

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) グリホサートの柑橘における代謝運命試験

(資料 No. 10-4)

試験機関 :  
報告書作成年 : 1975 年

供試標識化合物 :

1)  $^{14}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$  または  $^{14}\text{C}$  で標識。



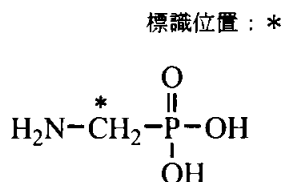
試験	$^{14}\text{C}$ 標識 <sup>a)</sup>	
	特性化試験	比放射能
放射化学的純度		88%
代謝物の検討	比放射能	1.87mCi/mM
	放射化学的純度	96%
代謝物の生成	比放射能	9.07mCi/mM
	放射化学的純度	97%
試験	$^{13}\text{C}$ 標識	
スペクトル分析用	同位体標識純度	90%
	化学的純度	97.7%

a) 処理前にカラムクロマトグラフィーで 99%以上に精製した後使用

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

化学名 ; aminomethylphosphonic acid

構造式 ;



試験	$^{14}\text{C}$ 標識	
土壌処理	比放射能	8.90mCi/mM
	化学的純度	99%以上

供試植物 :

柑橘 : Calamondin 種及び市販オレンジ

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。また、図2にグリホサートの蒸発試験の薬剤処理と試料採取方法を示した。

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。

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

試験	使用品種	供試化合物	処理方法	処理量	植物数	試験内容	試料採取	採取時期
特性化試験	Calamondin	<sup>14</sup> C-グリホサート	土壌処理	5.6mg/本 (2.24 kg ae/ha)	2本	吸収移行	非処理葉	処理1、2、3、4月後
			土壌、植物部位 <sup>a)</sup>	処理4月後				
		葉面処理	5.6mg/本 (2.24 kg ae/ha相当)	2本	吸収移行	非処理葉	処理1、2、3、4月後	
			土壌、植物部位 <sup>a)</sup>	処理4月後				
		<sup>14</sup> C-AMPA	土壌処理	5.6mg/本 (2.24 kg/ha)	2本	吸収移行	非処理葉	処理1、2、3、4月後
			土壌、植物部位 <sup>a)</sup>	処理4月後				
対照	無処理 (処理区と同室)	—	2本	吸収移行	葉	処理1、2、3、4月後		
	無処理 (処理区と別室)	—	2本	吸収移行	葉	処理1、2、3、4月後		
経時試験	Calamondin	<sup>14</sup> C-グリホサート	葉面処理	4mg/本	6本	吸収移行	処理葉、非処理葉、茎、果実	処理1、2、3、4、6、8週間後
代謝物試験	Calamondin	<sup>14</sup> C- <sup>13</sup> C-グリホサート	葉面処理	4mg/本	30本	代謝	処理葉、非処理葉、茎、果実	処理16日後
		対照	無処理	—	30本	代謝	処理葉、非処理葉、茎、果実	処理16日後
代謝比較試験	オレンジ	<sup>14</sup> C-グリホサート	葉面処理	4mg/本	6本	吸収移行	処理葉、非処理葉、茎、果実	処理16日後

a) 植物部位：根、茎、処理葉、非処理葉、未成熟果実、成熟果実  
aeとはグリホサート酸換算の薬量

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

表2 グリホサート及びアミノメチルホスホン酸の蒸発試験における薬剤処理と試料採取方法

試験	使用品種	供試化合物	処理方法	処理量	植物数	試験内容	試料採取	採取時期
蒸発試験	Calamondin	<sup>14</sup> C-グリホサート	水耕培養 (処理試験) <sup>a)</sup>	10ppm	1本	吸収移行 CO <sub>2</sub> 収支	葉、茎、根、 栄養培養液、 植物CO <sub>2</sub> 、 培養液CO <sub>2</sub>	処理1週間後
			水耕培養 (処理・浄化試験) <sup>b)</sup>	10ppm	1本	吸収移行 CO <sub>2</sub> 収支	葉、茎、根、 栄養培養液、 植物CO <sub>2</sub> 、 培養液CO <sub>2</sub>	処理2週間後
		<sup>14</sup> C-AMPA	水耕培養 (処理試験) <sup>a)</sup>	10ppm	1本	吸収移行 CO <sub>2</sub> 収支	葉、茎、根、 栄養培養液、 植物CO <sub>2</sub> 、 培養液CO <sub>2</sub>	処理1週間後
			水耕培養 (処理・浄化試験) <sup>b)</sup>	10ppm	1本	吸収移行 CO <sub>2</sub> 収支	葉、茎、根、 栄養培養液、 植物CO <sub>2</sub> 、 培養液CO <sub>2</sub>	処理2週間後

a) 1週間薬剤含有の栄養培養液で生育させ、試料採取

b) 1週間薬剤含有の栄養培養液で生育後、薬剤を含まない栄養培養液でさらに1週間生育させた後、試料採取

a) 特性化試験；2.5年生 Calamondin 種 10本を7インチプラスチックポットに移植し、Norfolk 砂壤土（粘土2%、有機物1%を含み土壌のpH5.7に調節）で満たした。特性化試験実施まで2ヶ月の適応期間を設けた。<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>モニター用として2つの対照区植物区を用意し、1つの対照区は処理植物と同室で生育させ、もう1つの対照区は別室で生育させた。

土壌処理では<sup>14</sup>C標識グリホサートを2.24kg ae/ha (5.6mg/本)あるいは<sup>14</sup>C標識アミノメチルホスホン酸を2.24kg/ha (5.6mg/本)で土壌表面に処理した。葉面処理では、土壌処理と同量を各植物の下位1/3に位置する50枚の葉の表裏に滴下処理した。

