間慢性混餌投与試験

(資料 No. 9-5)

試験機関：

報告書作成年：1973 年

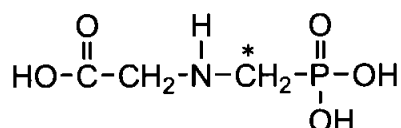
供試標識化合物：

^{14}C 標識グリホサート [N-(ホスホノメチル)グリシン]

化学名；N-phosphonomethylglycine

構造式；

$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート ($\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$)；ホスホノメチル基のメチレン位を ^{14}C で標識。



標識位置：*

供試動物：Wistar 系 SPF アルビノラット 体重 雄約 125g 雌約 120g

試験方法：

投与；投与方法及び試料採取は表 1 の通りである。

表 1 投与方法及び試料採取

投与回数・経路・期間	供試化合物	用量	動物数	試験内容	採取試料	採取時期
慢性混餌投与 (投与期間 14 日) (浄化期間 10 日)	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$	対照	雌雄各 12 匹	吸収・排泄	尿、糞	投与期間中 14 日間毎日 投与後 10 日間毎日
		1ppm	雌雄各 16 匹			
		10ppm	雌雄各 16 匹	分布	肝臓、腎臓、筋肉、 脂肪、血液、脾臓、 消化管 ^{a)} 、脳、 心臓、精巣、卵巣	投与期間中 2, 6, 10, 14 日 浄化期間中 1, 3, 6, 10 日
		100ppm	雌雄各 16 匹			

a) 消化管内容物を含む。

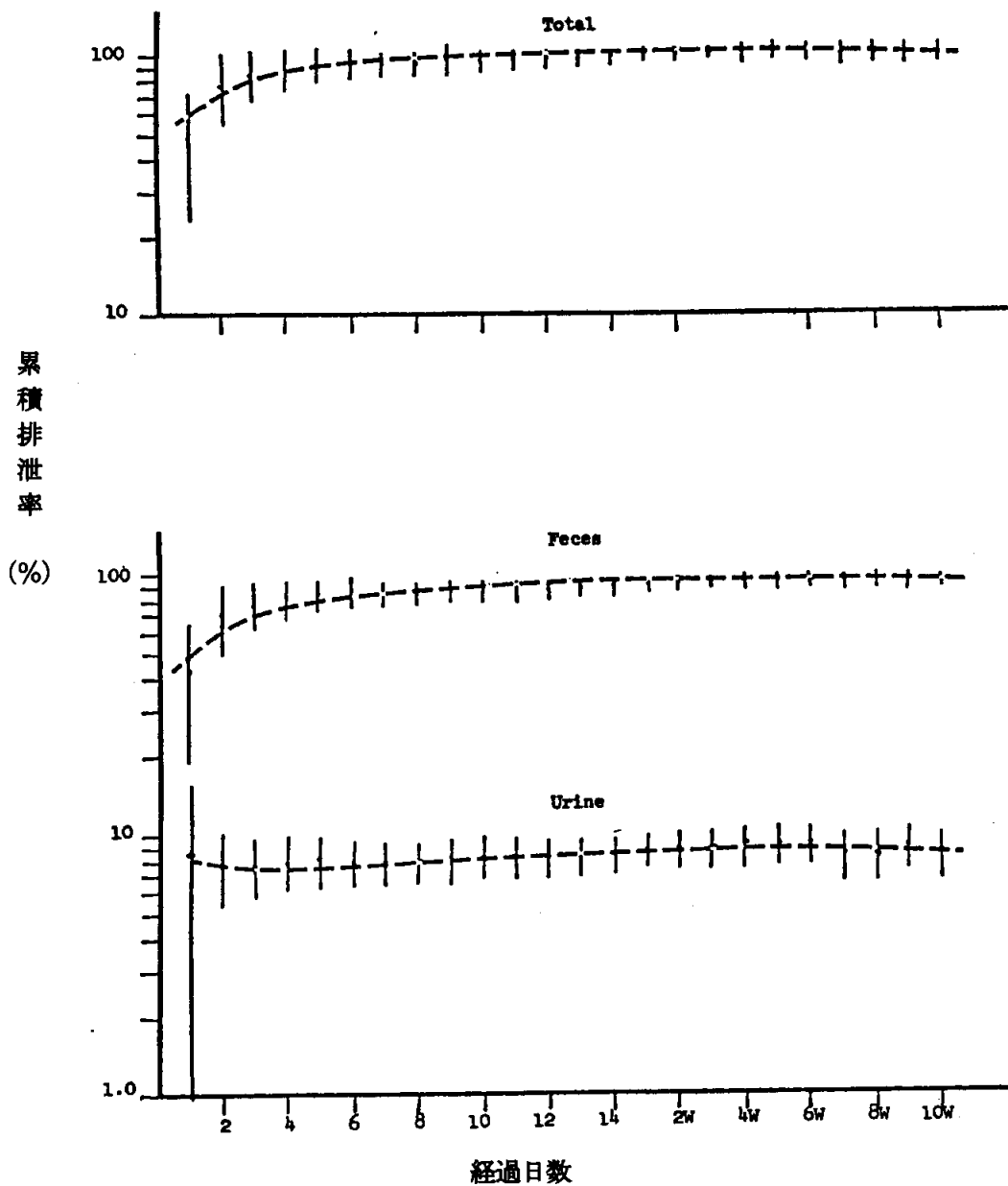
$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサートを 1、10、100ppm (毎日の摂餌量を 5g/ラットとした場合、各々 0.04、0.4、4mg/kg に相当する) の割合で餌に混ぜ、雌雄各々 60 匹のラットに与えた。ラットは雌雄共に 4 群 (対照群 12 匹、1、10、100ppm 群共に 16 匹、計 60 匹) に分け、投与期間中 4 回、浄化期間中 4 回にわたって屠殺 (雌雄各 2 匹) し、主要臓器及び組織を摘出して体内分布を調べた。投与は 14 日間連続して行い、その後 10 日間通常食を与えて放射能の減衰を観察し、各臓器・組織における放射能の半減期を算定した。なお、屠殺指定日の投与 2 日目と浄化期間 1 日目には対照群を設けなかった。

排泄物に関しては投与期間、浄化期間を通して毎日採取し、放射能を測定した。

結果：

グリホサートの慢性混餌投与において放射能は図1~3に示したように1、10、100ppmのいずれの投与濃度においても雌雄共に尿中に約10%、糞中に90%排泄された。各投与濃度における体外排泄率は直線的な投与量相関を示していた。このことはグリホサートの吸収が濃度依存性のものであり、飽和現象をもった能動吸収ではないことを示している。

図1 1ppmのグリホサートを慢性混餌投与における排泄割合



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

図2 10ppmのグリホサートを慢性混餌投与における排泄割合

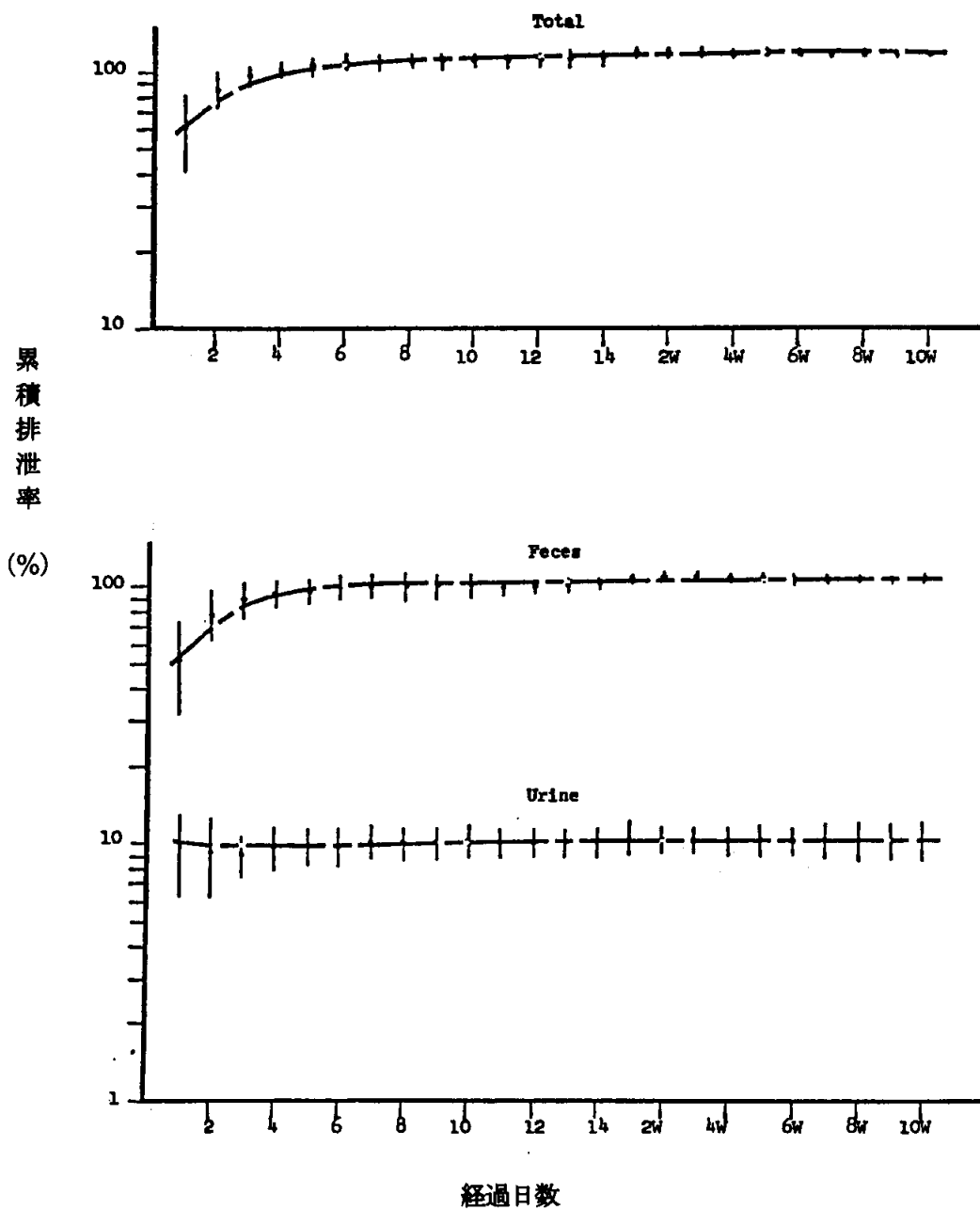


図3 100ppmのグリホサートを慢性混餌投与における排泄割合

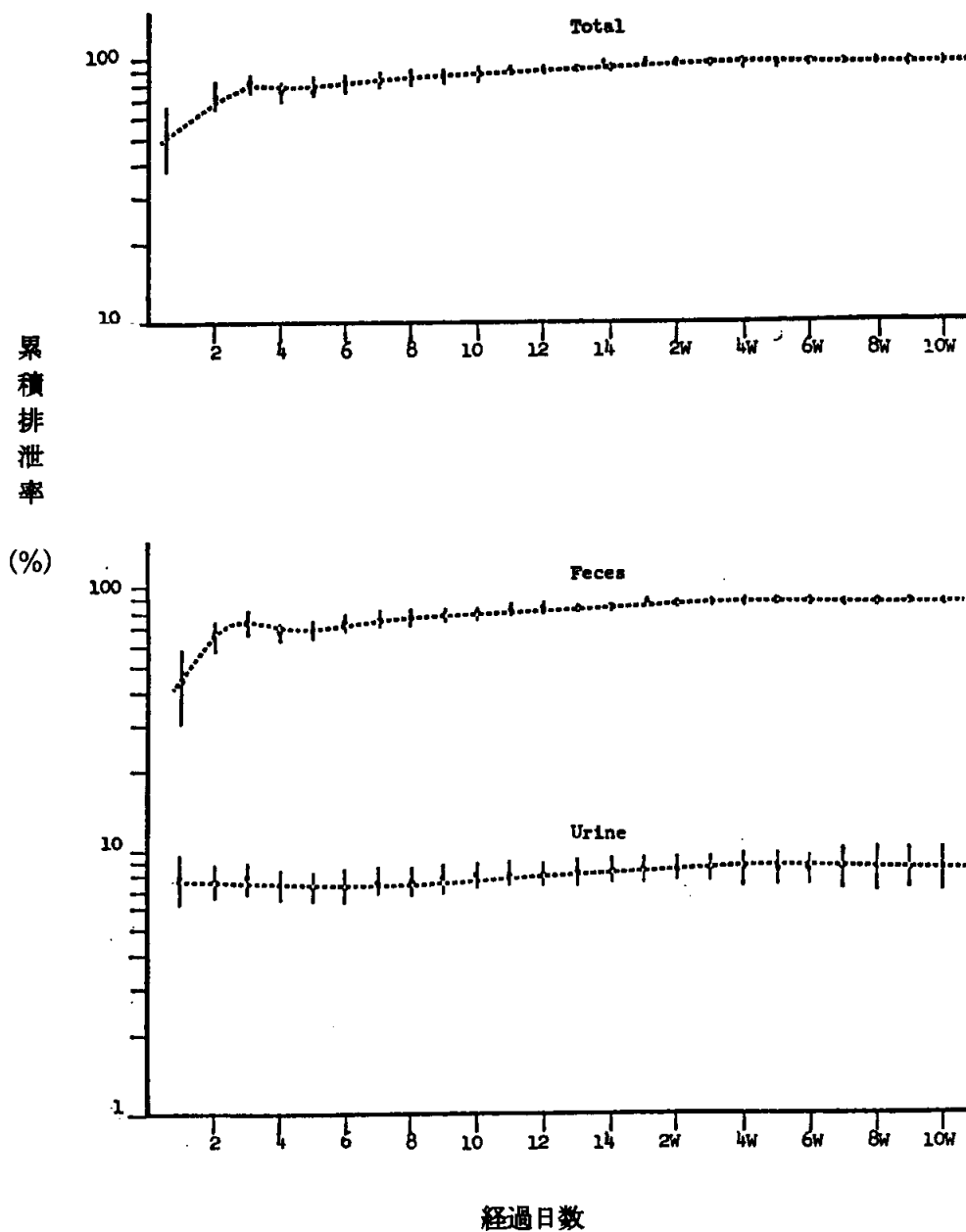


図4～7では、尿及び糞中への浄化期間を含めた排泄を示した。放射能の体外排泄は投与後約3日目でプラトーに達し、その後はラットの成長に伴う摂餌量の増加によって摂取放射能が増加し、排泄量が徐々に増加していった。しかし投与終了後は急速に減少し、投与後3～6日(尿)、あるいは4～7日(糞)にかけて一時的なプラトーが出現した。これは尿の場合は、投与期間中に臓器・組織に蓄積した少量のグリホサートが取り除かれ、血漿中から腎臓を通して排泄されたと考えられる。糞の場合は、単回経口投与で見られたのと同様に胆汁排泄による腸肝循環に基づくものであるが、その出現時間は慢性投与を反映して1～2日遅れた。

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。

尿、糞中に検出された放射能はほとんどがグリホサートであったが、アミノメチルホスホン酸、N-メチルアミノメチルホスホン酸が数%（両者の合計で対糞中放射能の7~9%）検出された。これは投与直前の $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサートの分析で原体中にアミノメチルホスホン酸が5.6%、N-メチルアミノメチルホスホン酸が1.6%検出されたことより、動物により生成されたものではなく原体中の不純物と考えられている。