植物及び土壌試料は処理1、2、3、4月後に採取し、植物試料は根、茎、葉、未成熟果実、成熟果実に分け、冷凍保存した。

b) 経時試験；6本の16ヶ月生 Calamondin 種に<sup>14</sup>C標識グリホサートを葉面処理した。処理量は1本当たり4mgを50枚の葉の表裏に塗布し、処理後1、2、3、4、6週間に非処理葉試料を採取し、8週間後には、処理葉、非処理葉、茎、及び果実を採取し、各試料は冷凍保存した。

c) 代謝物試験；30本の16ヶ月生 Calamondin 種に<sup>14</sup>Cと<sup>13</sup>C標識グリホサートの混合物を葉面処理した。処理は1本当たり4mgを50枚の葉の表裏に塗布し、処理後16日に処理植物30本と無処理の対照区植物30本の試料を採取した。植物体は、処理葉、非処理葉、茎及び果実に分け、各試料は冷凍保存した。

d) 代謝物比較試験；2年生市販オレンジを直径7インチプラスチックポットに移植し、6ヶ月間適応期間をおいた。2本の植物の葉面に<sup>14</sup>C標識グリホサートを処理した。処理は1本当たり4mgを50枚の葉の表裏に塗布し、処理後16日に処理植物2本の試料を採取した。植物体は、処理葉、非処理葉、茎及び果実に分けた。各部試料は冷凍保存した。

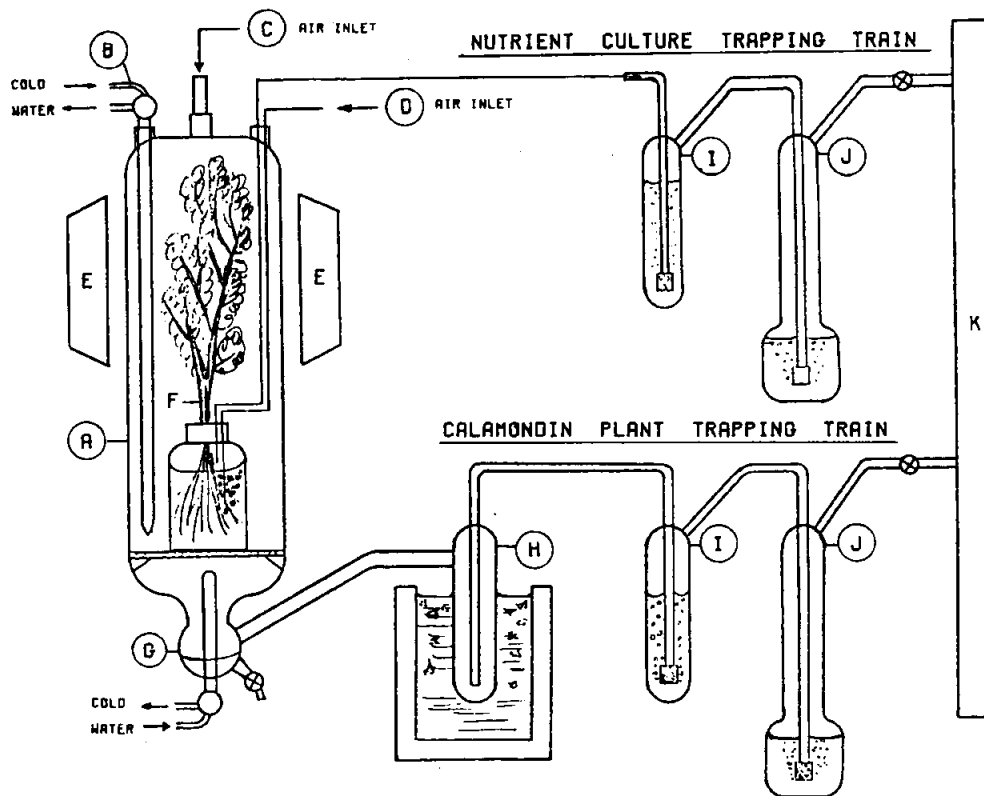
e) 蒸発試験；各植物培養器中に Calamondin 種を1本の入れ、それを<sup>14</sup>C標識グリホサートあるいは<sup>14</sup>C標識アミノメチルホスホン酸が10ppm含まれる栄養培養液で水耕栽培させた。これ

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。

により薬剤の植物への吸収移行及び植物並びに栄養培養液から発生する  $^{14}\text{CO}_2$  量を調べた。この時、1セットは、1週間の処理、もう1セットは最初の1週間を処理後、薬剤を含まない栄養培養液でさらに一週間浄化期間を設けて生育させた。試料は、処理群では、1週間後に採取した。また、もう一つの処理・浄化群では、2週間後に採取した。植物試料は、葉、茎、根に分け、各試料は冷凍保存した。

さらに、植物及び栄養培養液から発生した  $^{14}\text{CO}_2$  量も調べた。この試験に使用した装置の概略図を図1に示す。

図1 蒸発試験に用いた装置の概略図



A: 培養室; B: 冷却装置; C: 培養室空気取り入れ口; D: 栄養培養液空気取り入れ口; E: 蛍光灯 F: 植物;  
G: 培養室トラップ; H: ドライアイス/アセントラップ; I: 水トラップ; J: 1N NaOH 溶液トラップ; K: 真空ポンプ

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) 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；

柑橘類の葉及び果実試料は有機溶媒 (葉：ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトン；果実：エーテル) でソックスレーを用いて前抽出し、脱脂した植物体試料を水で4回振とう及び遠心分離により抽出した。土壌は水で直接抽出した。

グリホサート代謝物の精製は D-50 陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>型) (水で展開)、D-1 陰イオン交換樹脂 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>型) (0→8M ギ酸のグラジエント) を用いて行った。その後、同定定量には、高圧電気泳動、GC、<sup>13</sup>C-NMR、GC/MS を用いた。GC 及び GC/MS 分析では、無水トリフルオロ酢酸/トリフルオロエタノール/ブチルエステル化法による誘導体化を行った。