図4 雄ラットへのグリホサートの慢性混餌投与における尿中排泄

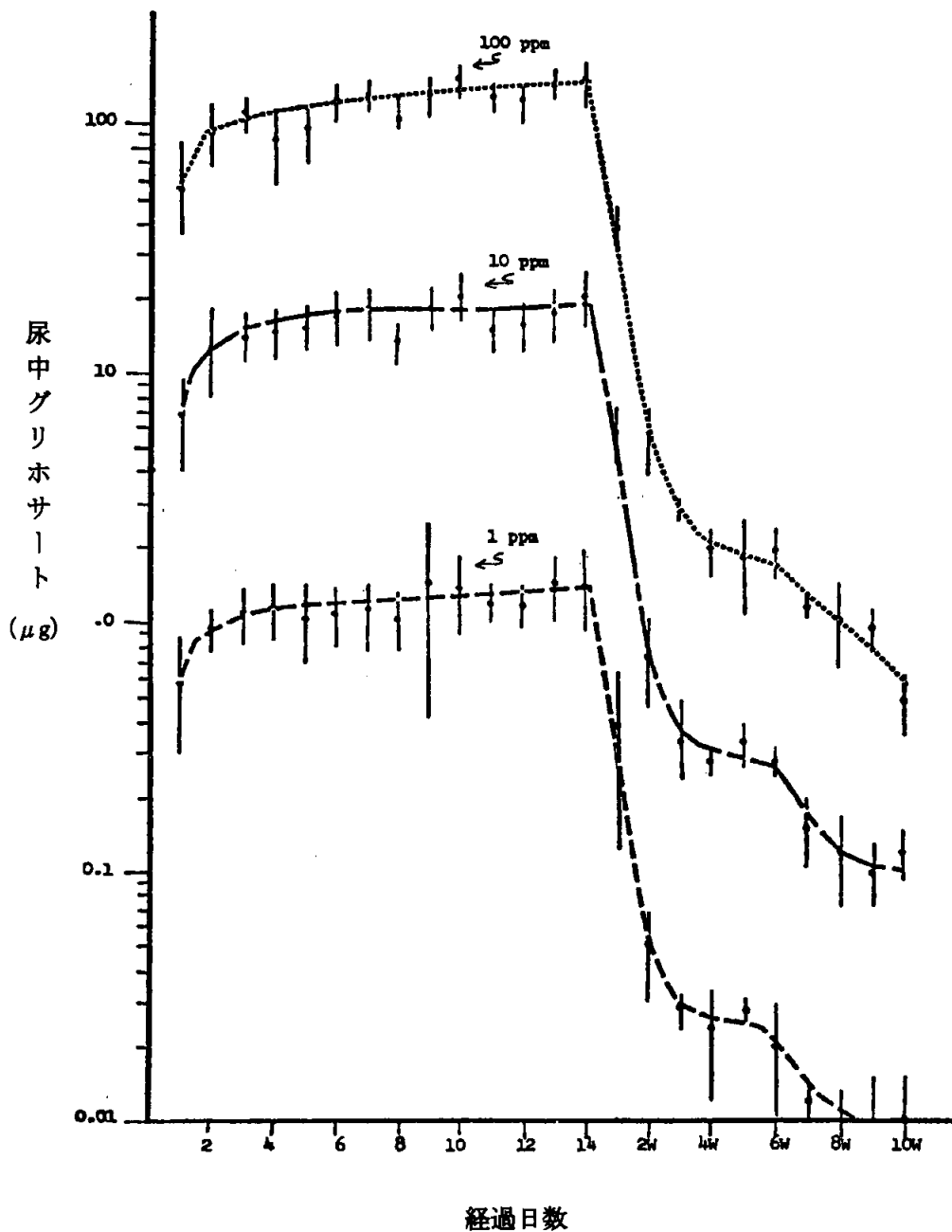
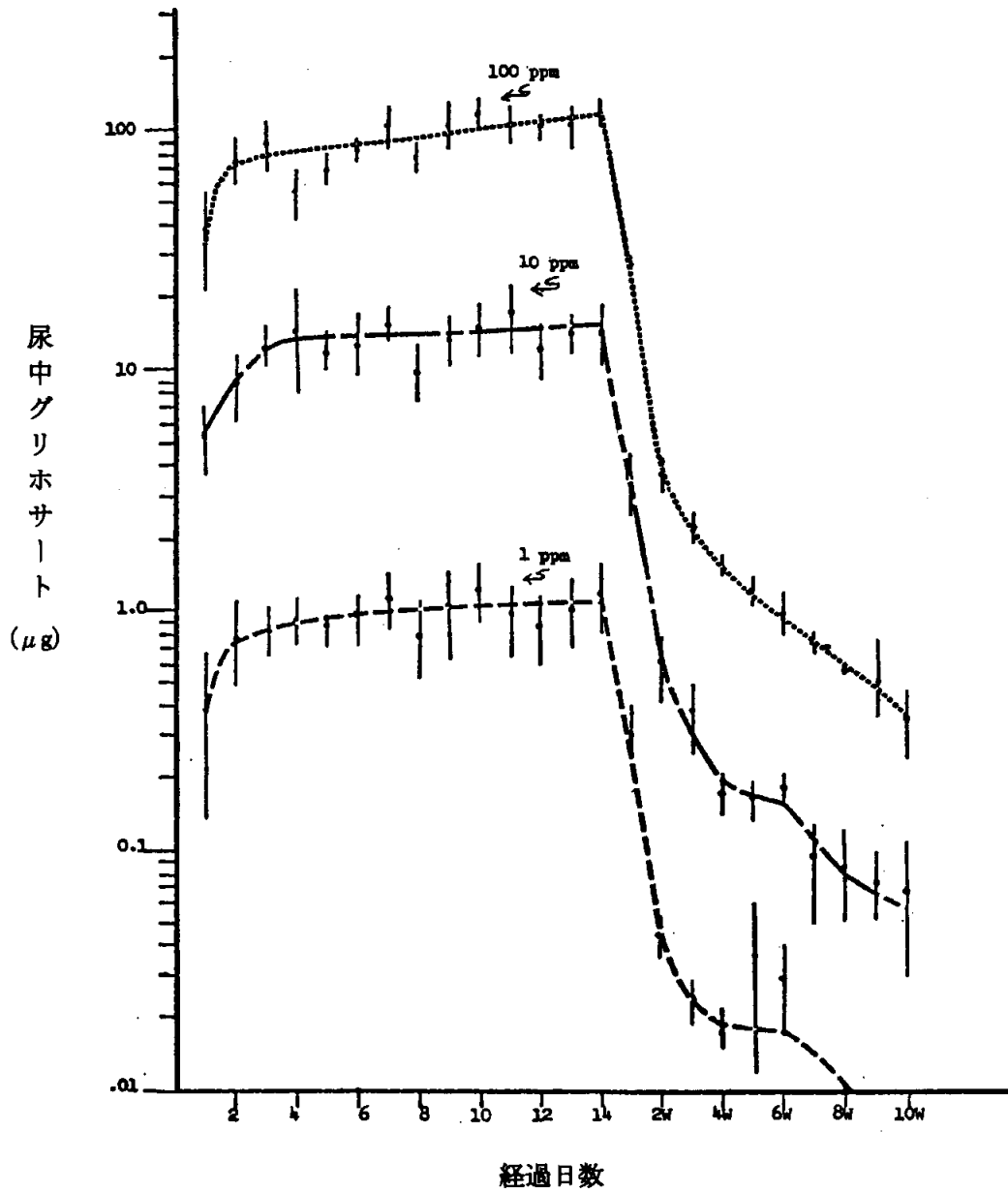
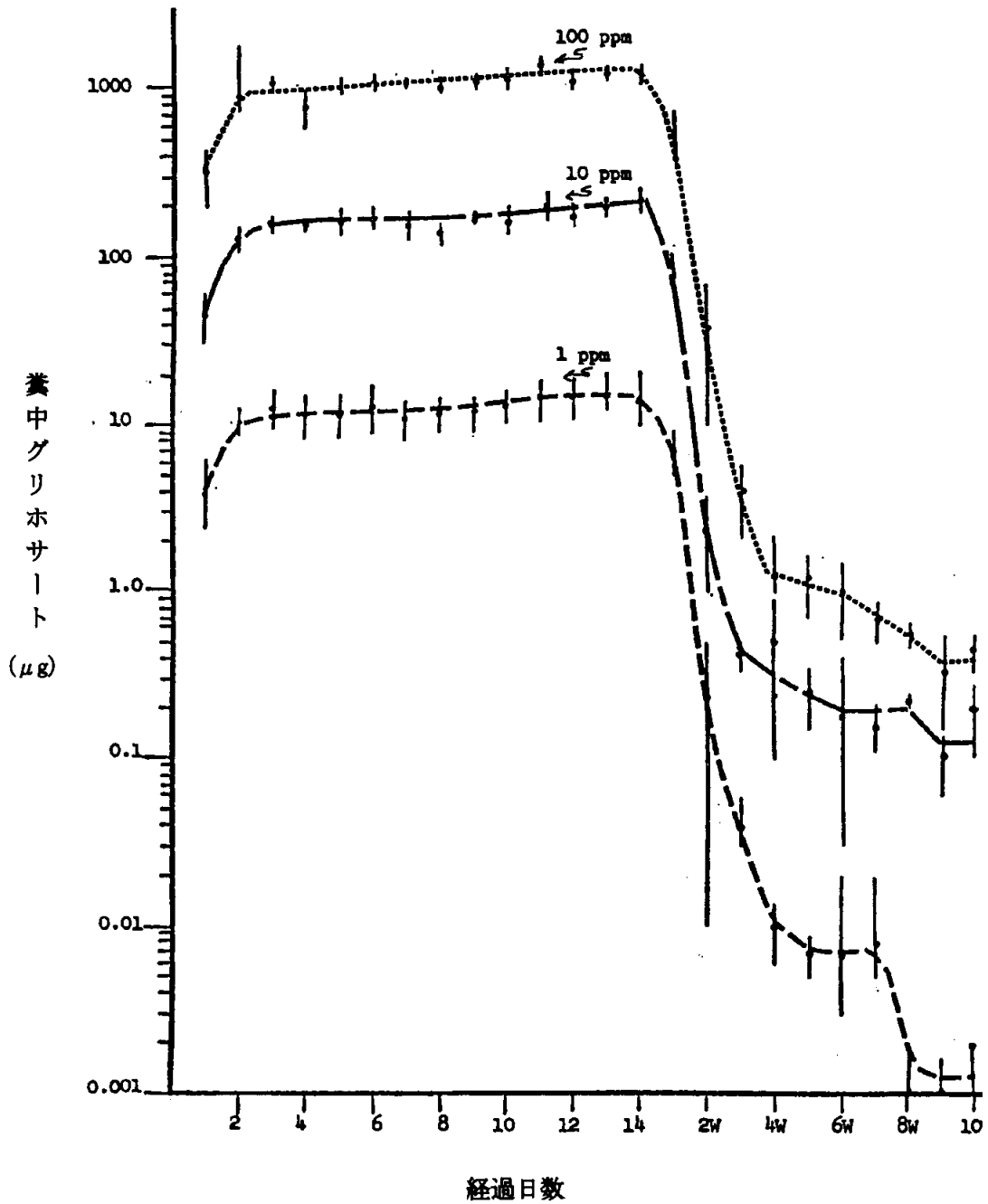


図5 雌ラットへのグリホサートの慢性混餌投与における尿中排泄



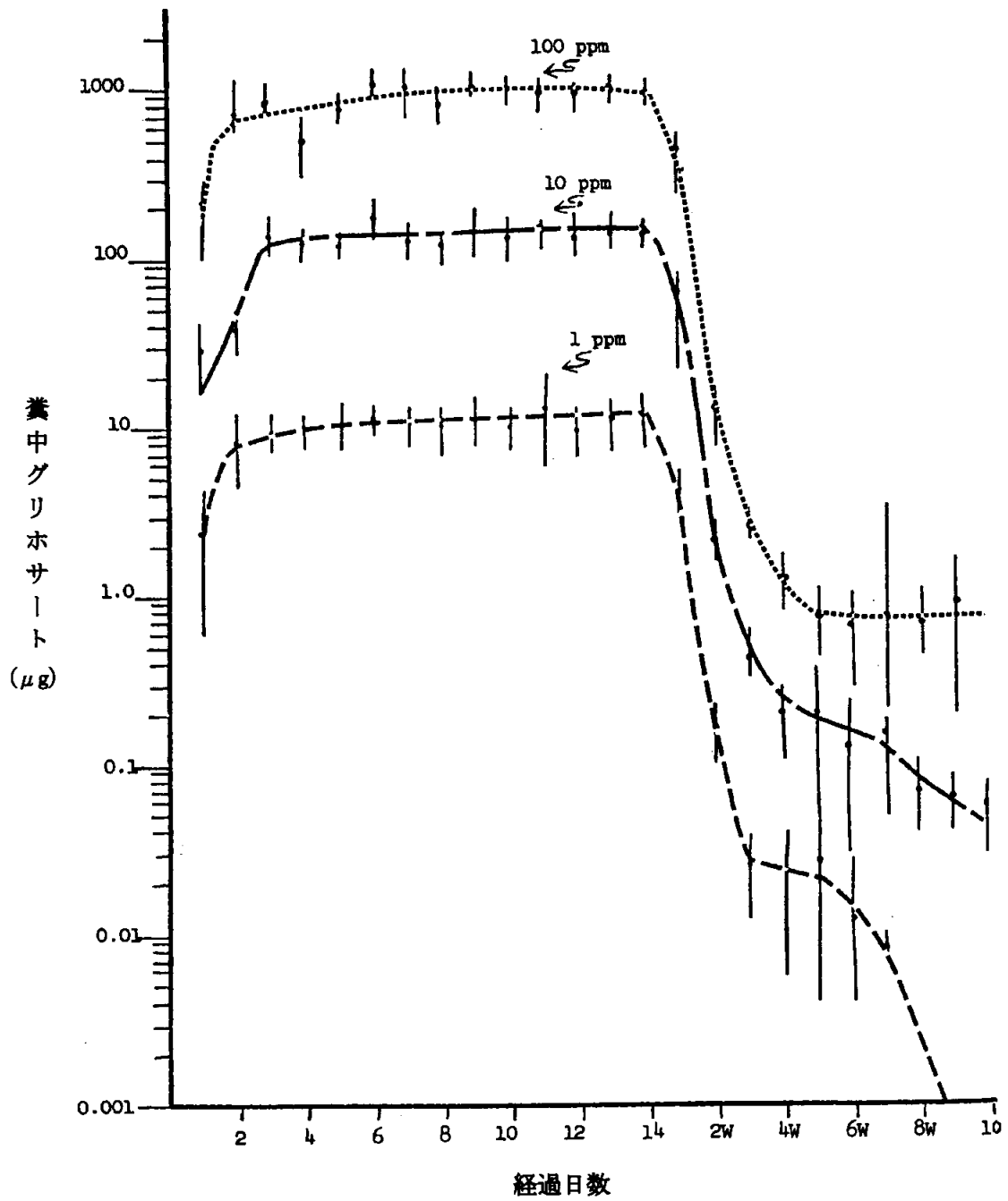
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

図6 雄ラットへのグリホサートの慢性混餌投与における糞中排泄



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。

図7 雌ラットへのグリホサートの慢性混餌投与における糞中排泄



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。

放射能の主要臓器での経時的な分布を図8~13（報告書のデータを用いて申請者が作成）に示した。ほとんどの臓器・組織で投与後6~10日でプラトーに達したが、100ppm投与において血液、肝臓、筋肉にわずかながら蓄積する傾向が見られた。投与終了後、消化管（内容物を含む）からは尿、糞同様にすみやかに減少したが、他の臓器及び組織からは比較的ゆっくりと減少していった。また、11種の主要臓器を分析した限りにおいて、吸収されたグリホサートが特異的な臓器に集中する傾向は見られなかった。全ての臓器において残留量は投与量に比例していた。

投与期間後期においては摂取された放射能に相当する量が体外へ排泄されていることより、グリホサートが動物体内に蓄積する可能性はないと考えられた。なお、臓器中の代謝物の定性及び経時的変遷は、グリホサートが動物により代謝されにくいことが代謝試験から明らかであるので実施しなかった。肝臓における放射能の半減期は約4日、腎臓においては投与終了初期で1日、後期で3~7日といった2相性を示し、筋肉においては10日以上であった。

図8 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート血中濃度

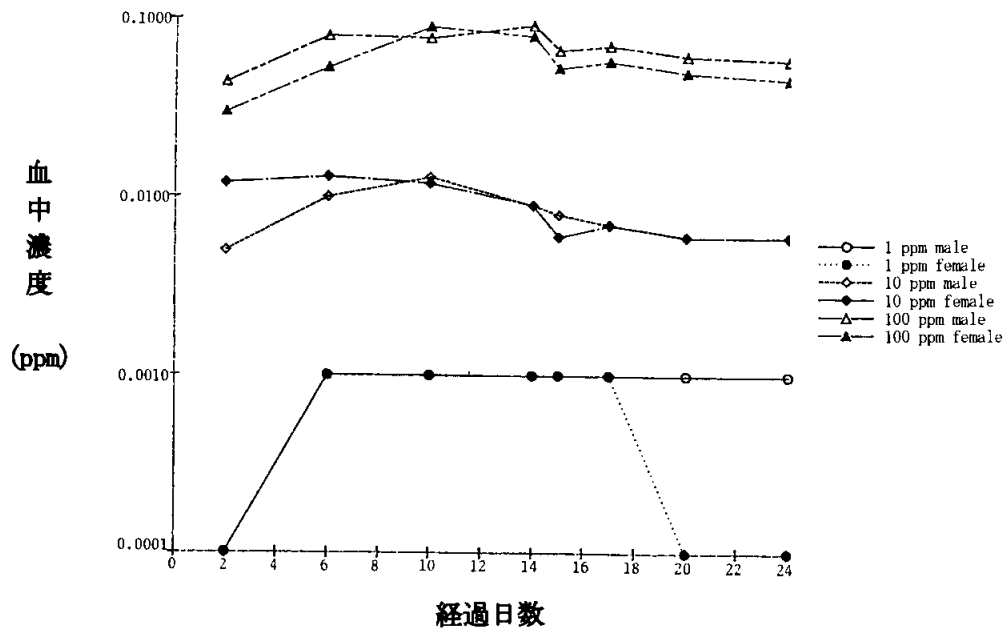


図9 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート肝臓中濃度

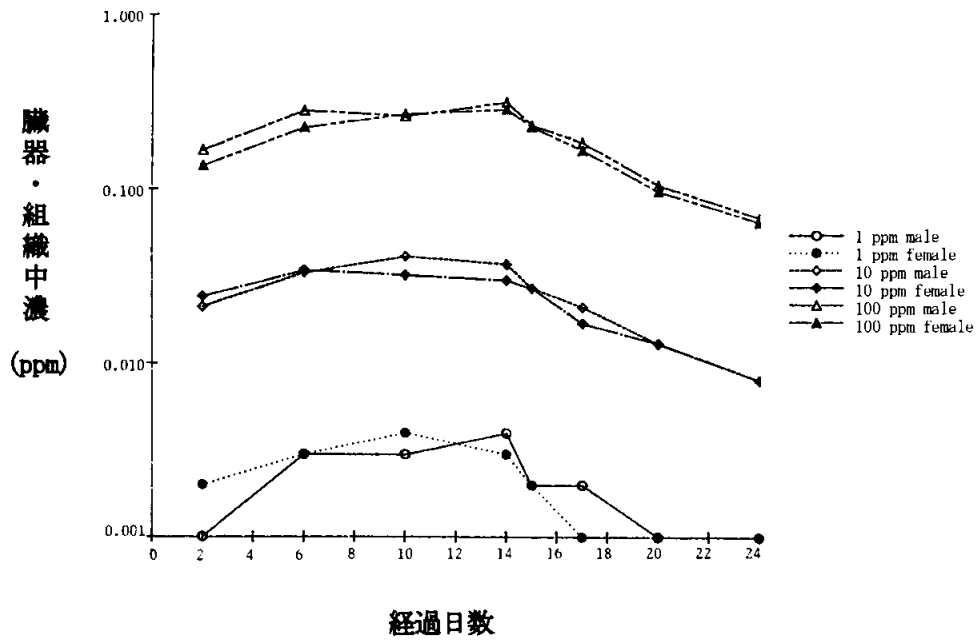


図10 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート腎臓中濃度

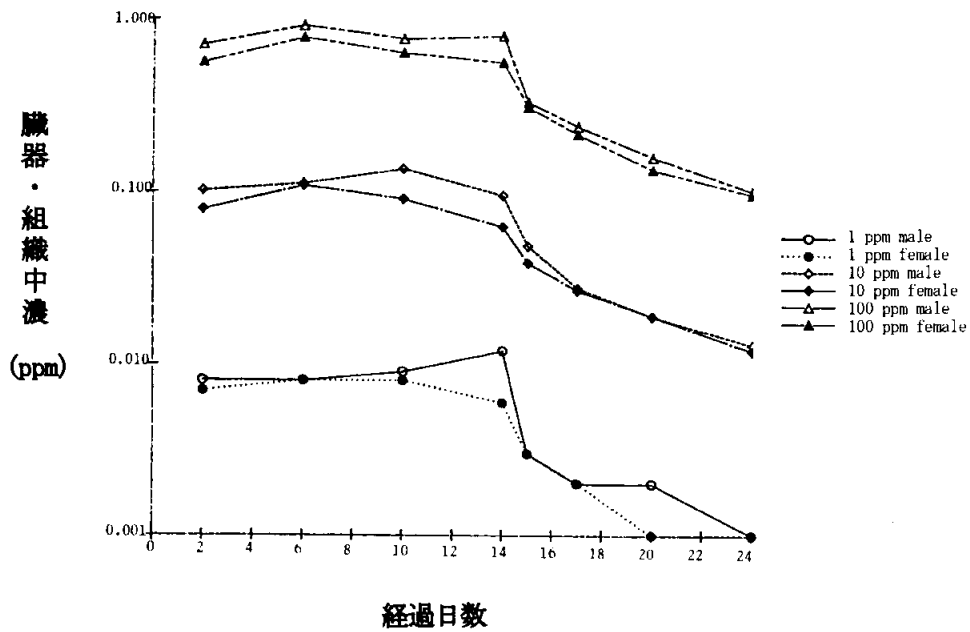


図 11 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート脂肪中濃度

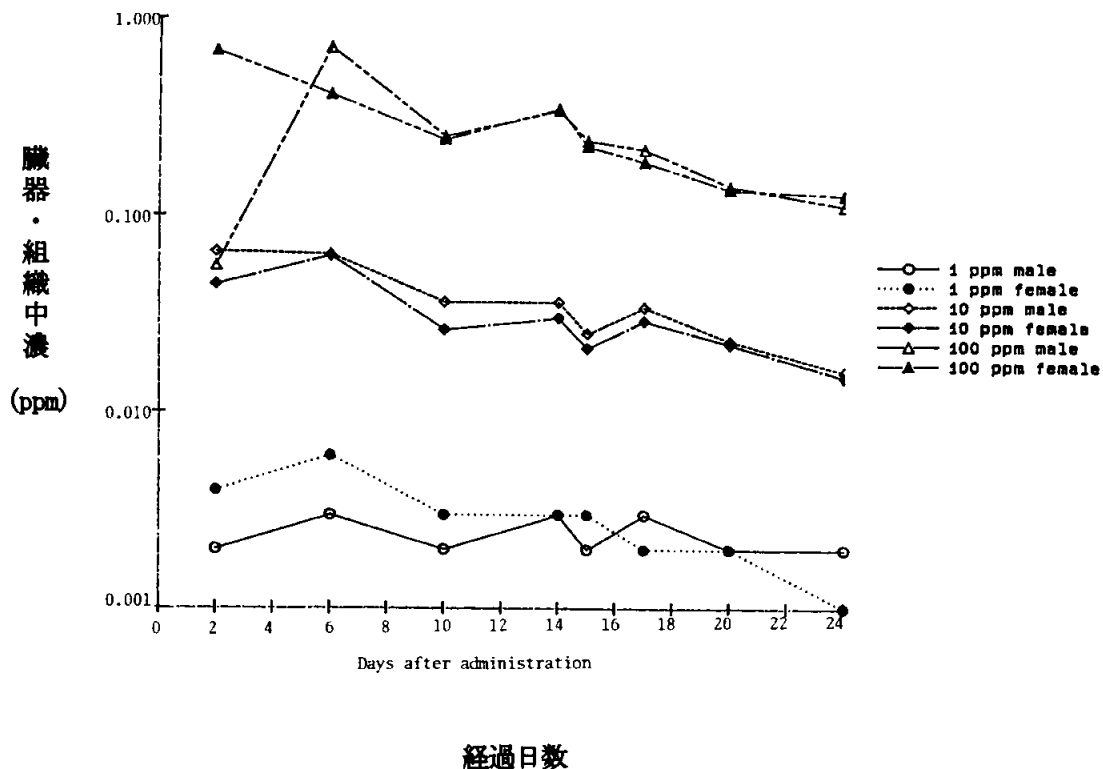
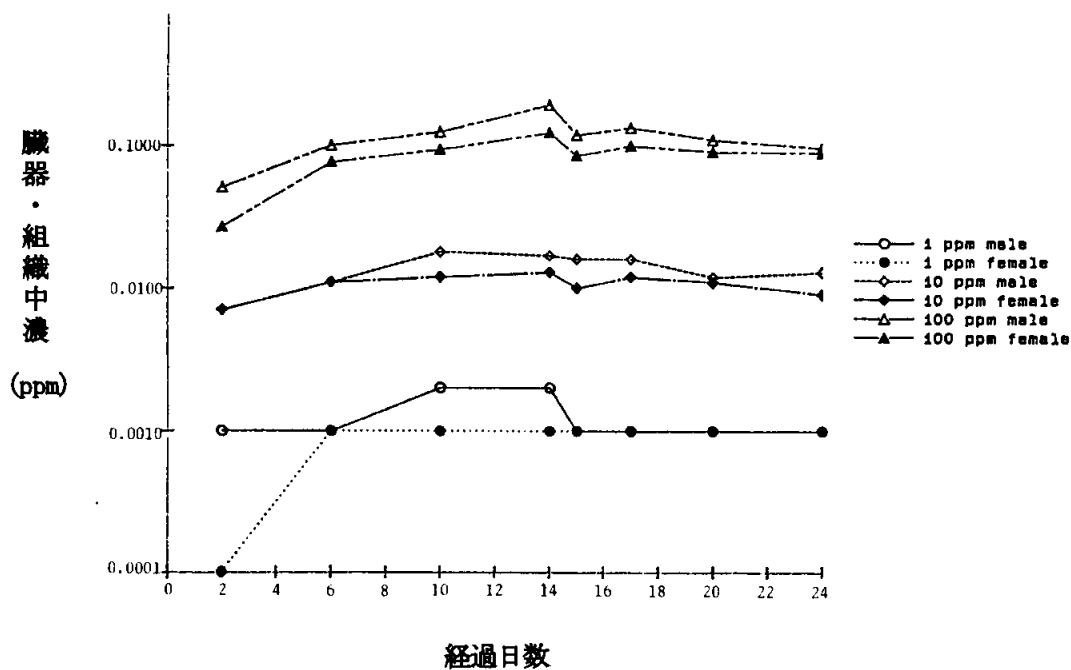
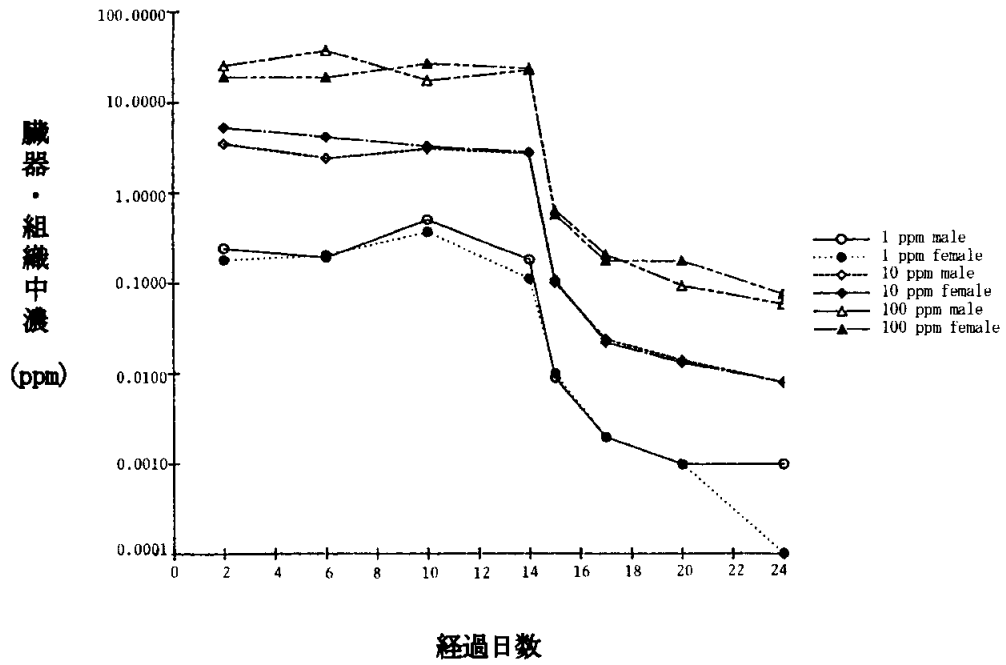


図 12 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート筋肉中濃度



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

図 13 グリホサートの慢性混餌投与におけるグリホサート消化管中濃度



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

(7) ^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸のラットにおける単回経口投与試験

(資料 No. 9-3)

試験機関 :

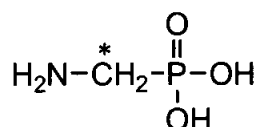
報告書作成年 : 1973 年

供試標識化合物 :

^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸

化学名 ; aminomethylphosphonic acid

構造式 ;



標識位置 : *

比放射能 8.9mCi/mM

供試動物 : Wistar 系 SPF ラット 体重 150g

試験方法 :

投与 ; 投与方法及び試料採取は表 1 の通りである。

表 1 投与方法及び試料採取

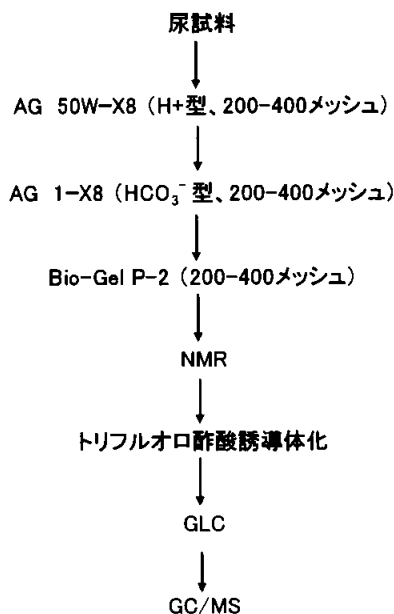
投与回数・経路	用量	動物数	試験内容	採取試料	採取時期
単回強制経口	6.7mg/kg	雄 動物数 未記載	吸収・排泄	尿、糞、呼気	投与後 12、24、48、 72、96、120 時間
			分布	肝臓、腎臓、筋肉、脂肪、消化管、脾臓、脳、心臓、精巣、血液	投与後 120 時間

4 時間絶食させた雄ラットに ^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸を胃ゾンデを用いて 6.7mg/kg の用量で強制経口投与し、糞、尿、呼気 (CO_2) を個別に採取できるユニットで飼育した。尿、糞、呼気試料を投与後 12、24、48、72、96、120 時間に採取した。この試験においては経時的血中濃度の測定は実施しなかった。さらに、120 時間時に屠殺後、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪、消化管、脾臓、脳、心臓、精巣、血液を採取した。

代謝物 :

代謝物の分離・同定・定量は尿について行い、糞、主要臓器及び組織中の代謝物分析は実施しなかった。尿中代謝物の単離・精製には陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、セルロース TLC を用いた。同定、定量には、 $^1\text{H-NMR}$ 、また、ジ-n-ブチル-N-トリフルオロアセチル誘導体化後 GC/MS を用いた。図 1 に尿試料の分離・精製方法を示した。

図1 尿試料の分離・精製



結果:

表2に投与120時間後の尿、糞、呼気、組織等への放射能分布を示した。経口投与されたアミノメチルホスホン酸は消化管からはあまり吸収されず、主たる排泄経路は糞で、投与後24時間には尿中に投与量の18%、糞中に53%（合計体外排泄率71%）が排泄され、120時間後には尿中に20%、糞中に74%が排泄された。呼気（CO₂）への排泄は0.1%以下であり、吸収されたアミノメチルホスホン酸はほとんど分解されないことが示された。

表2 アミノメチルホスホン酸の単回経口投与120時間後の放射能分布

採取時間 (hr)	経時的排泄率 (対投与量%)					
	尿	糞	呼気	ユニット 洗浄液	組織	累計
12	13.04	5.86	0.06			18.95
24	4.50	47.24	0.01			70.70
48	1.52	19.30	0.00			91.52
72	0.66	0.91	0.00			93.09
96	0.23	0.12	0.00			93.44
120	0.05	0.06	0.00			93.55
合計	20.00	73.49	0.06	0.13	0.06	93.74

図2には体外排泄の経時変化を示した。¹⁴C標識アミノメチルホスホン酸の体外排泄の半減期は10~11時間で、ホスホメチル基メチレン-¹⁴C標識グリホサート（CH₂-¹⁴C-グリホサート）の半減期（8~9時間）とほぼ同程度であった（資料9-1）。しかし、CH₂-¹⁴C-グリホサートでは、48~96時間に体内残存放射能の再分配に基づいて排泄が一定となったが、¹⁴C標識アミノメチルホスホン酸はそれとは異なり、48~96時間後に排泄曲線が平坦になり、約72時間後にはむしろ漸近線に近づくかのように単純にプラトーに達した。

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。

図2 アミノメチルホスホン酸単回経口投与における排泄率

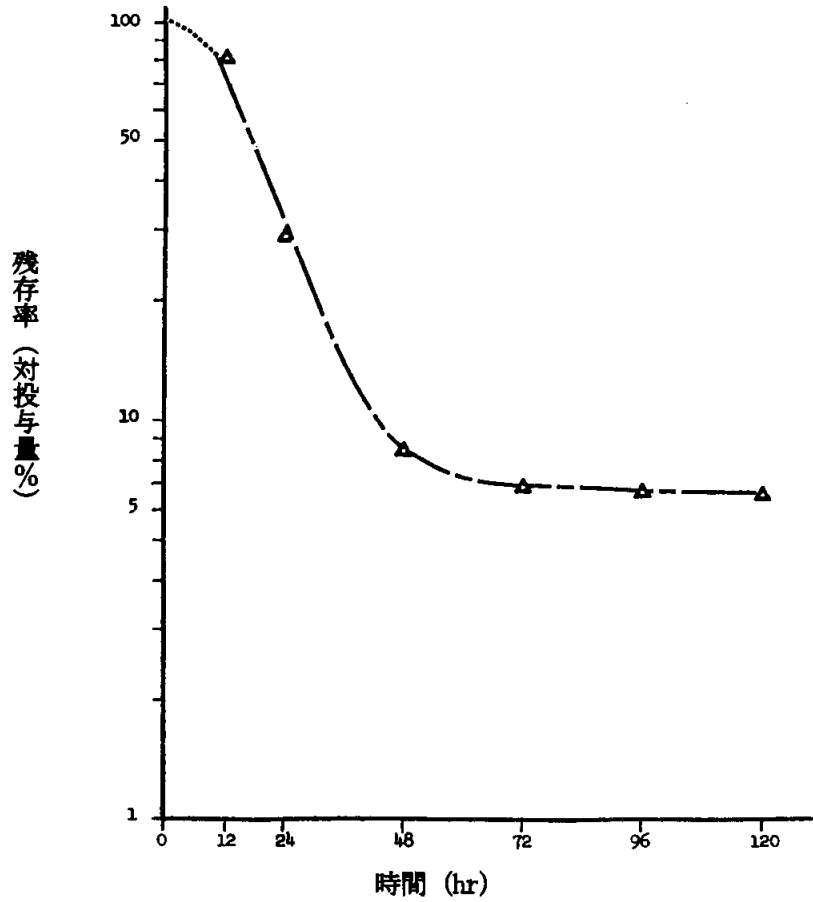


表3に体内放射能分布を示した。臓器・組織中残留量は全体で0.06%で、経口投与の CH_2^{14}C -グリホサートの場合よりも低かった(資料9-1)。また、いずれの臓器・組織においても残留濃度は0.01ppm以下で、腎臓、肝臓においては0.006ppmであった。

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。

表 3 アミノメチルホスホン酸の単回経口投与 120 時間後の体内放射能分布

臓器・組織	ウサギにおける単回経口投与 120 時間後の体内放射能分布	
	対投与量 (%)	濃度 (ppm)
肝臓	0.01	0.006
腎臓	<0.01	0.006
筋肉	0.02	0.003
脂肪	0.01	0.004
消化管 ^{a)}	0.02	0.008
脾臓	<0.01	0.004
心臓	<0.01	0.004
脳	<0.01	0.001
精巣	<0.01	0.003
血液	<0.01	0.003

a) 消化管内容物を含む

尿中代謝物の分析の結果、代謝物は親化合物のアミノメチルホスホン酸のみで全く代謝分解を受けなかった。従って、グリホサートが生体内で代謝分解を受けてアミノメチルホスホン酸が生成したとしても、これは体内に蓄積されることなく、すみやかに排泄されると考えられる。

2. 植物体における代謝試験

(1) グリホサートのダイズ、トウモロコシ、コムギ、ワタにおける代謝運命試験

(資料 No. 10-1)

試験機関 :
報告書作成年 : 1973 年

供試標識化合物 :

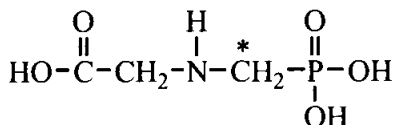
1) ¹⁴C 標識グリホサート [N-(ホスホノメチル)グリシン]

化学名 ; N-phosphonomethylglycine

構造式 ;

(a) CH₂-¹⁴C-グリホサート (CH₂-¹⁴C) ; ホスホノメチル基のメチレン位を ¹³C または ¹⁴C で標識。

標識位置 : *

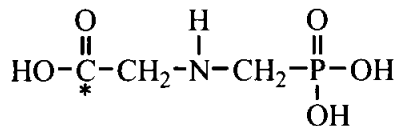


¹⁴ C 標識		¹³ C 標識	
比放射能	8.06mCi/mM	同位体標識純度	90%
放射化学的純度 ^{a)}	96.0%	化学的純度	97.7%

a) 他の放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 3.3%
N-メチルアミノメチルホスホン酸 0.6%