結 果：

1) 特性化試験；

Calamondin 種の樹から1ヶ月毎無作為に50枚の非処理葉を採取して放射エネルギーを分析した結果 (表3)、土壌処理においては、<sup>14</sup>C 標識グリホサート及び <sup>14</sup>C 標識アミノメチルホスホン酸のいずれにおいても非処理葉への放射能の移行は0.1%未満であったが、葉面処理では、非処理葉へ0.3~1%移行した。また、処理区と同室に置いた対照区では、<sup>14</sup>C 標識グリホサート土壌処理区非処理葉の約半分程度の放射能が認められた。これは、土壌処理された <sup>14</sup>C 標識グリホサート及び <sup>14</sup>C 標識アミノメチルホスホン酸の微生物による分解で生じた <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込みが主な要因と考えられる。同様に、処理区と別室に置かれた対照区でも、処理区と同室の対照区よりは、かなり少ないが、放射能が検出された。

表3 柑橘におけるグリホサートの非処理葉における吸収移行率の比較

処理薬剤	処理方法	非処理葉中放射能 [処理量に対する割合 (%) ]				非処理葉中放射能濃度 (DPM/g)			
		1ヵ月	2ヵ月	3ヵ月	4ヵ月	1ヵ月	2ヵ月	3ヵ月	4ヵ月
<sup>14</sup> C-グリホサート	土壌処理	0.08	0.09	0.09	0.09	9,850	12,408	12,950	13,580
	葉面処理	0.27	1.01	0.29	0.76	38,050	144,790	46,250	142,950
<sup>14</sup> C-AMPA	土壌処理	0.08	0.06	0.06	0.07	18,345	18,105	18,602	21,680
対照区	処理区と同室	—	—	—	—	5,430	6,417	8,831	7,750
	処理区と別室	—	—	—	—	2,260	2,570	3,600	675

<sup>14</sup>C 標識グリホサートの葉面処理後4ヶ月目においては、処理葉以外の全ての植物部位に0.3~1.3%の放射能が認められた。また、果実においては、未成熟果実には0.3%であったが、成熟果実には1.3%の放射能が認められた。この成熟果実を水で抽出し、抽出物を陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂で精製の後、高圧電気泳動での分析で、放射能はグリホサートと一致し

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。

た。また、土壌処理あるいは葉面処理では葉または果実中にはアミノメチルホスホン酸は全く検出されなかった。

表4 柑橘における処理4ヶ月後の放射能分布

検査部位	放射能分布 [処理量に対する割合 (%) ]		
	<sup>14</sup> C-グリホサート処理		<sup>14</sup> C-AMPA 処理
	土壌処理	葉面処理	土壌処理
土壌	63.82	10.52	64.67
根	0.41	0.29	0.34
茎	0.08	0.41	0.09
葉	0.09	0.76	0.07
処理葉 <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	11.92	—
未成熟果実	0.06	0.26	0.04
成熟果実	0.05	1.30	0.04

a) 試験開始時の100枚中37枚が残存。落葉した処理葉は土壌と混合

b) 未測定

2) グリホサートの経時試験；

<sup>14</sup>C 標識グリホサートの葉面処理により、処理された葉（50枚）は時間の経過とともに落葉により減少した（1週：41枚；2週：20枚；3週22枚；4週：19枚；6週：10枚；8週：0枚）。非処理葉への吸収移行は第2週の0.8%から第6週の2.6%と幅があったが、茎ではその幅は小さかった（1.3~2.2%）。ばらつきの大きかったのは、果実の0.1%未満から1.4%であった。また、放射能回収率は第1週の80%が第8週で4.5%まで減少した。これは、収穫時までに落葉した枚数に関連している。

表5 グリホサート葉面処理における放射能の推移

植物部位	放射能分布 [処理量に対する割合 (%) ]					
	1週	2週	3週	4週	6週	8週
処理葉 <sup>a)</sup>	76.6	23.0	26.8	24.5	10.3	— <sup>b)</sup>
非処理葉	1.8	0.8	1.8	1.6	2.6	2.2
茎	1.3	1.6	1.9	2.2	1.7	1.5
果実	<0.1	1.0	0.3	— <sup>b)</sup>	1.4	0.8 <sup>c)</sup>
回収率	79.7	26.4	30.8	28.3	16.0	4.5 <sup>d)</sup>

a) 各収穫時の残存していた処理葉の枚数：1週：41枚；2週：20枚；3週22枚；4週：19枚；6週：10枚；8週：0枚

この実験では、6個体の植物の葉面全体に処理して、時間の経過と共に各試料採取可能な処理葉を採取した。除草剤の効果により、採取可能な処理葉は時間の経過と共に減少する。しかし、時間と共に落葉する処理葉の数は植物体によって異なるため、2週目に残っていた処理葉の方が3週目に残っていた処理葉よりも少ないということも起こりうる。従ってこの場合は、採取可能だった処理葉の数は見かけ上3週間目に増加したように見える。

b) 試料無し

c) 申請者注：報告書の表6では9.8%と記載されていた。しかし、処理葉が全て落葉し、非処理葉及び茎の残留放射能が第8週で減少する中で、果実だけが急増するのは不自然と考え、報告書の本文中に第8週の回収率が4.5%と記載されていることから、非処理葉及び茎の残留量の数値を基に0.8%と推計。

d) 申請者注：報告書の表6では、13.5%と記載され、報告書本文中では4.5%と記載されていた。ここで、数値が、13.5%であると、第6週で10.3%の放射能が残留していた処理葉が全て落葉した後も回収率が第6週とほぼ同等であるのは不自然であるので、報告書の本文中に記載された数値4.5%を採用。

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) 代謝物試験；

Calamondin 種による  $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$  標識グリホサートの代謝によって生成する物質についてスペクトル的に構造決定を行った。

非処理葉中の水溶性放射能を陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>型) で精製し、果実では陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>型) 及び陰イオン交換樹脂 (HCOO<sup>-</sup>型) で精製した後、 $^{13}\text{C}$ -NMR に供した。スペクトルは、グリホサートと一致した。また、無水トリフルオロ酢酸/トリフルオロエタノール/ブチルエステル化による誘導体化後の GC/MS もグリホサートと一致した。

4) 代謝比較試験；

市販のオレンジを Calamondin 種と同様に 2.24kg ae/ha の  $^{14}\text{C}$  標識グリホサートで処理し、処理 16 日後に試料を採取した。この抽出物を陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂、Bio-Gel P-2 のゲルろ過での精製における溶出パターンは Calamondin 種のもので非常によく似ていた。また、これらの精製溶出パターン及び高圧電気泳動のコクロマトグラフィーから、Calamondin 種と市販オレンジの代謝経路は同一であることが示された。(ae とはグリホサート酸換算の薬量)

5) 蒸発試験；

10ppm の  $^{14}\text{C}$  標識グリホサートまたは  $^{14}\text{C}$  標識アミノメチルホスホン酸を含む栄養培養液で生育させた Calamondin 種を用いた蒸発試験を実施した。処理 1 週間の処理群で葉から放出された  $^{14}\text{CO}_2$  は栄養培養液中の  $^{14}\text{C}$  標識グリホサートの 2.5% であったが、 $^{14}\text{C}$  標識アミノメチルホスホン酸の場合は、添加量の僅か 1% しか Calamondin 種の葉から  $^{14}\text{CO}_2$  として放出されなかった。また、さらに 1 週間後に  $^{14}\text{C}$  標識グリホサートまたは  $^{14}\text{C}$  標識アミノメチルホスホン酸を含まない栄養培養液と交換した処理・浄化群の場合には、2 週間後に検出された  $^{14}\text{CO}_2$  は処理した放射能のわずか 0.2~0.3% に減少した。

表 6 蒸発試験における放射能分布

植物部位	放射能分布 [処理量に対する割合 (%) ]					
	$^{14}\text{C}$ -グリホサート			$^{14}\text{C}$ -AMPA		
	処理群	処理・浄化群		処理群	処理・浄化群	
	1週間	1週間	2週間	1週間	1週間	2週間
葉	1.3	— <sup>a)</sup>	1.2	1.8	—	0.8
茎	0.3	—	0.4	0.3	—	0.3
根	4.2	—	2.6	5.5	—	2.5
$^{14}\text{CO}_2$ (植物)	2.1	2.9	0.3	1.4	0.8	0.2
$^{14}\text{CO}_2$ (培養液)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
培養液	85.3	82.5	2.3	82.7	85.3	3.3
合計	95.2	—	92.2	91.7	—	93.2

a) 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。

(5) グリホサートのオオムギ, オートムギ, イネ及びソルガムにおける代謝運命試験

(資料No. 10-5)

試験機関 :

報告書作成年 : 1974 年

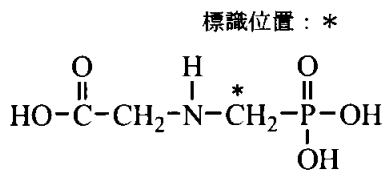
供試標識化合物 :

$^{14}\text{C}$  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  $^{14}\text{C}$  で標識。



試験	$^{14}\text{C}$ 標識	
	土壌試験	比放射能
	放射化学的純度 <sup>a)</sup>	96.4%
水耕栽培植物吸収移行試験	比放射能	8.99mCi/mM
	放射化学的純度	95.3%

a) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 3.6%

N-メチルアミノメチルホスホン酸 ( $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ) 0.05%

b) 放射化学的不純物 : アミノメチルホスホン酸 3.81%

N-メチルアミメチルホスホン酸 ( $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ) 0.92%

供試植物 :

イネ ; 品種 Blue Bell

オートムギ ; 品種 Rodney タイプ

ソルガム ; 品種 Surgro Grain

オオムギ ; 品種 Larker, 6条オオムギ



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)

表1 各種試験のグリホサートによる薬剤処理と試料採取方法

処理方法	供試薬剤	供試植物	処理量	植物数	試験内容	採取試料	採取時期
予備薬害 土壌吸収 移行試験	非標識 グリホサート	ソルガム <sup>a)</sup>	0, 2.24, 4.48, 8.96 kg ae/ha	1ポット (4本)	薬害	作物	処理48日後
		オムギ <sup>c)</sup>		1ポット (8本)			
		イネ <sup>c)</sup>		1ポット (7本)			
		オートムギ <sup>a, b)</sup>		1ポット (5-7本)			
土壌吸収 移行試験	<sup>14</sup> C 標識 グリホサート	ソルガム <sup>c)</sup>	4.48kg ae/ha (2.59mg/ポット)	3ポット (5本/ポット) <sup>d)</sup>	吸収移行	植物 地上部	処理4, 6, 8週 間後
		オムギ <sup>c)</sup>		3ポット (8本/ポット)			
		イネ <sup>c)</sup>		3ポット (6-8本/ポット) <sup>d)</sup>			
		オートムギ <sup>c)</sup>		3ポット (9本/ポット) <sup>d)</sup>			
予備水耕 栽培吸収 移行試験	非標識 グリホサート	ソルガム	3~6mg/タンク	3本	薬害	作物	処理4~5 週間後
		オムギ <sup>e)</sup>		5本			
		イネ <sup>e)</sup>		7本			
		オートムギ <sup>e)</sup>		5本			
水耕栽培 吸収移行 試験	<sup>14</sup> C 標識 グリホサート	ソルガム	0.6ppm	72本 (12本) <sup>c)</sup>	吸収移行 代謝	水耕液	処理4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28日後
		オムギ <sup>e)</sup>	1.2ppm	120本 (20本) <sup>c)</sup>		地上部、 根部	
		オートムギ <sup>e)</sup>	1.2ppm	120本 (20本) <sup>c)</sup>	吸収移行 代謝	水耕液	処理4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28日後
		イネ <sup>e)</sup>	0.6ppm	175本 (28本) <sup>c)</sup>		地上部、 根部	