(b) Gly-1-¹⁴C-グリホサート (Gly-1-¹⁴C) ; グリシン部のカルボキシル基を ¹³C または ¹⁴C で標識。

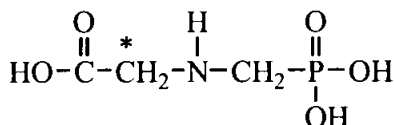
標識位置 : *



¹⁴ C 標識		¹³ C 標識	
比放射能	10.02mCi/mM	同位体標識純度	90%
放射化学的純度	96%	化学的純度	95.0%

(c) Gly-2-¹⁴C-グリホサート (Gly-2-¹⁴C) ; グリシン部のメチレン位を ¹³C または ¹⁴C で標識。

標識位置 : *

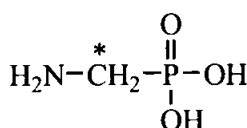


¹⁴ C 標識		¹³ C 標識	
比放射能	9.40mCi/mM	同位体標識純度	90%
放射化学的純度	99%	化学的純度	95.8%

2) ¹⁴C 標識アミノメチルホスホン酸 (¹⁴C-AMPA)

化学名 ; aminomethylphosphonic acid

構造式 ;



標識位置 : *

¹⁴ C 標識	
比放射能	9.23mCi/mM
放射化学的純度	97%以上

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。

- 供試植物： 1) トウモロコシ： DeKalb XL-45 種
 2) ワタ： Stoneville 種
 3) ダイズ： Clark 種
 4) コムギ： Thacher Winter 種

試験方法：

1) 処理方法；

トウモロコシ、ワタ、ダイズ、コムギにたいして土壌処理、砂耕栽培、予備水耕栽培によりグリホサートあるいはアミノメチルホスホン酸（土壌処理のみ）を処理し、各種処理方法における植物体への吸収及び各部位別の吸収移行率を経時的に調べ、比較した。

- a) 土壌処理；Drummer 埴壤土を満たした鉢（8×6 インチ、20×15cm）に植物を播種し、1 週間後に 4.48kg ae/ha で CH₂-¹⁴C-グリホサートを処理した。また同様に鉢（8 3/8×7 3/4 インチ；22.1×18.3cm）に 1.68kg/ha でアミノメチルホスホン酸（¹⁴C-AMPA）を処理し、4、6、8 週時に処理鉢及び対照用鉢の植物を 1 本ずつ土壌から 1 インチ上のところで切り取り、試料とした。採取した各試料は冷凍保存した。

処理量の設定根拠；グリホサートの上記作物に対する最大慣行施用量として 4.48kg ae/ha を選択した。（ae とはグリホサート酸換算の薬量）

処理方法及び試料採取は表 1 の通りである。

表1 土壌処理によるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸の吸収試験における
 薬剤処理と試料採取

項目	供試化合物	供試植物	処理量	植物数	試験内容	試料採取	試料採取
グリホサート 処理区 ^{a)}	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ [°] トウモロコシ ワタ コムギ [°]	4.48 kg ae/ha	4 本 4 本 4 本 8 本	吸収 移行	地上部	処理 4, 6, 8 週間後
グリホサート 対照区	無し	ダイズ [°] トウモロコシ ワタ コムギ [°]	—	4 本 4 本 4 本 8 本	吸収 移行	地上部	処理 4, 6, 8 週間後
AMPA 処理区 ^{b)}	¹⁴ C-AMPA	ダイズ [°] トウモロコシ ワタ コムギ [°]	1.68 kg/ha	4 本 4 本 4 本 8 本	吸収 移行	地上部	処理 4, 6, 8 週間後
AMPA 対照区	無し	ダイズ [°] トウモロコシ ワタ コムギ [°]	—	4 本 4 本 4 本 8 本	吸収 移行	地上部	処理 4, 6, 8 週間後

a) 植え付け1週間後に処理、2鉢の内1鉢に処理、1鉢は対照区（ダイズ[°]、トウモロコシ、ワタ4本/鉢、コムギ[°]は8本/鉢）

b) 植え付け1週間後に処理、3鉢の内1鉢に処理、2鉢は対照区（ダイズ[°]、トウモロコシ、ワタ4本/鉢、コムギ[°]は8本/鉢）

aeとはグリホサート酸換算の薬量

申請者注)処理量は申請者により算出

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。

使用した土壌の特性を表2に示した。

表2 使用した土壌の特性

特性	土壌	Drummer土壌
土性		埴壤土
有機物含量 (%)		6
砂 (%)		2.0
シルト (%)		55.4
粘土 (%)		36.8
pH		7.0

b) 砂耕栽培；砂耕栽培では、4インチ（10cm）角の鉢に入れた砂に植物の種を播種し、生育させた。次に鉢に 2.24kg ae/ha で $\text{CH}_2-^{14}\text{C}$ -グリホサートを処理し、試料は 4、10、18 日時に採取した。それらの試料を凍結乾燥後、放射エネルギーを測定した。18 日時試料については、地上部と根部を別けて分析した。採取した各試料は冷凍保存した。（ae とはグリホサート酸換算の薬量）

処理方法及び試料採取は表3の通りである。

表3 砂耕栽培によるグリホサートの吸収試験における薬剤処理と試料採取

項目	供試化合物	供試植物	処理量	植物数	試験内容	試料採取	試料採取
処理区 ^{a)}	$\text{CH}_2-^{14}\text{C}$ -グリホサート	ダイズ トウモロコシ ワタ コムギ	2.24 kg ae/ha	12本 12本 12本 12本	吸収 移行	地上部 根部	処理 4, 10, 18 日後
対照区	無し	ダイズ トウモロコシ ワタ コムギ	—	8本 8本 8本 8本	吸収 移行	地上部 根部	処理 4, 10, 18 日後

a) 1鉢当たり4本で、3鉢が処理区、2鉢が対照区

ae とはグリホサート酸換算の薬量

申請者注) 処理量は申請者により算出

砂耕栽培及び下記の水耕栽培吸収試験（実験 1-11）では、下記の栄養培地の各液 a（24mL）、b（120mL）、c（120mL）、d（96mL）、e（36mL）、及び f（48mL）を砂耕栽培用には水道水、水耕栽培では蒸留水で希釈し、6 ガロン（約 22.8L）に定容した。pH は硝酸あるいは水酸化アンモニウムで 4.7 に調整した。

栄養培地組成
a) 1M KH_2PO_4 (131.1g/L)
b) 1M KNO_3 (101.1g/L)
c) 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (236.16g/L)
d) 1M MgSO_4 (120.4g/L)
e) 1M鉄封鎖剤330 (10g/L)
f) 微量栄養液 [H_3BO_3 (2.86g/L)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81g/L)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22g/L)、 CuSO_4 (0.05g/L)、 $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02g/L)]

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。

- c) 予備水耕栽培；水耕栽培用ビンに培養液（100mL）を入れ、植物を砂耕栽培で2週間生育させた後、吸収試験では、ダイズは10ppm、その他の植物は20ppmの $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサートを含む蒸留水中で3日間水耕栽培した。また、適正な処理濃度を検討する目的で5日間の薬害試験を実施した。採取した各試料は冷凍保存した。

処理方法及び試料採取は表4の通りである。

表4 予備水耕栽培によるグリホサートの吸収試験における薬剤処理と試料採取

項目	供試化合物	供試植物	処理量	植物数	試験内容	試料採取	試料採取
吸収試験 ^{a)}	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート	ダイズ	10ppm	2本	吸収移行	地上部 根部	処理3日後
		トウモロコシ	20ppm	1本			
		ワタ	20ppm	2本			
		コムギ	20ppm	4本			
薬害試験 ^{b)}	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート	ダイズ	2, 4, 8ppm	6本	吸収移行	地上部 根部	処理5日後
		トウモロコシ		6本			
		ワタ		6本			
		コムギ		12本			

a) 植物は、2週間砂耕栽培で育成後、使用

ダイズ；2本/ビーカー、トウモロコシ；1本/ビーカー、コムギ；4本/ビーカー、ワタ；2本/ビーカー

b) 植物は砂耕栽培により、ダイズは10日、トウモロコシ、ワタ、コムギは17日生育後、使用

トウモロコシ；ビーカー3個（2本/ビーカー）、ダイズ；ビーカー3個（2本/ビーカー）、コムギ；ビーカー3個（4本/ビーカー）、ワタ；ビーカー3個（2本/ビーカー）

申請者注) 処理量は申請者により算出

- d) 水耕栽培吸収試験（実験1-11）

水耕栽培されたダイズに $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート（実験1、2）、 $\text{Gly-1-}^{14}\text{C}$ -グリホサート（実験3）、 $\text{Gly-2-}^{14}\text{C}$ -グリホサート（実験4）の3種類の ^{14}C 標識グリホサートを処理し、トウモロコシ（実験5）、コムギ（実験6）、ワタ（実験7）には $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサートのみを処理し、植物体への吸収及び各部位別への移行率並びに代謝物生成を経時的に調べ、比較した。水耕栽培用タンクに培養液（5Lあるいは20L）を入れ、植物を砂耕栽培で2週間生育させた後、グリホサートを0.6あるいは2.4ppm（実験1は2.5ppm）含む水耕栽培液中で処理し、トウモロコシ、ダイズ、ワタは28日間、コムギは10日間生育させ、経時的（6、12、20、28日後、コムギは6、10日後）に試料を採取した。

スペクトル特性試験用処理区（実験9）では $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート並びに $\text{CH}_2\text{-}^{13}\text{C}$ -グリホサートの混合物で処理した。

ダイズのパルス処理試験（実験10）では、6日間、2.4ppmのグリホサートを含む水耕液で生育後、50日間無処理水耕液中で生育させた。試料は、6、12、20、28、42、56日後に採取した。

実験8は実験1～7の対照区、実験11は実験9及び実験10の対照区とした。

採取した各試料は冷凍保存した。

処理方法及び試料採取は表5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日本モンサント株式会社にある。

表5 水耕栽培によるグリホサートの吸収試験における薬剤処理と試料採取

処理区	供試化合物	供試植物 ^{a)}	処理量	植物数	試験内容	試料採取	試料採取	水耕液採取
吸収試験処理区 (実験 1-7)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ (実験 1)	2.5ppm	99 本	代謝	地上部 根部	処理 28 日後	1, 6, 12, 20, 28 日
	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ (実験 2)	2.4ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 12, 20, 28 日後	1, 6, 12, 20, 28 日
	Gly-1- ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ (実験 3)	2.4ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 12, 20, 28 日後	1, 6, 12, 20, 28 日
	Gly-2- ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ (実験 4)	2.4ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 12, 20, 25 日後	1, 6, 12, 20, 25 日
	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	トウモロコシ (実験 5)	0.6ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 12, 20, 28 日後	1, 6, 12, 20, 28 日
	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	コムギ (実験 6)	0.6ppm	72 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 10 日 後	1, 6, 10 日
	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ワタ (実験 7)	2.4ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 13, 20, 28 日後	1, 6, 12, 20, 28 日
吸収試験対照区 (実験 8)	無し	ダイズ	無し	6 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	28 日後	-
		トウモロコシ		6 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	28 日後	
		ワタ		6 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	28 日後	
		コムギ		18 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	10 日後	
スペクトル特性 試験用処理区 (実験 9)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ	0.15ppm	198 本	代謝	茎葉部	処理 6, 12, 20, 26 日後	1, 6, 12, 20, 26 日
	CH ₂ - ¹³ C- グリホサート		2.5ppm					
パルス試験 処理区 ^{b)} (実験 10)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	ダイズ	2.4ppm	24 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 6, 12, 20, 28, 42, 56 日後	1, 6 日
スペクトル特性 試験用処理区 及びパルス 試験の対照区 (実験 11)	非標識体 グリホサート	ダイズ	2.4ppm	48 本	吸収・ 代謝	地上部 根部	処理 28, 42, 56 日後	-

a) 2週間砂耕栽培で育成された植物を使用

b) 標識化合物は最初の6日のみ処理

申請者注) 処理量は申請者により算出

2) 分析法;

a) 総残留放射能 (TRR) の測定;

試料は凍結乾燥後、粉碎した均一化試料の一部を燃焼処理後 LSC 測定した。

b) グリホサート代謝物の分離精製

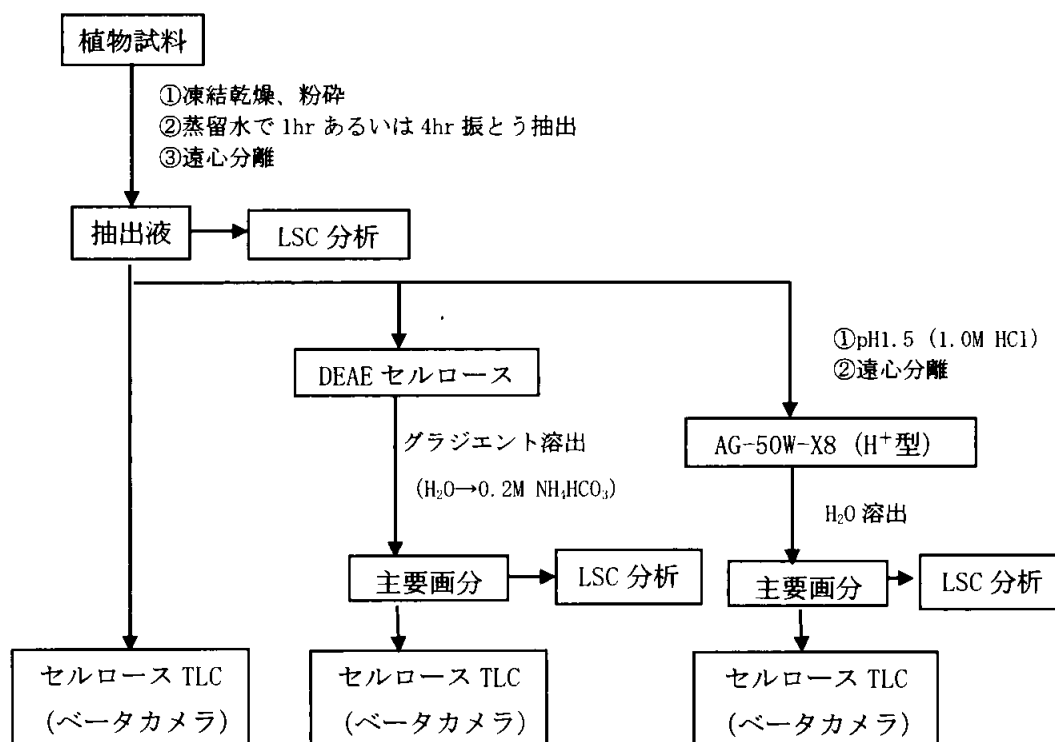
3 種類の方法で、試料を分離精製した。

b-1) 吸収試験モニター用試料; 水耕栽培によるグリホサートの吸収試験では、吸収試験実施期間中モニターした。試料は、4hr 水で振とう抽出し、セルロース TLC/ベータカメラに供し、グリホサート代謝物の定性・定量を行った。この時、植物中の不純物が高濃度で存在するた

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。

め歪んだクロマトグラムが得られる場合は、DEAE セルロースないし AG-50W-X8 (H⁺型) で精製した後、セルロース TLC/ベータカメラ及び LSC 分析に供した。図 1 のその精製法を示す。

図 1 グリホサート及びアミノメチルホスホン酸吸収試験におけるグリホサート・代謝物の分離精製法



b-2) グリホサート代謝物分析用試料精製法；

図 2 にグリホサート代謝物の分離精製のフローチャートを示した。

- ① 抽出；植物試料（乾燥重量 1.0g まで）を蒸留水と 1 時間室温で振とう抽出し、遠心分離して抽出液を得た（LSC 分析）。また、0.5N NH₄OH 溶液及び 0.5N HCl 溶液による抽出効率についても調べた。
- ② 分離精製；抽出液（5mL 洗浄液を含む）を AG-50W-X8（200～400mesh、H⁺型、1.5×6.0cm）に注入し、その溶出液を直接 AG-1-X8（200～400mesh、ギ酸型、1.5×6.0cm）に流し込んだ。その時の溶出液を中性画分として集めた。次に AG-50W-X8 カラムは 2N NH₄OH で溶出し、溶出液を塩基性画分とした。また、AG-1-X8 カラムは 6N ギ酸 50mL で溶出し、溶出液を酸性 1 画分とし、さらに 2N HCl 50mL で溶出し、溶出液を酸性 2 画分とした。
- ③ 各画分の精製；酸性 1 画分は減圧濃縮し、さらに水を加えて濃縮を繰り返し、ギ酸を除いた。次に、AG-1-X8（200～400mesh、ギ酸型、1×11cm）で、水から 6N ギ酸によるグラジエントで溶出し、5mL 毎に分取した。

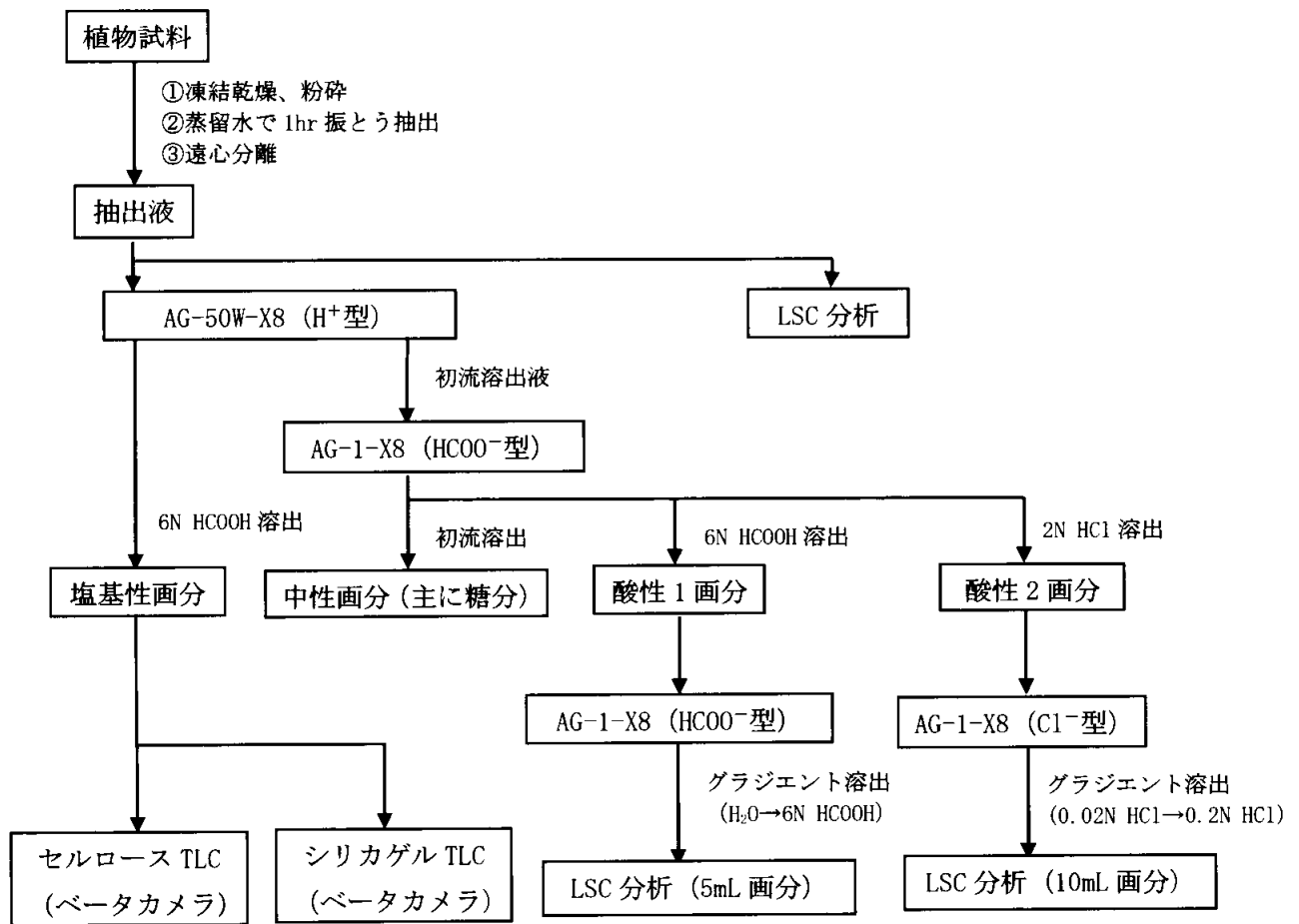
酸性 2 画分も減圧濃縮し、水を加えて濃縮を繰り返し、塩酸を除いた後、AG-1-X8（200

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。

～400mesh、Cl⁻型、1×30cm) で 0.02N HCl から 0.2N HCl によるグラジエントで溶出し 10mL 毎分取した。

塩基性画分については濃縮後、シリカゲルとセルロース TLC で展開し、ベータカメラで検出した。この時、Atkins 及び Canvin の方法 [Atkins, C.A. and Canvin, D.J., *J. Photosynthetica*, 5, 341 (1971)] でアミノ酸/ペプチド、中性糖、糖リン酸エステル、有機酸等の天然物品の定性・定量を行った。

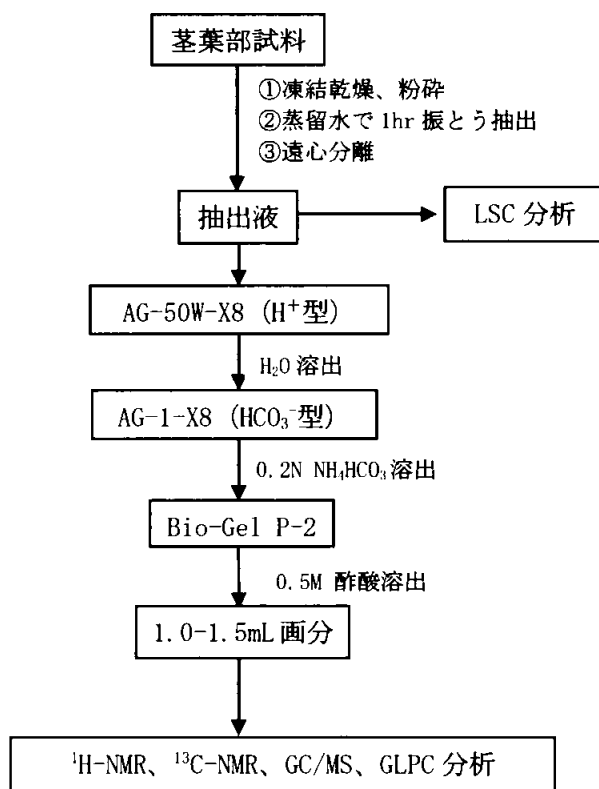
図2 グリホサート代謝物の分離精製法



b-3) スペクトル特性試験用試料 ;

図3 にスペクトル特性試験用試料の分離精製法を示した。グリホサート代謝物の同定用試験では、植物茎葉試料を水で振とう抽出後、AG-50W-X8 (200～400mesh、H⁺型、)、AG-1-X8 (200～400mesh、HCO₃⁻型)、Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーにより精製した後、グリホサート及びその代謝物を無水トリフルオロ酢酸、次いでジアゾ-n-ブタン/エーテル溶液と反応させて誘導体化し、¹H-NMR、¹³C-NMR、GPLC、GC/MS で分析した。

図3 スペクトル特性用試料の分離精製法



結果:

1) 土壌処理、砂耕栽培、予備水耕栽培によるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸の植物体への吸収

a) 土壌処理; ^{14}C 標識グリホサート及び土壌中での代謝物であるアミノメチルホスホン酸の植物体への吸収傾向を明らかにする試験を行った。また、この試験では、土壌で代謝分解されて生成する $^{14}\text{CO}_2$ が植物に同化する程度を調べる目的で、各植物の処理区に対する対照区を設けた。

土壌処理における吸収試験の結果を表6に示した。その結果から明らかなように、土壌処理の場合には、グリホサート及びアミノメチルホスホン酸のいずれにおいても吸収される量は非常に少なく、8週間後の4種の作物で最大吸収を示した植物は、ワタにおけるグリホサートの0.28%であった。この時の無処理の対照区は0.20%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。

表6 土壌処理におけるグリホサート及びアミノメチルスルホン酸の植物中への吸収

植 物	供試薬剤	土壌処理における放射能吸収率 [処理量に対する割合 (%)]					
		4 週		6 週		8 週	
		処理区	対照区	処理区	対照区	処理区	対照区
ダイズ	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	0.0237	0.0013	0.1380	0.0629	0.0726	0.0355
	¹⁴ C-AMPA	0.014	0.003 0.002	0.017	0.007 0.004	0.033	0.012 0.007
コムギ	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	0.0204	0.00085	0.0335	0.0030	0.1159	0.0220
	¹⁴ C-AMPA	0.0035	0.012 0.007	0.0049	0.0034 0.0018	0.0076	0.0049 0.0066
ワタ	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	0.0180	0.0015	0.0586	0.0051	0.2760	0.2001
	¹⁴ C-AMPA	0.0008	0.012 0.006	0.0046	0.0012 0.0012	0.0077	0.0027 0.0044
トウモロコシ	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	0.0310	0.0070	0.0395	0.0361	0.0472	0.0131
	¹⁴ C-AMPA	0.007	0.003 0.003	0.017	0.007 0.005	0.044	0.012 0.006

b) 砂耕栽培；砂耕栽培における¹⁴C標識グリホサートの植物への吸収を表7に示した。土壌処理と同様に砂耕栽培におけるグリホサートの吸収は少なく、ダイズ、ワタ、コムギでは、18日間での吸収率は、1%以下であった。また、トウモロコシだけが、地上部へ11.3%の吸収を示した。

表7 砂耕栽培におけるグリホサートの植物中への吸収

植 物	砂耕栽培処理における ¹⁴ C吸収率 [処理量に対する割合 (%)]					
	4 日		10 日		18 日	
	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
ダイズ	0.03		0.02		0.07	0.22
コムギ	0.09		0.16		0.03	0.37
ワタ	0.09		0.06		0.03	0.16
トウモロコシ	0.87	2.73	1.45	0.49	11.29	2.24

c) 予備水耕栽培；予備水耕栽培におけるグリホサートの植物への吸収を表8に示した。ダイズ、コムギ、ワタ、トウモロコシに対する3日間の処理における地上部への吸収移行率は、それぞれ処理量の1.7、26.2、33.4、19.0%であった。これらの吸収量は土壌処理及び砂耕栽培の4週間及び18日後で観察された吸収量の約2~3桁大きい値であった。従って、これ以降の吸収・代謝試験は水耕栽培による試験によって行われた。

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。

表 8 予備水耕栽培におけるグリホサートの植物中への吸収

植 物	処理 3 日後における ^{14}C 吸収率 [処理量に対する割合 (%)]	
	地上部	根部
ダイズ	1.66	1.75
コムギ	26.21	7.24
ワタ	33.40	10.09
トウモロコシ	19.0	7.31

d) 薬害試験；水耕栽培における薬害試験を行い、植物の旺盛な生育と同時に良好なグリホサートの吸収を示す薬剤濃度を検討した。その結果、最適濃度はトウモロコシ、コムギは 0.6ppm、ダイズ、ワタにおいては 2.5ppm であった。

2) 水耕栽培吸収試験 (実験 1-11)

a) 水耕栽培によるグリホサートの植物中への吸収

① 水耕液のモニタリング；水耕培養液のモニタリングの結果、処理量の 37~74%が栽培 28 日後の水耕液に残存していた。このことは、土壌・水混合と比較して水耕液中ではグリホサートは安定性が高いことが示された。また、 $\text{Gly-1-}^{14}\text{C}$ -グリホサート (実験 3) 及び $\text{Gly-2-}^{14}\text{C}$ -グリホサート (実験 4) の水耕液中にはいかなる代謝物も検出されなかった。しかし、 $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート含有水耕液 (実験 1、2、5、6、7) では、明らかに分解物が検出され、28 日後では残留放射能の 6~28%が ^{14}C -AMPA であった。

② 吸収移行率；表 9 に各種作物における吸収移行率を示した。全ての作物の地上部における放射能の吸収は 26~28 日の比較期間で、ダイズの吸収試験 (実験 2) の 1.7%からスペクトル特性用試験 (実験 9) の 7.7%と高いものまで広い範囲にあった。根部への吸収は同期間でスペクトル特性用試験 (実験 9) の 5.5%の低いものからワタの吸収試験 (実験 7) の 19.3%の高いものまでの範囲にあった。

吸収期間が 10 日と短期間であったコムギでは、地上部で 2.46%、根部では 2.52%であった。

水耕栽培によるパルス試験では、グリホサートは最初の 6 日間のみでの処理であったため、吸収量は 56 日間の期間中 20 日目で地上部では 0.39%であったがその後経時的に減少し、根部では 12 日目で 2.67%であり、その後減少した。

また、対照区の試験から、明らかに $^{14}\text{CO}_2$ が試験中に放出され、 ^{14}C 標識グリホサート処理植物及び未処理植物で光合成により固定されたことを示していた。このことから、吸収試験におけるトウモロコシ、ワタ、ダイズ中の放射能の約 5%が $^{14}\text{CO}_2$ によるということが示された。

表9 水耕栽培による各種作物における吸収移行率

試験	植物	供試薬剤	部位	吸収移行率 [処理量に対する割合 (%)]					
				6日	12日	20日	28日		
吸収試験	ダイズ (実験1)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	— ^{a)}	—	—	4.19		
			根部	—	—	—	10.80		
	ダイズ (実験2)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	0.93	1.12	1.42	1.71		
			根部	3.68	6.71	9.34	8.64		
	ダイズ (実験3)	Gly-1- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	1.46	1.10	1.56	1.79		
			根部	2.97	6.85	13.88	12.26		
	ダイズ (実験4)	Gly-2- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	0.64	1.21	2.00	2.09		
			根部	4.25	5.30	8.56	10.30		
	トウモロコシ (実験5)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	0.96	3.80	7.01	4.73		
			根部	3.39	8.43	9.74	10.30		
	植物	供試薬剤	部位	6日	10日	20日	28日		
コムギ (実験6)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート		地上部	1.28	2.46	—	—		
			根部	1.39	2.52	—	—		
	植物	供試薬剤	部位	6日	13日	20日	28日		
ワタ (実験7)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート		地上部	0.40	1.28	2.98	2.15		
			根部	1.32	3.43	7.98	19.34		
試験	植物	供試薬剤	部位	6日	12日	20日	26日		
スペクトル 特性用試験	ダイズ (実験9)	CH ₂ - ¹⁴ C/ ¹³ C- グリホサート	地上部	0.41	0.72	4.96	7.70		
			根部	1.71	3.49	3.47	5.48		
試験	植物	供試薬剤	部位	6日	12日	20日	28日	42日	56日
パルス試験	ダイズ (実験10)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	0.28	0.28	0.39	0.25	0.21	0.22
			根部	2.40	2.67	1.96	0.66	1.26	1.38

a) 試料無し

b) 水耕栽培によるグリホサートの植物中での代謝

① 抽出効率；表10にグリホサート処理28日目における植物からの各種溶媒による抽出効率を示した。ほとんどの茎葉試料では植物中に含まれる放射能は水溶媒、室温下、1回で約80% (77.3%~91.8%) が抽出された。さらに0.5N NH₄OH 溶液による抽出では4.2~15.1% が抽出され、両抽出による平均抽出効率は88.3%に増加した。また、0.5N HCl 溶液による抽出は0.4~3.1%であった。このことから、代謝物分析には、水抽出が適切と考えられた。

根部からの水溶媒による抽出は、17.3%から70.0%と差があり、主要な放射能は、0.5N NH₄OH 溶液及び0.5N HCl 溶液で抽出され、3つの溶媒での合計抽出率は81.0% (68.3~88.5%) 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。

表 10 グリホサート処理 28 日目における植物からの各種溶媒による抽出効率

植 物	供試薬剤	部 位	抽出効率 [各部位の総残留量に対する割合 (%)]			
			H ₂ O	0.5N NH ₄ OH	0.5N HCl	合計
ダイズ (実験 1)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	73.2	4.3	2.3	78.9
		根部	42.3	19.5	15.9	77.7
ダイズ (実験 2)	Gly-1- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	80.3	6.2	2.2	88.7
		根部	59.0	13.0	7.3	79.3
ダイズ (実験 3)	Gly-2- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	82.6	4.2	3.1	89.9
		根部	70.9	12.5	5.4	87.9
ダイズ (実験 4)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	91.8	4.4	1.7	97.9
		根部	43.5	18.7	6.1	68.3
トウモロコシ (実験 5)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	81.1	15.1	0.4	96.6
		根部	55.5	21.4	11.6	88.5
コムギ (実験 6)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	77.3	3.6	3.1	84.0
		根部	54.5	16.7	15.0	86.2
ワタ (実験 7)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	89.2	4.7	0.8	94.8
		根部	17.3	27.0	34.6	78.9

② 各作物におけるグリホサート・代謝物の割合；表 11 に経時的な抽出効率とグリホサートとアミノメチルホスホン酸の組成を示した。その結果、植物試料の水抽出効率は経時的試料に特に変化はなかった。このことは、グリホサート及び代謝物が抱合体を形成しないということを示唆していた。

水抽出物についての TLC/ベータカメラ分析により、予備的に植物中の放射能の組成分析を行った。その結果、トウモロコシの茎葉部以外のおもな放射能はグリホサートであった。トウモロコシの茎葉部では、グリホサートに加えてアミノメチルホスホン酸 (AMPA) が 27% 検出された。28 日目のダイズ、トウモロコシ、ワタ及び 10 日目のコムギ試料ではグリホサートが地上部の総残留放射能の 70~85%、28%、70%及び 70%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。

表 11 各作物におけるグリホサート・代謝物の割合

植 物	供試薬剤	部 位	項 目	水抽出物及びそのグリホサート代謝物の割合 [各部位の総残留量に対する割合 (%)]			
				6 日	12 日	20 日	28 日
タ イ ス (実験 2)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	69.2	70.8	82.3	80.3
			グリホサート	NM ^{a)}	65.4	78.5	70.3
			AMPA	NM	5.4	3.8	5.1
		根 部	水抽出物	37.6	59.7	54.3	59.0
			グリホサート	29.3	54.1	50.2	44.3
			AMPA	2.3	5.6	3.5	1.4
タ イ ス (実験 3)	Gly-1- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	53.1	65.8	69.6	82.6
			グリホサート	53.1	65.8	69.6	82.6
			AMPA	0.0	0.0	0.0	0.0
		根 部	水抽出物	35.0	73.0	59.3	65.0
			グリホサート	35.0	73.0	59.3	65.0
			AMPA	0.0	0.0	0.0	0.0
タ イ ス (実験 4)	Gly-2- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	66.8	78.6	73.9	91.8
			グリホサート	66.8	78.6	71.6	85.5
			AMPA	0.0	0.0	0.0	0.0
		根 部	水抽出物	38.4	62.2	41.5	43.5
			グリホサート	30.3	53.7	28.3	21.5
			AMPA	0.0	0.0	0.0	0.0
トウモロコシ (実験 5)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	70.6	73.8	71.4	81.1
			グリホサート	70.6	19.7	23.7	28.1
			AMPA	0.0	16.2	22.2	27.0
		根 部	水抽出物	68.6	66.7	99.5	55.5
			グリホサート	61.1	56.6	45.5	40.8
			AMPA	7.4	10.1	8.4	8.0
作 物	供試薬剤	部 位	項 目	6 日	10 日	20 日	28 日
コメ (実験 6)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	77.3	77.3	— ^{b)}	—
			グリホサート	69.3	70.7	—	—
			AMPA	8.3	6.6	—	—
		根 部	水抽出物	42.3	54.5	—	—
			グリホサート	33.5	38.5	—	—
			AMPA	8.8	5.2	—	—
作 物	供試薬剤	部 位	項 目	6 日	13 日	20 日	28 日
ワタ (実験 7)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	水抽出物	73.8	84.6	78.8	89.2
			グリホサート	73.8	80.0	70.8	70.5
			AMPA	0.0	4.6	5.3	8.0
		根 部	水抽出物	51.2	30.8	32.8	17.3
			グリホサート	38.8	21.3	24.5	11.1
			AMPA	8.9	4.2	4.4	3.0

a) 未測定

b) 試料無し

- ③ グリホサート水耕栽培処理における実験終了時での作物中の放射能組成；表 12 に実験終了時における植物抽出物を各種カラムで分画・分離して、代謝物量を調べた結果を示した。この方法で検出されたグリホサート及びアミノメチルホスホン酸は水抽出物の直接的 TLC/