- a) 10日齢に薬剤処理
  - b) 発芽不良
  - c) 12日齢に薬剤処理
  - d) 対照植物も同数
  - e) 対照植物本数
- aeとはグリホサート酸換算の薬量

a) 予備薬害土壌吸収移行試験；

Drummer 土壌で生育した10日齢の各作物(ソルガム、オムギ、イネ、オートムギ)を4ポット(4×4inch)ずつ用意した。次にそれらの土壌表面にそれぞれ0、2.24、4.48、8.96kg ae/haで非標識グリホサートを処理し、処理後48日間生育させ、対照区と比較した。オートムギは発育が不良であった。

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。

b) 土壤吸収移行試験；

12日齢の各作物（ソルガム、オオムギ、イネ、オートムギ）を6ポット（4 x 4inch）用意し、そのうち、3ポットの土壤表面に<sup>14</sup>C標識グリホサートを2.59mg/ポット（4.48kg ae/ha）で処理した。試料は4、6、8週間後1ポットずつ各作物の処理植物及び対照植物の土壤から上約1インチのところで切り取り採取した。各試料は冷凍保存した。

植物の土壤栽培に用いられた土壤の特性を表2に示した。

表2 使用した土壤の特性

特性	Drummer土壤	Ray土壤
土性	埴壤土	微砂壤土
有機物含量 (%)	6	1.0
砂 (%)	2.0	6.0
シルト (%)	55.4	82.3
粘土 (%)	36.8	0.6
pH	7.0	6.5

c) 予備水耕栽培吸収移行試験；

植物は砂耕栽培により生育（イネはRayシルト土壤とピートモスの混合土壤）した8~21日齢の作物（ソルガム3本；オートムギ5本；イネ7本；オオムギ5本）を用いた。これらの植物を水耕培養液で4~7日栽培後に非標識グリホサートで処理（3~6mg/タンク）し、4~5週間栽培後に生育を比較した。

d) 水耕栽培吸収移行試験；

吸収された放射能の地上部、根部への分布（表4）、代謝物の生成率の分布（表6）及び水耕液中での微生物分解を考慮した総放射能回収率（表7）を調べることを目的とした3試験を実施した。

この試験には砂耕栽培でそれぞれ12日間栽培ソルガム、18日間栽培オートムギ、18日間栽培オオムギ並びにピートモスとRayシルト壤土の混合土壤で19日間栽培イネを用いた。

水耕液栽培4日（イネは3日）後に、イネ（175本；7本/穴）及びソルガム（72本；3本/穴）には3mg（0.6ppm）、オートムギ（120本；5本/穴）及びオオムギ（120本；5本/穴）には6mg（1.2ppm）の<sup>14</sup>C標識グリホサートを処理した。対照植物としてオートムギ20本、オオムギ20本、イネ28本及びソルガム12本を用いた。

水耕培養液を処理4、7、11、14、18、21、24、28日後に採取し、放射エネルギーをLSCで分析した。

植物試料は7、14、20（イネのみ）、28日に採取し、乾燥後、地上部と根部に分離した。それらの各部試料は冷凍保存した。

オートムギ、オオムギ、ソルガムにおいては、下記の栄養培地の各液a（150mL）、b（125mL）、c（50mL）、d（125mL）及びe（25mL）を蒸留水で25Lに希釈したものを用いた。イネでは、下記の栄養培地の各液a（32mL）、b（16mL）、c（8mL）、d（48mL）、e（48mL）及びf（16mL）

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。

を蒸留水で 4L に希釈した。さらにその溶液を 4 倍に希釈し、適宜鉄を添加したものをを用いた。

植 物	栄養培地液組成
オートムギ, オオムギ, ソルガム	a) 1M $\text{KNO}_3$ ; b) 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; c) 1M $\text{MgSO}_4$ ; d) 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; e) 微量栄養素 [ $\text{H}_3\text{BO}_3$ (2.86g/L); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.2g/L); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08g/L); $\text{H}_2\text{MoO}_4$ (0.09g/L)]
イネ	a) 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; b) 0.5M $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; c) 1M $\text{CaCl}_2$ ; d) 1M $\text{MgSO}_4$ ; e) 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; f) 微量栄養素 [ $\text{KCl}$ (3.728g/L); $\text{H}_3\text{BO}_3$ (1.546g/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.845g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.575g/L); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.125g/L); $\text{H}_2\text{MoO}_4$ (85% $\text{MoO}_3$ :0.017g/L)]

2) 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) 代謝物分析;

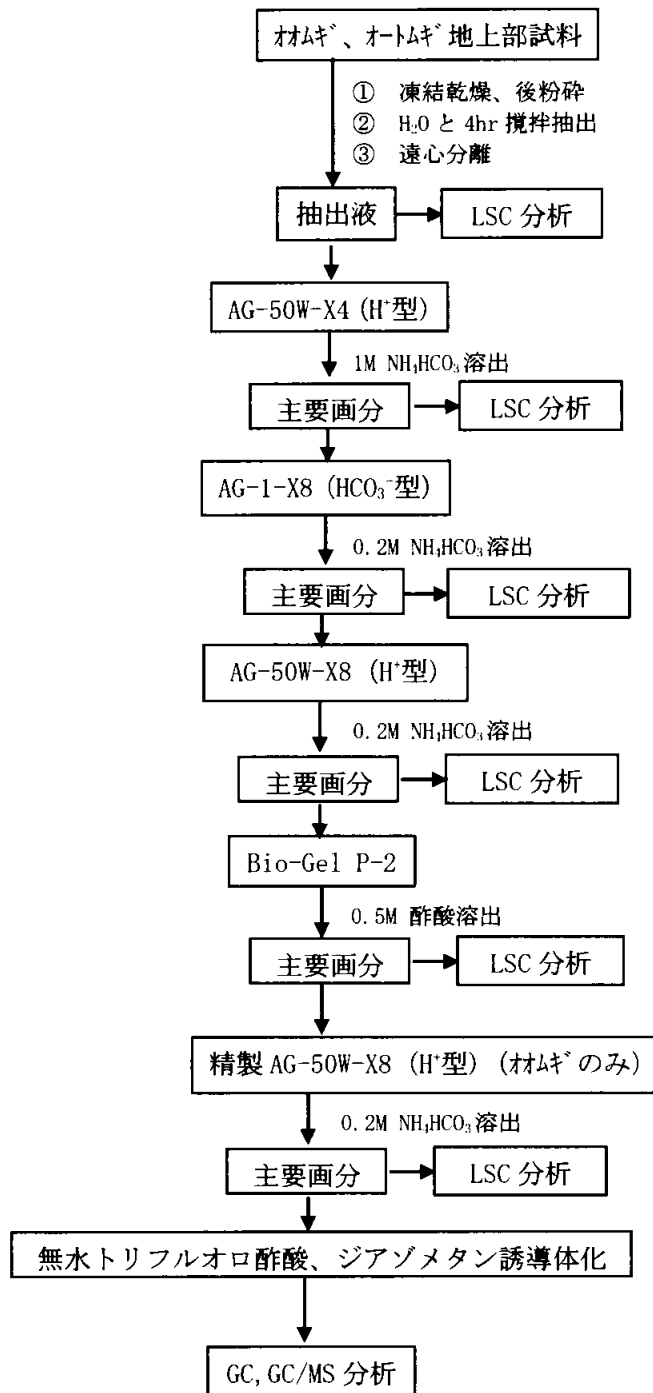
水耕培養液のグリホサート代謝物は、直接あるいは陽イオン交換樹脂で分離後 LSC 及び TLC (ベータカメラ) で分析した。

水耕栽培吸収移行試験試料では、植物試料を水で 2~3 時間攪拌抽出した。これらの抽出物は、陽イオンあるいは陰イオン交換樹脂並びに高压電気泳動 (pH5.9; いくつかのケースでは pH10.1) により分離し、グリホサート代謝物の分析を行った。

c) スペクトル同定用試料の分離精製;

図 1 に示した方法でスペクトル分析用にオオムギ及びオートムギ地上部試料のを分離精製した。まず凍結乾燥、粉碎試料を水で 4 時間抽出後、抽出液と植物残渣に分離し、さらに、抽出液を順次 Dowex-50W-X4 カラム (20-50mesh、H<sup>+</sup>型、2.4×95cm; 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で溶出)、AG-1-X8 (200-400mesh、 $\text{HCO}_3^-$ 型、2.4×60cm; 0.2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で溶出)、Dowex-50W-X8 カラム (200-400mesh、H<sup>+</sup>型、0.9×42m; 1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で溶出)、Bio-Gel P-2 (0.5M 酢酸で溶出) カラムでさらにオオムギについては精製 Dowex-50-X8 カラム (H<sup>+</sup>型、ピペット) カラムで分離精製した。精製されたグリホサート及びその代謝物を無水トリフルオロ酢酸、次いでジアゾメタン/エーテル溶液と反応させてメチル N-トリフルオロアセチル誘導体化し、GPLC (FID/RAD)、GC/MS で分析した。

図1 スペクトル同定分離精製法



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

結 果：

1) 土壤栽培におけるグリホサートの吸収移行

a) 予備土壤吸収移行試験；

処理した3濃度（2.24、4.48、8.96kg ae/ha）において対照区及び処理区の植物に生育状態の差はなかった。

b) 土壤吸収移行試験；

推定慣行施用濃度 4.48kg ae/ha 処理における結果（表 3）では処理8週間後の全植物（地上部）で放射能の吸収移行は 0.04～0.13%であり、土壤栽培植物の作物への吸収移行は何れの作物においても低かった。この時の対照植物では 0.01%～0.05%であった。この試験では代謝物同定及び特徴づけは実施しなかった。

表 3 グリホサートの土壤吸収移行試験

作物	試料採取日	放射能吸収量 [処理量に対する割合（%）]		放射能濃度 (ppm)	
		対照区	処理区	対照区	処理区
オオムギ	4週間	0.07	0.08	0.084	0.093
	6週間	0.03	0.07	0.026	0.078
	8週間	0.03	0.05	0.024	0.059
オートムギ	4週間	0.06	0.09	0.050	0.062
	6週間	0.05	0.07	0.017	0.029
	8週間	0.04	0.13	0.018	0.050
イネ	4週間	0.04	0.03	0.23	0.11
	6週間	0.01	0.04	0.038	0.077
	8週間	0.01	0.04	0.061	0.157
ソルガム	4週間	0.06	0.08	0.048	0.073
	6週間	0.05	0.06	0.030	0.085
	8週間	0.05	0.08	0.024	0.085

2) 水耕栽培におけるグリホサートの吸収移行

a) 予備水耕栽培吸収移行試験；

試験の結果、各作物の水耕栽培最適濃度は下記の通りであった。

グリホサートの水耕栽培最適濃度 (ppm)			
オオムギ	オートムギ	イネ	ソルガム
1.2	1.2	0.6	0.6

b) 水耕栽培吸収移行試験；

水耕栽培における <sup>14</sup>C 標識グリホサートの各作物への吸収移行を表 4 に示した。その結果、処理 28 日後における吸収移行は地上部で 2.70～4.68%、根部で 6.53～23.05%であった。最も吸収移行した作物部位はオオムギの根の 23.05%であり、最低はソルガム地上部の 2.70%で

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。

あった。オオムギは根部で最大吸収を示したにも係らず、地上部では低かった (2.87%)。またソルガム処理区にはグリホサートの影響として萎黄病の発生がみられた。

対照区では、試験終了時において地上部では0.04~0.19%、根部では0.02~0.11%の放射能が認められた。このことから、 $^{14}\text{C}$ が $^{14}\text{C}$ 実験中に発生したことが明白であり、処理及び無処理植物により、光合成による $^{14}\text{C}$ の固定化が示唆される。