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。

ベータカメラ分析の結果（表 11）と良く一致した。

CH₂-¹⁴C-グリホサートで処理した作物茎葉部の主要な代謝物として、ダイズ、コムギ、ワタでは、アミノメチルホスホン酸が4~9%であったが、トウモロコシでは28%生成した。また、N-メチルアミノメチルホスホン酸（MAMPA）も検出されたが、ここで検出されたN-メチルアミノメチルホスホン酸はスペクトル特性用試験（実験9）では、事前にアミノメチルホスホン酸とN-メチルアミノメチルホスホン酸が除去されていた薬剤を使用し、この試験ではN-メチルアミノメチルホスホン酸は検出されなかった。従って、吸収試験で検出されたN-メチルアミノメチルホスホン酸はおそらく人為的と考えられる（生成しているとしても少なくとも1%以下）。

さらに、Atkins 及び Canvin の方法により、各作物について ¹⁴C 標識グリホサート由来の放射能の天然物への取り込み割合を調べた結果、ダイズでは、3種の ¹⁴C 標識グリホサートの中で Gly-2-¹⁴C-グリホサート（実験4）の天然物への取り込み量が最も高かった（地上部中放射能の14.2%）。またワタ、トウモロコシ、コムギの地上部でも CH₂-¹⁴C-グリホサートの放射能が天然物へそれぞれ8.2、4.0、1.0%の取り込みがみられた。

実験1と実験9の茎葉部試料について、グリホサート及び代謝物を図3の方法で分離精製した。その結果、AG-50W-X8(H⁺)、AG-1-X8(HCO₃⁻)、Bio-Gel P-2 及び TLC などのクロマトグラフ上の挙動並びに ¹³C-NMR (¹H-でカップリング) スペクトル、トリ-n-ブチル N-トルフルオロアセチル誘導体の GC/MS により、親化合物であるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸であることを確認した。

表 12 グリホサート水耕栽培処理における実験終了時での作物中の放射能組成

植 物	標識化合物	部 位	グリホサート・代謝物の組成 [各部位の総残留量に対する割合 (%)]						
			抽出物	非抽出物	グリホサート	AMPA	MAMPA	天然物 ^{a)}	その他 ^{b)}
ダイズ (実験2)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	90.5	9.5	69.2	9.0	1.1	9.0	2.3
		根部	43.7	56.3	37.3	3.1	0.3	1.4	1.6
ダイズ (実験3)	Gly-1- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	75.5	24.5	57.1	ND ^{c)}	ND	4.2	14.3
		根部	58.7	41.3	57.1	ND	ND	1.3	0.4
ダイズ (実験4)	Gly-2- ¹⁴ C- グリホサート	地上部	82.6	17.4	48.8	ND	ND	14.2	19.6
		根部	37.0	63.0	21.8	ND	0.4	10.6	4.2
トウモロコシ (実験5)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	73.4	26.6	21.1	27.9	0.0	4.0	20.0
		根部	64.3	35.7	46.1	4.4	0.0	2.0	11.8
コムギ (実験6)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	68.5	31.5	55.3	4.2	ND	1.0	8.0
		根部	45.7	54.3	36.1	7.4	ND	1.0	1.3
ワタ (実験7)	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	地上部	90.0	10.0	61.5	6.8	2.0	8.2	10.9
		根部	13.0	87.0	7.6	2.8	0.4	1.1	1.1

a) Atkins 及び Canvin の方法 [Atkins, C. A. and Canvin, D. J., *J. Photosynthetic*, 5, 341 (1971)] で定性・定量されたアミノ酸/ペプチド、中性糖、糖リン酸エステル、有機酸等の天然物品の合計

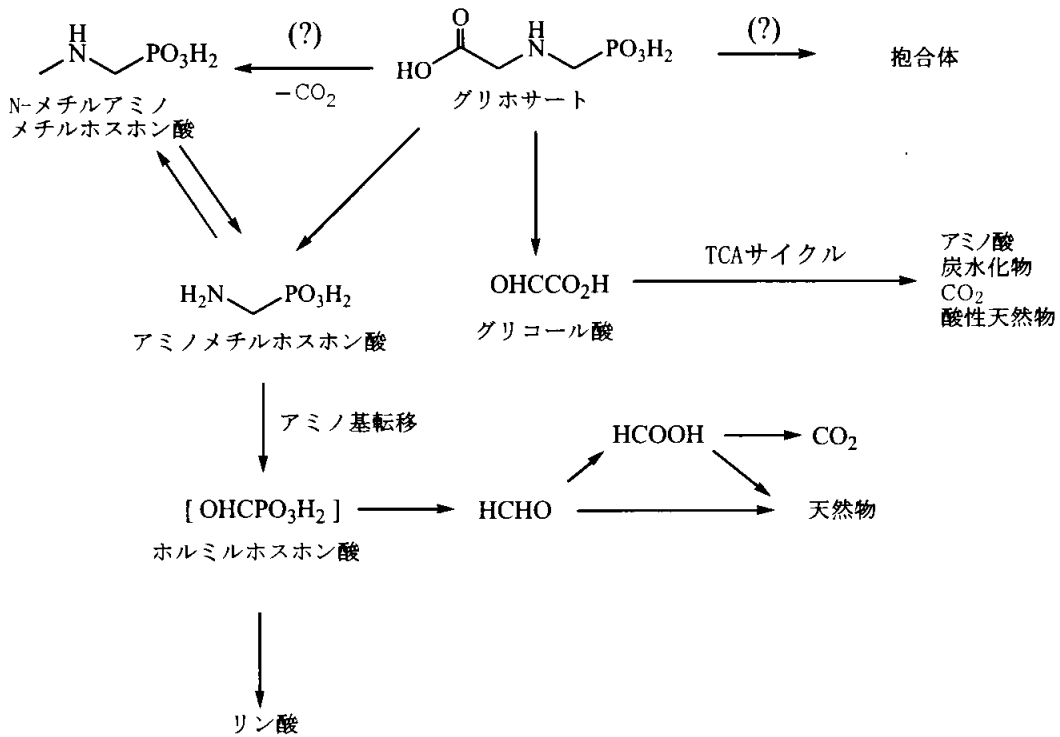
b) Atkins 及び Canvin の天然物検索法におけるカラムクロマトグラフィーでの消失量

c) 不検出

3) グリホサートの代謝経路

図4にグリホサートの想定代謝経路を示した。植物中での主たる代謝物はアミノメチルホスホン酸 (AMPA) である。N-メチルアミノメチルホスホン酸も検出されたが、これは供試 ^{14}C 標識グリホサート中に含まれた不純物による可能性がある。3種の ^{14}C 標識グリホサートの中で Gly-2- ^{14}C -グリホサートの天然物への取り込み量が最も高かったことは、グリホサートから、グリコール酸を生成して、さらにTCAサイクルを経て、天然物に変換されたことが示唆された。また、AMPAはアミノ酸基転移により、ホルミルホスホン酸へ変換され、ホルムアルデヒドおよびギ酸を経由して天然物へ取り込まれたり、無機化 (CO_2 発生) される経路が考えられた。

図4 グリホサートの想定代謝経路



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

(2) グリホサートのブドウ植物体における代謝運命試験

(資料 No. 10-2)

試験機関 :
報告書作成年 : 1974 年

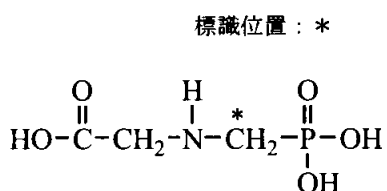
供試標識化合物 :

1) ^{14}C 標識グリホサート [N-(ホスホノメチル)グリシン]

化学名 ; N-phosphonomethylglycine

構造式 ;

(a) $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート ; ホスホノメチル基のメチレン位を ^{13}C または ^{14}C で標識。



試験	^{14}C 標識	
	土壌栽培及び 予備的葉面処理吸収試験	比放射能
	放射化学的純度 ^{a)}	89.9%
水耕栽培試験	比放射能	2.05mCi/mM
	放射化学的純度	97%
大規模葉面処理試験	比放射能	8.06mCi/mM
	放射化学的純度 ^{b)}	98.9%
試験	^{13}C 標識	
スペクトル分析試験	同位体標識純度	90%
	化学的純度	97.7%

- a) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 6.9%
N-メチルアミノメチルホスホン酸 ($\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$) 1.7%
- b) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 0.7%
メチルホスホン酸 ($\text{CH}_3\text{PO}_3\text{H}_2$) 0.4%

2) ^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸 (^{14}C -AMPA)

化学名 ; aminomethylphosphonic acid

構造式 ;



^{14}C 標識	
比放射能	9.23mCi/mM
放射化学的純度	97%以上

供試植物 :

ブドウ : Concord, Sauvignon Blanc, Thompson Seedless の3種

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。

試験方法：

1) 試験材料；

- a) 使用土壌；植物の土壌栽培に用いられた土壌の特性を表1に示した。

表1 使用した土壌の特性

特性	土壌	Norfolk土壌	Ray土壌
土性		砂壤土	微砂壤土
有機物含量 (%)		1.0	1.0
砂 (%)		86.0	6.0
シルト (%)		11	82.3
粘土 (%)		2.3	0.6
pH		5.7	6.5

- b) 栄養培地；土壌栽培では、下記の栄養培地の各液 a (24mL)、b (120mL)、c (120mL)、d (96mL)、e (36mL)、及び f (48mL) を砂耕栽培用には水道水、水耕栽培には蒸留水で希釈し、6 ガロン (約 22.8L) に定容した。pH は硝酸あるいは水酸化アンモニウムで 4.7 に調節した。

栄養培地組成
a) 1M KH_2PO_4 (131.1g/L)
b) 1M KNO_3 (101.1g/L)
c) 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (236.16g/L)
d) 1M MgSO_4 (120.4g/L)
e) 1M 鉄封鎖剤330 (10g/L)
f) 微量栄養素液 [H_3BO_3 (2.86g/L)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81g/L)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22g/L)、 CuSO_4 (0.05g/L)、 $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02g/L)]

- c) ブドウ植物体の栄養培地液；ブドウ植物体の栄養培地液は下記の溶液1 (4mL) と溶液2 (1mL) を蒸留水で 1000mL 希釈して調製した。

ブドウ植物体の栄養培地液組成	
溶液1	conc. HNO_3 (2.7mL)、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (3.0g)、conc. H_2SO_4 (0.32mL)、1M HCl (11.0mL)、85% H_3PO_4 (0.48mL)、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (1.2g)、1M NaOH (17.8mL)、1M KOH (21.0mL) を1000mLに定容し、硝酸でpH6.0に調製
溶液2	CuSO_4 (25.1mg)、 $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4.0mg)、 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (307.0mg)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4.3mg)、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (23.3mg)、 H_3BO_3 (34.4mg)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (44.0mg)、 H_2MoO_4 (5.3mg) を1000mLに定容

2) 処理方法；

- a) 各種処理方法による植物への吸収試験；土壌栽培された植物に対して土壌処理、主枝あるいは葉面塗布により ^{14}C 標識グリホサートあるいは ^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸 (土壌処理のみ) を処理した。また同様に水耕法においては根部を水耕液に漬けた。一定の栽培期間の後、試料を採取し、採取した各試料は凍結乾燥、粉碎燃焼後、LSC で植物体中の総残留放射能を測定し、各種処理方法における植物体への吸収及び各部位別の吸収移行率を経時的に調べ、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日本モンサント株式会社にある。

した。

処理量の設定根拠；グリホサートのブドウ植物体に対する最大慣行施用量として 3.36kg ae/ha を選択した。(ae とはグリホサート酸換算の薬量)

各処理及び試料採取方法は表 2 の通りである。

表2 土壌栽培における土壌、主枝、葉面処理及び水耕栽培によるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸の吸収試験における薬剤処理と試料採取方法

栽培方法	使用品種	処理部位	供試化合物	処理量	植物数	試験内容	試料採取	採取時期
土壌栽培	Concord 種 及び Sauvignon Blanc 種	土壌	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	8.2mg/ポット (3.36kg ae/ha) ^{a)}	2本	吸収 移行	地上部全体 ^{c)} 、 (枯葉) ^{d)}	処理 42、84 日後
			¹⁴ C-AMPA	4.1mg/ポット (1.68kg/ha) ^{a)}	2本	吸収 移行	地上部全体 ^{c)} 、 (枯葉) ^{d)}	
	主枝 ^{b)}	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	0.40mg/本	2本	吸収 移行	地上部全体 ^{c)} 、 処理した主枝、 (枯葉、果実) ^{d)}		
		無処理	—	—	2本	吸収 移行	地上部全体 ^{c)}	
土壌栽培	Concord 種	葉面	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	16 μg/本	2本	吸収 移行	処理葉、 処理葉の上方の葉と枝、 処理葉の下方の葉と枝、 処理葉に隣接する枝、 処理葉に隣接しない主枝 及び新梢、 根	処理 7、26 日後
水耕栽培	Concord 種	根部	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	5、10、20、40ppm	12本	吸収 移行	根、主枝、枝、葉	処理 10、21、 42 日後
		無処理	—	—	3本	吸収 移行		

a) 休眠終了約 4 週間経過後に処理

b) 処理部をポリエチレンチューブあるいはプラスチックのポットでカバー

c) 植物を地表面 1 インチの部分で切り取った

d) 採取可能な場合は採取

ae とはグリホサート酸換算の薬量

b) 植物への大規模吸収代謝試験及び代謝研究；各種ブドウ植物体への葉面処理による吸収代謝試験を実施した。作物は28日間生育させ、試料を採取した。各処理及び試料採取方法は表3の通りである。

葉面処理による吸収代謝試験では砂耕栽培の植物を使用し、その栄養培地は、土壌処理と同様の培地を使用した。葉面処理は葉 6 枚に 120 μg 塗布処理し、7、14、28 日後に処理葉、処理葉の上方の新梢、処理葉付近の下方の葉と枝、主枝と根試料採取した。葉面パルス処理試験では連続処理と同様に処理し、7 日後に処理葉を取り除き、その後 70 日まで生育させた。

試料は処理葉、処理葉の上方の新梢、処理葉付近の下方の葉と枝、主枝と根を採取し、各試

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。

料は冷凍保存した。

スペクトル分析用試験では、 $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート及び $\text{CH}_2\text{-}^{13}\text{C}$ -グリホサートの混合物を処理して、28日後に処理葉とその上方の枝試料を採取した。

表3 葉面処理によるグリホサートの大規模吸収試験と代謝研究における薬剤処理と試料採取方法

試験	使用植物	供試化合物	処理量	植物数 (無処理本数)	試験内容	試料採取	採取時期
葉面処理 吸収代謝試験 (実験 1-3)	Concord 種 ^{b)} (実験 1)	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ - グリホサート	120 μg /本	12 本 (2 本)	吸収・ 代謝	処理葉、 処理葉の上方の新梢、 処理葉付近の下方の葉と枝、 果実、主枝と根	処理 7、14、28 日後
	Sauvignon Blanc 種 ^{c)} (実験 2)	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ - グリホサート	120 μg /本	12 本 (2 本)	吸収・ 代謝	処理葉、 処理葉の上方の新梢、 処理葉付近の下方の葉と枝、 果実、主枝と根	処理 7、14、28 日後
	Tompson Seedless 種 ^{d)} (実験 3)	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ - グリホサート	60 μg /本	12 本 (2 本)	吸収・ 代謝	処理葉、 処理葉の上方の新梢、 処理葉付近の下方の葉と枝、 果実、主枝と根	処理 7、14、28 日後
葉面パルス 処理試験 ^{a)} (実験 4)	Concord 種 ^{e)}	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ - グリホサート	120 μg /本	24 本 (6 本)	吸収・ 代謝	処理葉、 処理葉の上方の新梢、 主枝と根	処理 7、14、28、42、 56、70 日後
スペクトル 分析試料用 試験(実験 5)	Concord 種 ^{f)}	$\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ - グリホサート $\text{CH}_2\text{-}^{13}\text{C}$ - グリホサート	180 μg /本	150 本	吸収・ 代謝	処理葉とその上方の枝	処理 28 日後

- a) 7 日後に処理葉を除去
 b) 休眠後 3 週間砂耕栽培後の 1 年生の根付き挿木
 c) 休眠していない 8 週間砂耕栽培後の根付きの挿木
 d) 砂耕栽培
 e) 3 週間砂耕栽培
 f) 植物は Ray 微砂壤土を用いて栽培

3) 分析方法；

a) 総残留放射能 (TRR) の測定；

試料は凍結乾燥後、粉碎した均一化試料の一部を燃焼処理後 LSC 測定した。

b) グリホサート・代謝物の分離精製；

グリホサート代謝物の定性・定量 (実験 1-4) のため、試料を水あるいは 0.5N アンモニア水と攪拌抽出後、AG-50W-X8 (200~400mesh、 H^+ 型) 及び AG-1-X8 (200~400mesh、 HCO_3^- 型) イオン交換樹脂で分離精製し、TLC/ベータカメラ及び LSC で定性・定量をおこなった。その分離精製方法を図 1 (1-A、1-B、1-C) に示した。

スペクトル分析試料 (実験 5) では、試料を水で攪拌抽出後、AG-50W-X8 (200~400mesh、 H^+ 型)、AG-1-X8 (200~400mesh、 HCO_3^- 型)、Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーにより精製した後、グリホサート及びその代謝物を無水トリフルオロ酢酸、次いでジアゾ-n-ブタン/エーテル溶液と反応させて誘導体化し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、GLPC、GC/MS で分析した。図 1-D にグリホサート代謝物の分離精製方法を示す。