表4 水耕栽培吸収移行試験における各作物へのグリホサートの吸収移行

作物	試料採取日	グリホサートの吸収移行							
		処理量に対する割合 (%)				濃度 (ppm)			
		処理区		対照区		処理区		対照区	
		地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
オオムギ	7日	0.51	3.36	0.003	0.004	0.270	4.542	0.004	0.009
	14日	1.62	6.31	0.02	0.01	1.179	7.982	0.009	0.005
	28日	2.87	23.05	0.04	0.026	0.571 <sup>a)</sup>	6.128 <sup>a)</sup>	0.007	0.004
オートムギ	7日	0.59	2.10	0.012	0.006	0.250	1.797	0.004	0.003
	14日	3.21	4.96	0.04	0.03	1.000	2.980	0.013	0.014
	28日	3.49	13.76	0.10	0.05	0.707 <sup>a)</sup>	6.482	0.008	0.007
イネ	7日	0.77	2.88	0.002	0.004	0.534	2.505	0.003	0.003
	14日	1.98	5.59	0.008	0.02	1.545	3.304	0.008	0.010
	20日	5.58	12.36	0.19	0.08	8.787	10.749	0.266	0.078
	28日	4.68	6.53	—	—	2.816	3.684	—	—
ソルガム	7日	0.08	1.94	0.016	0.012	0.037	1.10	0.005	0.003
	14日	0.48	5.64	0.042	0.11	0.073	1.597	0.004	0.020
	28日	2.70	13.40	0.119	0.112	0.216	1.711	0.004	0.004

a) これらの結果は14日後の値よりも低かった。これは植物の重量増加が吸収移行速度よりも大であったことを示す。

しかし、この経路を経た植物への放射能吸収移行は処理植物と比べると低く、オートムギ地上部 (28日後) で処理放射能の0.1%の吸収移行がみられた。この時点の処理オートムギ地上部への吸収移行は3.49%であった。表5では処理植物中放射能の $^{14}\text{C}$ 吸収固定由来放射能の割合を推定した。その結果、オオムギの1.4%からソルガムの4.5%の範囲にあった。

表5 処理植物中放射能の $^{14}\text{C}$ 吸収固定由来の割合

試料採取日	処理植物中放射能の $^{14}\text{C}$ 吸収固定由来の割合 (%)							
	オオムギ		オートムギ		イネ		ソルガム	
	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
7日	0.55	0.12	1.85	0.23	0.30	0.10	20.19	0.56
14日	1.44	0.19	1.25	0.51	0.44	0.29	8.96	1.93
20日	—	—	—	—	3.42	0.66	—	—
28日	1.42	0.12	2.91	0.34	—	—	4.46	0.84

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) 水耕栽培における水耕培養液のモニタリング；

表6に水耕栽培における水耕培養液のモニタリングの結果を示した。水耕培養液中の残存放射能は28日後でソルガムの22.91%からイネの46.01%の範囲にあった。水耕培養液中の放射能は28日後でグリホサートが86.5~90.8%、アミノメチルホスホン酸が5.7~8.7%、N-メチルアミノメチルホスホン酸が3.4~5.2%認められた。対照区では、28日間で放射能の損失はなく99.4~101.0%であった。また、28日後での対照区の水耕培養液中のグリホサート及び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それぞれ94.9、5.1及び0%であったことから、処理区では作物が水耕培養液中の総放射エネルギーの損失及び代謝を促進することが示唆された。

表6 水耕栽培における水耕液のモニタリング

作物	試料採取日	総放射エネルギー [処理量に対する割合(%)]	水耕培養液中のグリホサート代謝物 [(水耕培養液中に対する割合(%)]		
			グリホサート	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
オムギ	4日	102.2	100	—	—
	7日	101.9	94.7	5.3	—
	11日	104.05	86.0	14.0	—
	14日	69.82	94.2	5.87	—
	18日	69.45	94.4	5.6	—
	21日	61.16	89.30 <sup>a)</sup>	9.03 <sup>a)</sup>	—
	25日	52.89	—	—	—
	28日	30.93	87.78	6.8	5.2
オートムギ	4日	90.29	100	—	—
	7日	88.4	91.7	6.5	1.8
	11日	84.73	70.7	29.3	—
	14日	66.52	88.0	12.0	—
	18日	68.07	91.1	8.9	—
	21日	48.83	91.41 <sup>a)</sup>	7.3 <sup>a)</sup>	—
	25日	37.23	—	—	—
	28日	34.80	90.84	5.7	3.7
イネ	4日	102.53	100.00	—	—
	7日	93.41	93.1	6.9	—
	11日	80.35	74.4	25.6	—
	14日	61.60	85.2	14.8	—
	18日	55.94	87.3	12.7	—
	21日	54.99	85.31 <sup>a)</sup>	12.88 <sup>a)</sup>	—
	25日	50.89	—	—	—
	28日	46.01	86.2	8.7	4.2
ソルガム	4日	92.77	100.00	—	—
	7日	76.90	100.00	—	—
	11日	62.91	69.4	30.6	—
	14日	47.89	92.5	5.8	—
	18日	49.19	78.4	21.6	—
	21日	36.98	92.12	5.72	—
	25日	31.97	—	—	—
	28日	22.91	89.8	6.6	3.4
対照	0日	101.03	—	—	—
	4日	112.08	—	—	—
	8日	113.4	95.3	4.7	0
	13日	109.59	—	—	—
	18日	109.75	—	—	—
	25日	99.5	—	—	—
	28日	99.4	94.9	5.1	0

a) 代謝物はTLCで分析したが、これらの数値はAG-50W分析

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

d) 水耕栽培実験での処理放射能収支；

表7に<sup>14</sup>C標識グリホサート処理における放射能収支を示した。28日後の総放射能回収率はソルガムの40.2%からイネの62.4%の範囲であった。水耕培養液中の放射能は植物への吸収量と比べると減少率が高く収支が低くなった。その原因は水耕培養液中の<sup>14</sup>C標識グリホサートが<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>及び他の天然揮発性物質への微生物分解されることによると考えられる。