図1 分離精製法

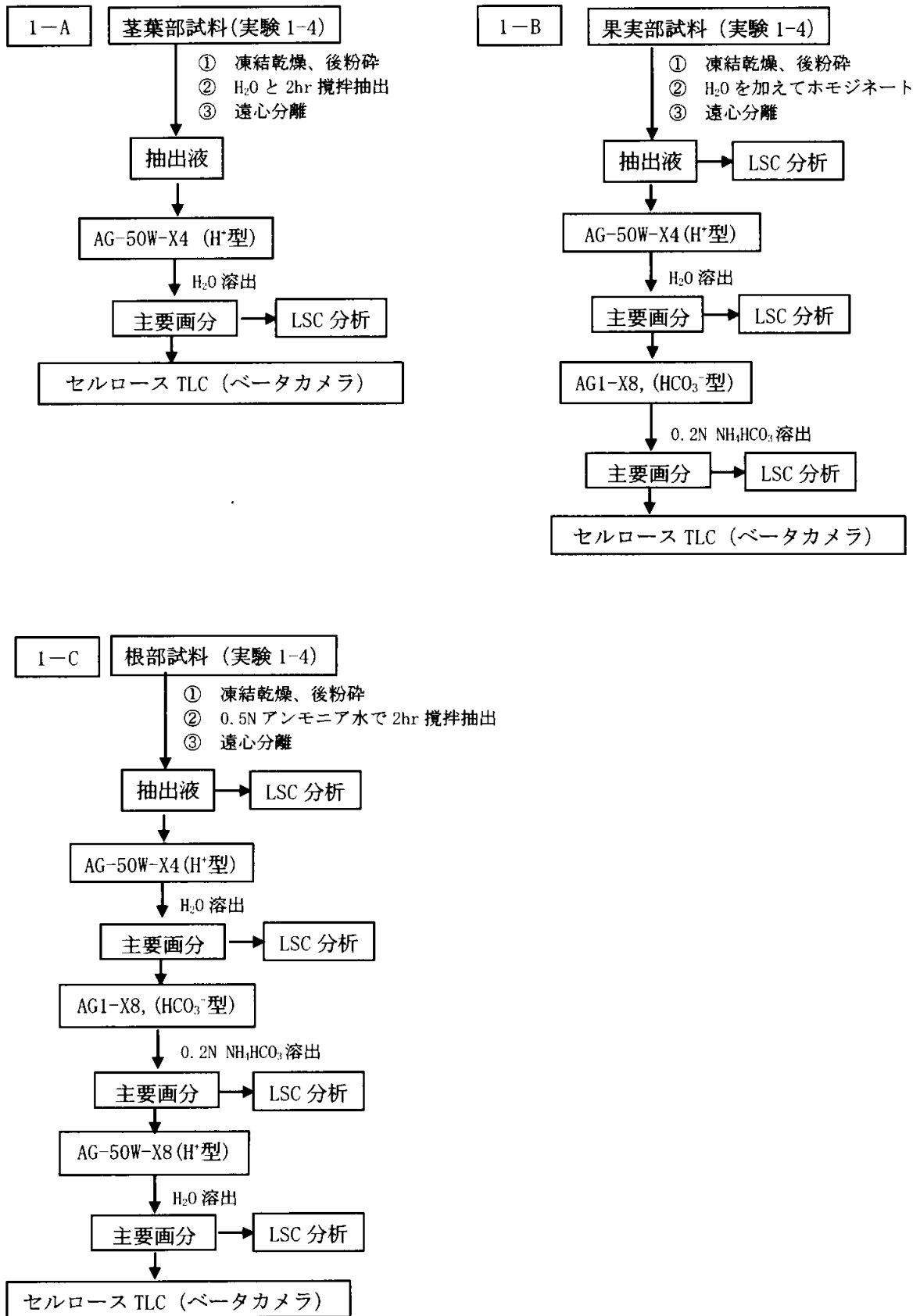
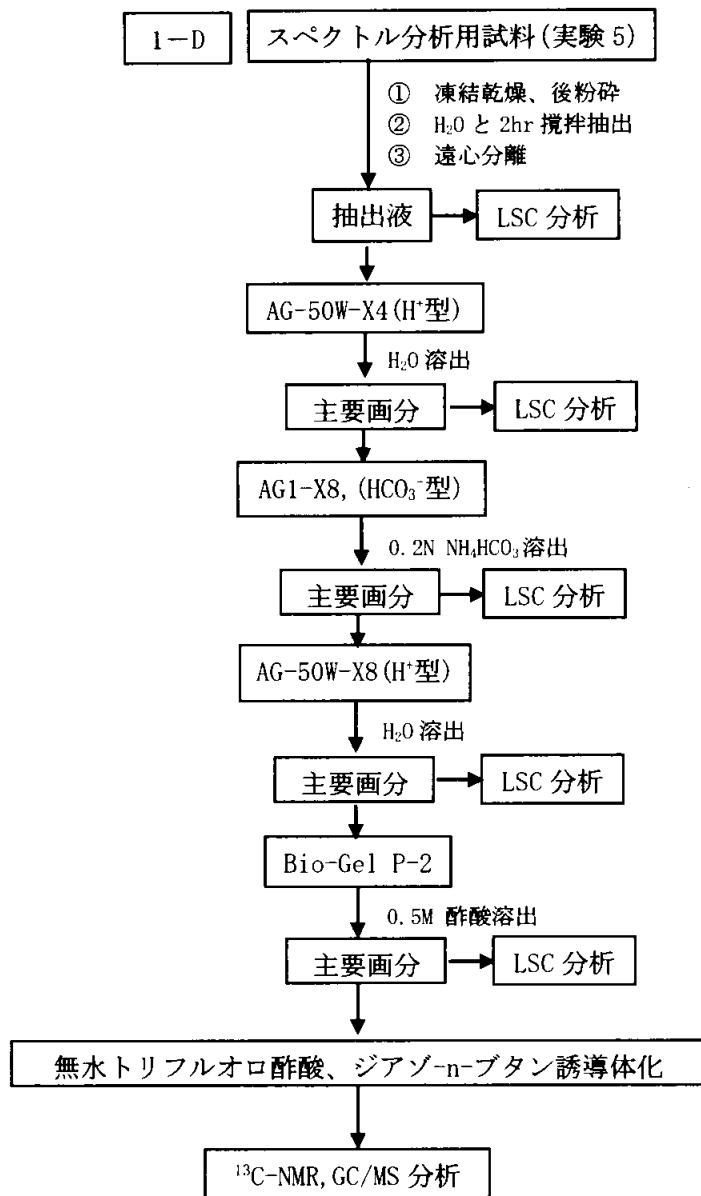


図1 分離精製法 (続き)



結 果：

1) 土壤栽培及び水耕栽培におけるグリホサートのブドウ植物体におけるの吸収試験

作物の土壤栽培における土壤処理、葉面処理、主枝処理及び水耕栽培の4種の処理方法の比較を行った(表4、5)。土壤に対するグリホサート及びアミノメチルホスホン酸処理では、処理84日後でも主枝への吸収率はグリホサート及びアミノメチルホスホン酸とも処理量の0.12%以下であった。対照区も有意な放射能を示したが、これは¹⁴C標識グリホサートの土壤処理により発生した¹⁴CO₂の固定によるものであった。主枝処理でも吸収量は少なく、処理84日で主枝へ1.57%、処理42日で果実へ0.0026%と低い吸収移行率であった。一方、葉面処理においては、処理された¹⁴C標識グリホサートの16.2%が、処理後7日間に処理葉とその上方の枝に吸収移行したが、処理後26日では9.24%であった。また根部へは処理後26日で8%吸収移行した。

水耕法では10~42日間の連続処理で、根へ4.73~18.66%の吸収がみられたが、主枝、枝、葉への吸収移行率は処理量の1%以下であった。

以上の結果、地上部への吸収移行率の最も高かったのは葉面処理であった。

表4 土壤栽培におけるグリホサートのブドウ植物体への吸収移行率の比較

処理法	供試化合物	検査部位	¹⁴ C 吸収率 [処理量に対する割合 (%)]			
			Concord 種		Sauvignon Blanc 種	
			42 日	84 日	42 日	84 日
対照	無し	主枝	0.031	0.041	0.061	0.066
土壤処理	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	主枝	0.067	0.083	0.075	0.078
		枯葉	0.087	-	-	-
	¹⁴ C-AMPA	主枝	0.068	0.12	0.094	0.049
		枯葉	0.006	-	-	-
主枝処理	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	果実	-	-	0.0053	-
		主枝	0.738	0.98	0.267	1.57
		処理枝	82.72	67.12	93.3	34.31
		枯葉	0.13	-	-	-
葉面塗布処理	CH ₂ - ¹⁴ C- グリホサート	果実	-	-	0.0026	-
		検査部位	7 日	26 日		
		処理葉	-	101.86		
		処理葉に隣接する枝	-	1.24		
		処理葉と隣接する枝	100	-		
		処理葉とその上方の枝	16.2	9.24		
		処理葉とその下方の枝	0.5	0.41		
主枝を含む処理葉に隣接しない新梢	1.4	5.74				
根		8.00				

- は試料無しを示す

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

表5 Concord種ブドウ植物体における水耕栽培によるグリホサートの吸収移行

処理濃度	検査部位	水耕処理による放射能吸収率[処理量に対する割合(%)]		
		10日	21日	42日
5ppm	根	9.82	15.03	12.37
	主枝	0.04	0.09	0.09
	枝	0.05	0.13	0.37
	葉	0.12	0.21	0.21
	水耕液	70.14	42.3	56.90
	洗浄液	2.51	2.6	2.5
10ppm	根	6.45	7.77	18.66
	主枝	0.04	0.04	0.07
	枝	0.03	0.07	0.29
	葉	0.07	0.16	0.21
	水耕液	75.69	67.5	41.4
	洗浄液	1.42	2.6	4.5
20ppm	根	6.91	6.00	9.12
	主枝	0.02	0.13	0.07
	枝	0.04	0.06	0.13
	葉	0.09	0.13	0.19
	水耕液	78.40	78.3	67.9
	洗浄液	2.32	1.3	1.7
40ppm	根	4.73	10.15	14.67
	主枝	0.09	0.06	0.19
	枝	0.06	0.10	0.14
	葉	0.11	0.20	0.30
	水耕液	87.11	64.2	63.4
	洗浄液	2.11	3.6	2.9

2) 葉面処理による各品種におけるグリホサートの吸収試験及び代謝研究

a) グリホサートの吸収移行率；葉面処理によるグリホサートの吸収移行率を表6に示した。葉面処理において、処理した供試化合物の大部分は、処理葉に残存していた。また吸収・移行した放射能は処理葉の上方の新梢と根部に認められた。果実が生成した場合は、放射能の移行は果実にも認められた。葉面の処理7日後のサンプリングにおける総放射能の回収率は非常に良好であった(79.7~97.3%)。

対照区の植物にも少量(大部分は~0.5%)の ^{14}C を含んでいた。この ^{14}C はおそらく葉の表面の親化合物の微生物分解、植物代謝及び本試験や過去の試験などの雑多な汚染に基づくものと考えられる。

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6 各品種における葉面処理によるグリホサートの吸収移行率

品 種	検査部位	葉面処理による ¹⁴ C 吸収移行率 [処理量に対する割合(%)]					
		7日	14日	28日	42日	56日	70日
Concord 種 (実験1)	処理葉	72.2	60.9	54.9			
	処理葉の上方の新梢	8.7	6.8	4.9			
	処理葉付近の下方の葉と枝	0.5	0.5	0.7			
	枝・根	15.9	7.9	18.8			
	果実	-	-	0.004			
	対照区	-	-	0.63			
Sauvignon Blanc 種 (実験2)	処理葉	57.8	62.9	46.7			
	処理葉の上方の新梢	0.8	3.1	1.6			
	処理葉付近の下方の葉と枝	0.8	3.5	0.7			
	枝・根	33.4	12.8	16.2			
	果実	-	-	0.7			
	対照区	-	-	0.69			
Tompson Seedless 種 (実験3)	処理葉	65.4	57.7	43.3			
	処理葉の上方の新梢	1.1	5.0	0.7			
	処理葉付近の下方の葉と枝	0.4	0.8	0.3			
	枝・根	12.8	12.1	11.8			
	果実	-	-	-			
	対照区	-	-	0.38			
Concord 種 (パルス処理) (実験4)	処理葉	71.5	70.1	62.7	77.1	80.9	71.3
	処理葉の上方の新梢	4.9	11.5	3.9	3.6	4.1	8.1
	枝・根	14.4	23.4	16.2	11.7	6.7	8.2
	対照区	0.12	0.28	0.48	0.35	0.25	2.03

- は試料無しを示す

b) 各種の植物における水抽出性及び残留放射能

植物における水抽出性を表7に示した。葉面塗布処理における吸収代謝試験において、処理葉、新梢試料では、含有放射能の平均91.8% (72.4~105.1%) が室温で水によって抽出された。また、処理植物の一部に着果したが、それらの抽出率は64.6%、88.0%であった。根部試料では地上部試料に比較して水での抽出性が低かったが、0.5M アンモニア水で室温2時間で効率よく抽出された。

代謝物の分析の結果、処理葉、新梢、根部、果実中の抽出物に含まれる主な代謝物は親化合物のグリホサートであり、他の有意な代謝物は検出されなかった。処理葉ではアミノメチルホスホン酸 (AMPA) 及びN-メチルアミノメチルホスホン酸 (MAMPA) が合計で1.5~9.2%検出された。このことは、おそらく葉面上における微生物による分解と考えられる。また、新梢、根部、果実にも1%程度検出されたが、これは、植物による代謝とも考えられるが、処理葉上での分解物の吸収あるいは、供試化合物中の不純物である確率が高い。

葉面に7日間だけグリホサートを処理したパルス試験では、グリホサートの顕著な減少は見

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。

られなかった。このことから、グリホサートはブドウ植物体中では検知可能な分解は認められなかった。

表7 各作物における水抽出物及びグリホサート・代謝物の割合

検査部位	項目	水抽出物及びそのグリホサート代謝物の割合 [各部位の総残留量に対する割合 (%)]								
		Concord 種 (実験 1)			Sauvignon Blanc 種 (実験 2)			Tompson Seedless 種 (実験 3)		
		7 日	14 日	28 日	7 日	14 日	28 日	7 日	14 日	28 日
処理葉	水抽出物	78.7	72.0	83.2	90.5	91.1	93.5	101.1	89.6	72.4
	グリホサート	74.8	70.5	78.4	87.7	88.2	84.3	97.1	89.6	70.6
	AMPA/MAMPA ^{a)}	3.9	1.5	4.4	2.8	2.9	9.2	ND	ND	1.8
	その他	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
新梢	水抽出物	78.3	82.9	105.1	112.1	95.5	103.3	98.0	102.1	94.4
	グリホサート	74.3	78.1	100.5	103.1	80.1	84.3	88.5	89.3	74.4
	AMPA/MAMPA ^{a)}	ND	ND	ND	ND	~1.0	~2.0	1.2	≤2.0	≤1.0
	その他	3.27	4.15	~1.0	7.93	7.79	7.08	1.7	6.26	9.66
果実	水抽出物	-	-	64.6	-	-	88.0	-	-	-
	グリホサート	-	-	64.6	-	-	79.5	-	-	-
	AMPA/MAMPA ^{a)}	-	-	ND	-	-	<1.0	-	-	-
	その他	-	-	ND	-	-	6.9	-	-	-
根及び古い枝	水抽出物	-	-	87.6	-	-	90.2	-	-	87.7
	グリホサート	-	-	87.6	-	-	90.2	-	-	87.7
	AMPA/MAMPA ^{a)}	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND
	その他	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND
検査部位	項目	Concord 種 (パルス試験) (実験 4)								
		7 日	14 日	28 日	42 日	56 日	70 日			
処理葉	水抽出物	89.0	96.3	-	-	-	-			
	グリホサート	85.6	93.8	-	-	-	-			
	AMPA/MAMPA ^{a)}	3.4	2.5	-	-	-	-			
	その他	ND	ND	-	-	-	-			
新梢	水抽出物	107.6	89.8	90.5	89.7	82.0	65.1			
	グリホサート	98.6	82.9	77.1	82.8	70.4	58.5			
	AMPA/MAMPA ^{a)}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0			
	その他	5.7	4.1	5.3	1.2	5.0	4.8			

ND は不検出を示す

- は試料無しを示す

a) アミノメチルホスホン酸 (AMPA) と N-メチルアミノメチルホスホン酸 (MAMPA) を分離して定量することは困難であったため、合計量を示す

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

通常の農業慣行で使用する間に、ブドウ植物体に取り込まれるグリホサートは、下表のような残留分布を示すと考えられる。

表 8 残留放射能の一般的組成

植物部位	グリホサート	AMPA 及び MAMPA の合計	天然物	抽出不能放射能
葉と枝	75~95	<2	<5	5~20
果実	65~80	<1	<5	10~30
根及び古い枝	85~90	<1	<5	10~15

c) 残留放射能の同定

代謝物調製試験において、 ^{14}C 及び ^{13}C 標識グリホサートの葉面処理により得られた残留放射能を図 1 の 1-D の方法で分離精製し、分析した。その結果、AG-50W-X8 (H^+ 型)、AG-1-X8 (HCO_3^- 型)、Bio-Gel P-2 及び TLC などのクロマトグラフ上の挙動並びに ^{13}C -NMR (^1H -でカップリング) スペクトル、トリ-n-ブチル N-トルフルオロアセチル誘導体の GC/MS により、回収放射能の大部分が親化合物であるグリホサートであることを確認した。また、パルス実験を除き AMPA あるいは MAMPA を合計してほぼ総放射能の 1~2% 未満が代謝物として同定されたにすぎない。検出された AMPA/MAMPA の量は ^{14}C 標識化合物に存在した量と同等であったので、これらは、植物による代謝物ではないと考えられる。

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。

(3) グリホサートのリンゴにおける代謝運命試験

(資料 No. 10-3)

試験機関 :
報告書作成年 : 1974 年

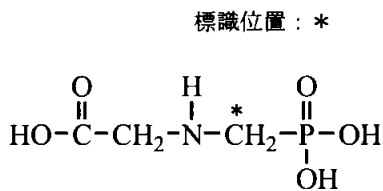
供試標識化合物 :

1) ^{14}C 標識グリホサート [N-(ホスホノメチル)グリシン]

化学名 ; N-phosphonomethylglycine

構造式 ;

(a) $\text{CH}_2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリホサート ; ホスホノメチル基のメチレン位を ^{13}C または ^{14}C で標識。



試験	^{14}C 標識	
	土壌処理	比放射能
放射化学的純度 ^{a)}		98%
幹及び予備的葉面処理	比放射能	8.06mCi/mM
	放射化学的純度 ^{b)}	96.0%
大規模葉面処理	比放射能	9.07mCi/mM
	放射化学的純度 ^{c)}	94.8%
試験	^{13}C 標識	
スペクトル分析用	同位体標識純度	90%
	化学的純度	97.7%

a) 処理前にカラムクロマトグラフィーで精製

b) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 3.3%

N-メチルアミノメチルホスホン酸 ($\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$) 0.6% ;
処理前にカラムクロマトグラフィーで精製

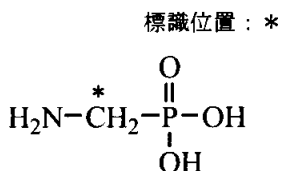
c) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 3.7% ;

N-メチルアミノメチルホスホン酸 ($\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$) 1.5% ;
処理前にカラムクロマトグラフィーで精製

2) ^{14}C 標識アミノメチルホスホン酸 (^{14}C -AMPA)

化学名 ; aminomethylphosphonic acid

構造式 ;



試験	^{14}C 標識	
土壌処理	比放射能	8.90mCi/mM
	化学的純度	97%以上

供試植物 :

リンゴ : Golden Delicious 矮小種

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。

試験方法：

1) 処理方法；各処理及び試料採取方法は表1の通りである。

処理量の設定根拠；グリホサートのリンゴに対する最大慣行施用量として 3.36kg ae/ha を選択した。(ae とはグリホサート酸換算の薬量)

表1 各種試験のグリホサート及びアミノメチルホスホン酸による薬剤処理と試料採取方法

処理方法	供試化合物	処理量	植物数	試験内容	試料採取	採取時期
土壌 ^{a)}	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	21.45mg/ポット (3.36kg ae/ha) ^{a)}	2本	吸収移行	茎葉部、幹枝部	処理42、84日後
	¹⁴ C-AMPA	10.67mg/ポット (1.68kg/ha)	2本	吸収移行	茎葉部、幹枝部	
	無処理	—	2本	吸収移行	茎葉部、幹枝部	
幹 ^{b)}	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	92.4 μg/本	2本	吸収移行	茎葉部、処理幹部、非処理幹枝部、根部	処理42日後
葉面(予備) ^{b)}	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	5 μg/本	2本	吸収移行	処理葉、処理葉上部新生長部、その他の新生長部、枝・幹部、根部	処理7、21日後
葉面(大規模)	CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	5.356 μg/本	32本 ^{c)}	吸収・代謝	処理葉、処理葉上部新生長部、その他の新生長部、枝・幹部、根部	処理7、21、28、49、70日後

a) Drummer 埴壤土で栽培。

b) Ray 微砂壤土で栽培。

c) 28日目でスペクトル分析用に24本採取

ae とはグリホサート酸換算の薬量

a) 土壌処理吸収試験；

休眠終了6週間後のリンゴの苗木1本をDrummer 埴壤土が入った5ガロンスチール缶に植え付け、¹⁴C 標識グリホサートを 21.45mg/鉢 (3.36kg ae/ha) あるいは ¹⁴C 標識アミノメチルホスホン酸を 10.67mg/鉢 (1.68kg/ha) それぞれ処理した。試料は、6、12週間後に表土から3インチ上で幹を切り取り、各試料は冷凍保存した。(ae とはグリホサート酸換算の薬量)

植物の土壌栽培に用いられた土壌の特性を表2に示した。

表2 使用した土壌の特性

特性	Ray土壌	Drummer土壌
土性	微砂壤土	埴壤土
有機物含量 (%)	1.0	6.0
粘土 (%)	0.6	36.8
シルト (%)	82.3	55.4
砂 (%)	6.0	2.0
pH	6.5	7.0

また土壌栽培では、下記の栄養培地の各液 a (24mL)、b (120mL)、c (120mL)、d (96mL)、e (36mL)、及び f (48mL) を蒸留水に6ガロン(約22.8L)で希釈したものを用いた。

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

栄養培地組成
a) 1M KH_2PO_4 (131.1g/L)
b) 1M KNO_3 (101.1g/L)
c) 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (236.16g/L)
d) 1M MgSO_4 (120.4g/L)
e) 1M鉄封鎖剤330 (10g/L)
f) 微量栄養素液 [H_3BO_3 (2.86g/L)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81g/L)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22g/L)、 CuSO_4 (0.05g/L)、 $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02g/L)]

b) 幹処理吸収試験

リンゴの苗木1本をRay微砂壤土が入った5ガロンスチール缶に植え付け、 ^{14}C 標識グリホサートを幹部に92.4 μg /樹で処理した。幹処理部には周囲にプラスチックポットをかぶせシールドした。試料は、42日後に採取し、茎葉部、処理幹部、非処理幹枝部、根部の各試料は冷凍保存した。

c) 予備的葉面処理試験

リンゴの苗木1本をRay微砂壤土が入った5ガロンスチール缶に植え付け、 ^{14}C 標識グリホサートを1本につき4枚の葉の両面に5 μg 塗布処理した。試料は、7、21日後に採取し、処理葉、処理葉上部新成長部、枝・幹部、根部の各試料は冷凍保存した。

d) 大規模葉面処理吸収試験

5ガロンスチール缶に植え付けたリンゴ32本に ^{14}C 標識グリホサートを1本につき4枚の葉の両面に5.356 μg 塗布処理した。試料は、処理7、21、28、49、70日後に採取し、処理葉、処理葉上部新成長部、その他の新成長部、枝・幹部、根部の各試料は冷凍保存した。

e) スペクトル分析試験

28日間にわたる大規模葉面処理吸収試験に用いたリンゴ果樹から茎葉部24個体を採取し、40メッシュに粉砕した70gを用いてスペクトル分析に供した。

2) 試験方法；

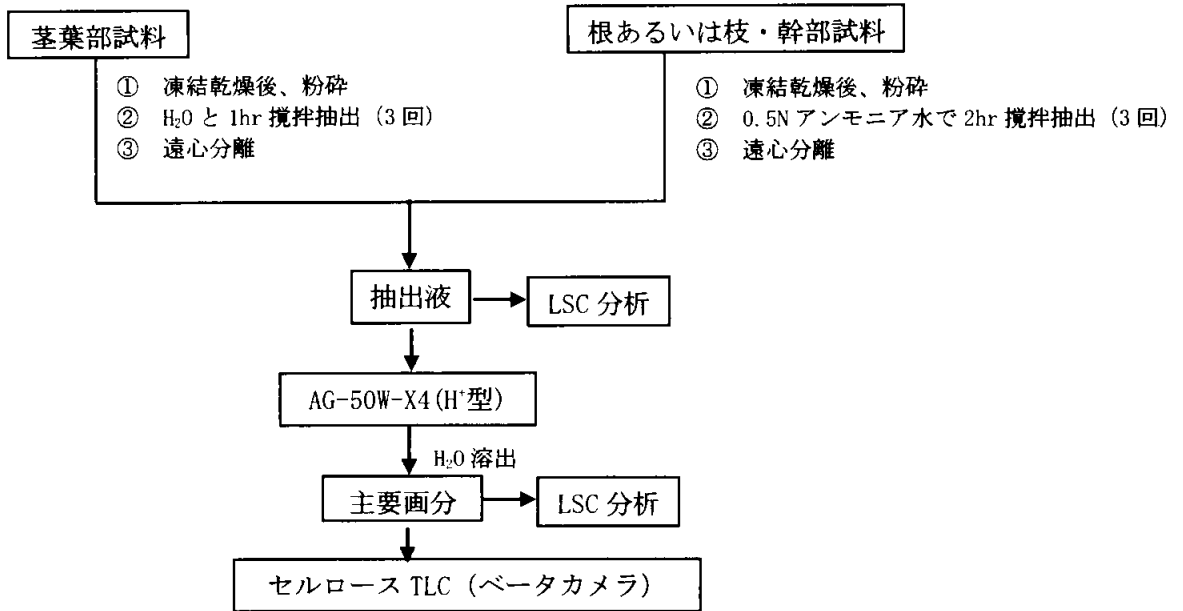
a) 総残留放射能 (TRR) の測定；

試料は凍結乾燥後、粉砕した均一化試料の一部を燃焼処理後LSC測定した。

b) グリホサート・代謝物の分離精製

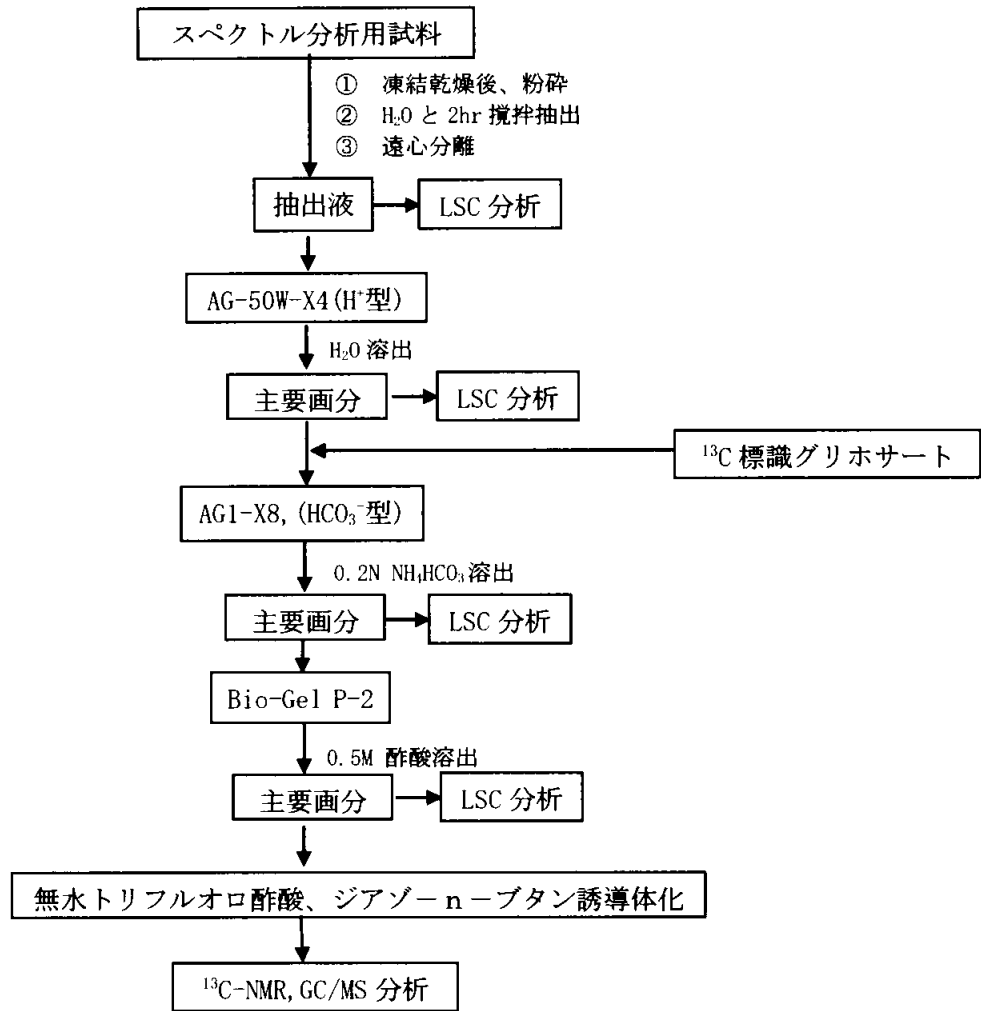
b-1) 大規模葉面処理吸収試験；代謝物の分離精製方法を図1に示した。茎葉部試料は3回蒸留水と1時間室温で攪拌抽出し、遠心分離した (LSC分析)。根あるいは枝・幹部試料については3回0.5Nアンモニア水と2時間室温で攪拌抽出し、遠心分離した (LSC分析)。茎葉部及び根あるいは枝・幹部の抽出液はAG-50W-X4 (20-50mesh、H⁺型、2.4×50cm)カラムで分離精製 (水で溶出) し、主要ピーク画分をプールし、LSC及びTLC/ベータカメラ分析した。

図 1 分離精製法



b-2) スペクトル分析試験；分離精製方法を図 2 に示した。茎葉部試料を水で攪拌抽出後、AG-50W-X8 (200~400mesh、H⁺型)、AG-1-X8 (200~400mesh、HCO₃⁻型)、Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーにより精製した後、グリホサート及びその代謝物を無水トリフルオロ酢酸、次いでジアゾ-n-ブタン/エーテル溶液と反応させて誘導体化し、¹H-NMR、¹³C-NMR、GPLC、GC/MS で分析した。

図2 スペクトル分析用試料の分離精製法



結果：

1) 各種処理法における吸収試験

- a) 土壌処理；表 3 にリンゴによる土壌処理におけるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸の吸収率を示した。その結果、グリホサート及びアミノメチルホスホン酸のいずれの処理においても、土壌処理での吸収率はごく僅かで、茎葉及び幹枝のいずれの部位においても 0.1% 未満であった。無処理の対照区でも多少の取り込みが見られたが、これは ¹⁴C₂ の固定に基づくものであった。

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。

表3 リンゴによる土壌処理におけるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸の吸収率

供試薬剤	検査部位	土壌処理における放射能吸収率 [処理量に対する割合 (%)]	
		42 日	84 日
無処理	茎葉	0.0095	0.020
	幹枝	0.0043	0.009
CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	茎葉	0.0013	0.0020
	幹枝	0.093	0.041
¹⁴ C-AMPA	茎葉	0.0016	0.059
	幹枝	0.0018	0.011

b) 幹処理；表4にリンゴの幹処理におけるグリホサート吸収率を示した。その結果、処理された幹以外の未処理幹、茎葉、根の吸収量の合計は処理量の0.26%と、極めて少なかった。

表4 リンゴの幹処理におけるグリホサートの吸収率

供試薬剤	検査部位	幹処理における放射能吸収率 [処理量に対する割合 (%)]	
		42 日	84 日
CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	処理幹	72.05	
	未処理幹	0.08	
	茎葉	0.08	
	根	0.10	

c) 葉面処理；表5にリンゴの幹処理におけるグリホサート吸収率を示した。その結果、土壌処理、幹処理に比べて葉面処理では、グリホサートが吸収され、処理されたグリホサートの合計5%以上が、処理後7日間で吸収移行した。よって、代謝試験は葉面処理により行われた。

表5 リンゴの葉面処理におけるグリホサートの吸収率

供試薬剤	検査部位	葉面処理における放射能吸収率 [処理量に対する割合 (%)]				
		7 日	21 日	28 日	49 日	70 日
CH ₂ - ¹⁴ C-グリホサート	処理葉	64.86	75.06	45.06	60.03	60.50
	新成長部(処理上方部)	3.24	2.32	3.56	4.13	5.03
	新成長部(その他)	0.33	3.87	1.68	2.84	1.47
	幹枝	0.81	1.87	1.68	2.31	2.70
	根	0.94	0.53	3.17	2.19	2.47

2) 葉面処理におけるグリホサートの代謝試験

a) グリホサート代謝物の抽出；茎葉部試料は水により抽出され、幹及び根部は0.5N アンモニア水で抽出された。その結果、全試験期間を通してリンゴの各部位において高い抽出効率を示した。

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

- b) 代謝；リンゴ中の主要放射能残留物は主にグリホサートであり、有意な代謝物の存在が認められなかった。しかし、それぞれの処理葉中のアミノメチルホスホン酸 (AMPA) 及び N-メチルアミノメチルホスホン酸 (MAMPA) は無処理葉より高い。これは、おそらく処理葉上の微生物分解によって生成したアミノメチルホスホン酸が吸収移行されたことを示唆している。

表 6 葉面処理におけるグリホサートのリンゴでの代謝

検査部位	項目	水抽出物及びそのグリホサート代謝物の割合 ^{a)} [各部位の総残留量に対する割合 (%)]				
		7日	21日	28日	49日	70日
新成長部 (処理部上方)	水抽出物	87.94	102.59	97.13	93.86	94.65
	グリホサート	85.91	101.31	94.96	87.42	87.14
	AMPA + MAMPA ^{b)}	0.47	0.67	0.21	2.46	5.04
	その他	ND ^{c)}	ND	ND	ND	ND
新成長部 (その他)	水抽出物	— ^{d)}	88.98	71.91	100.40	99.91
	グリホサート	—	87.30	66.8	92.20	95.08
	AMPA + MAMPA	—	0.69	1.03	2.89	2.78
	その他	—	ND	ND	ND	ND
処理葉	水抽出物	90.49	92.35	101.43	98.15	91.39
	グリホサート	88.73	91.16	96.09	90.60	83.85
	AMPA + MAMPA	0.69	0.72	4.05	5.59	6.45
	その他	ND	ND	ND	ND	ND
根	水抽出物	—	—	71.51	—	—
	グリホサート	—	—	66.39	—	—
	AMPA + MAMPA	—	—	ND	—	—
	その他	—	—	ND	—	—
幹枝	水抽出物	—	—	79.49	—	—
	グリホサート	—	—	64.45	—	—
	AMPA + MAMPA	—	—	ND	—	—
	その他	—	—	ND	—	—

a) 代謝物の割合は申請者が報告書データを基に作成

b) AMPA：アミノメチルホスホン酸；MAMPA：N-メチルアミノメチルホスホン酸

c) 不検出

d) 試料無し

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。

通常の農業慣行で使用により取り込まれるグリホサートは表 7 の様な残留分布を示すと考えられる。

表 7 残留放射能の一般的組成

植物部位	グリホサート	アミノチルホスホン酸	抽出不能放射能
茎葉	92	2~5	5
根	66	ND	28
幹	64	ND	21

c) 残留放射能の同定

代謝物調製試験において、¹⁴C-標識のグリホサートの葉面処理により得られた残留放射能を図 2 の方法で分離精製し、分析した。途中、質量分析の解析を容易にするために、¹³C-グリホサートを添加した。その結果、AG-50W-X8 (H⁺型)、AG-1-X8 (HCO₃⁻型)、Bio-Gel P-2 及び TLC などのクロマトグラフ上の挙動並びに ¹³C-NMR (¹H-でカップリング) スペクトル、トリ-n-ブチル n-トルフルオロアセチル誘導体の GC/MS により、親化合物であるグリホサートを確認した。