表7 水耕栽培実験での処理放射能収支

作物	試料採取日	物質収支 [処理量に対する割合 (%) ]							総放射能回収率
		地上部	根部	洗液1	洗液2	洗液3	水耕液	スピル	
オムギ	7日	0.04	0.28	0.13	0.02	0.02			60.48
	14日	0.14	0.53	0.13	0.13	0.06		—	
	28日	2.39	19.21	3.98	1.58	0.91	30.93		
オートムギ	7日	0.05	0.17	0.16	0.03	0.02			52.06
	14日	0.27	0.42	0.13	0.04	0.02		0.62	
	28日	2.91	11.46	1.45	0.52	0.26	31.67	1.85	
イネ	7日	0.06	0.24	0.11	0.03	0.02			62.36
	14日	0.16	0.40	0.17	0.14	0.02			
	20日	2.31	5.12	0.66	0.15	0.27		—	
	28日	2.13	2.97	0.86	0.34	0.19	46.1		
ソルガム	7日	0.007	0.16	0.11	0.02	0.02			40.20
	14日	0.04	0.47	0.24	0.05	0.03		—	
	28日	2.23	11.09	1.85	0.67	0.30	22.91		

3) 植物含有<sup>14</sup>C放射能の分析；

a) 各作物における放射能の水抽出効率；

植物含有放射能を水で2あるいは3時間攪拌抽出した時の抽出効率を表8に示した。水抽出効率は地上部で85~100%、根部で33~74%であった。また、最終試料の抽出効率はオムギ、イネ、オートムギ及びソルガム地上部でそれぞれ102.5、85.36、89.0及び107.9%、根部でそれぞれ61.23、33.23、40.82及び49.57%あった。地上部試料では水による高抽出効率を得られたので全主要代謝物は水抽出物の分析のみで同定可能と判断した。

表8 各作物における放射能の水抽出効率

採取日	抽出効率 [各部残留総放射能に対する割合 (%) ]							
	オムギ		オートムギ		イネ		ソルガム	
	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
7日	99.0	44.2	110.8	75.6	66.2	44.8	99.4	72.6
14日	103.23	64.4	88.7	57.35	95.32	42.69	88.36	74.11
28日	102.50	61.23	89.0	40.82	85.36	33.23	107.90	49.57



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) 植物含有水抽出可能放射能のクロマトグラフ分析；

b-1) AG-50W 陽イオン交換樹脂分析によるグリホサート代謝物の経時的組成の比較；

表 9 に各作物中の AG-50W 陽イオン交換樹脂分析によるグリホサート代謝物の経時的な組成の比較を示した。オオムギ及びオートムギ地上部では  $^{14}\text{C}$  標識グリホサートは時間とともに減少し、アミノメチルホスホン酸及び N-メチルアミノメチルホスホン酸は増加傾向にあった。一方、ソルガムの地上部では、グリホサートは増加し、アミノメチルホスホン酸及び N-メチルアミノメチルホスホン酸は減少した。

表 9 各作物中の AG 50W 陽イオン交換樹脂分析によるグリホサート代謝物組成の比較

作物	採取日	放射能組成 [[抽出物中放射能に対する割合 (%) ]]					
		カラムクロマトグラフ 回収率		グリホサート		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	
		地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
オオムギ	7 日	98.6	54.4	89.46	49.31	4.81	2.82
	14 日	81.4	63.4	74.33	60.01	5.44	3.0
	28 日	73.7	78.7	59.87	72.74	12.23	5.52
オートムギ	7 日	109.0	67.3	90.8	57.8	6.2	6.3
	14 日	84.8	90.1	76.9	84.1	6.1	5.3
	28 日	96.8	91.2	87.6	85.3	8.1	5.2
イネ	7 日	109.5	77.8	88.1	62.5	9.1	11.2
	14 日	85.9	81.7	76.8	60.9	7.1	19.0
	28 日	104.4	85.6	88.9	58.7	10.5	24.2
ソルガム	7 日	87.8	64.7	61.0	57.6	11.1	2.2
	14 日	67.1	79.2	50.2	76.3	14.2	2.4
	28 日	85.2	87.7	73.7	83.1	9.3	4.2

b-2) 水抽出物中のグリホサート代謝物の平均的組成；

代謝物分析において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は Dowex 50W 陽イオン交換樹脂及び pH5.9 における高圧電気泳動において分離することが出来ないが、AG-1-X8 陰イオン交換樹脂及び pH10.1 の高圧電気泳動で分離可能であった。そこで、28 日試料に対して AG-50W 陽イオン交換樹脂、AG-1-X8 陰イオン交換樹脂クロマトグラフ及び pH5.9 での高圧電気泳動（一部 pH10.1）による分析を行い、水抽出物中のグリホサート代謝物の平均的組成を求め、表 10 に示した。地上部位ではグリホサートが 73.2~86.4%、アミノメチルホスホン酸が 7.3~14.0%、N-メチルアミノメチルホスホン酸が 1.6~5.4%、及び未知代謝物が 0~4.9% が認められ、根部では、グリホサートが 57.5~90.4%、アミノメチルホスホン酸が 4.4~22.5%、N-メチルアミノメチルホスホン酸が 0.71~4.7%、及び未知代謝物が 0~14.9% が認められた。イネ根部試料は水の抽出効率が低く（33%）、且つ、イネが生育不良であったにも係わらず、その根部でグリホサートが 57%、アミノメチルホスホン酸が 22%、未同定代謝物が 15% 残存していたが、その他の根部ではグリホサートが無変化で存在し、地上部では最高で 86.4% でグリホサートの割合は低かった。

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 10 28 日試料におけるクロマトグラフ分析による水抽出物中の平均的組成

作物	水抽出率 <sup>a)</sup>		グリホサート代謝物の組成 [抽出物中放射能に対する割合 (%) ]									
			グリホサート		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		原点		測定不能	
	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部	地上部	根部
オムキ <sup>°</sup>	100.0	61.23	73.25	85.9	13.97	6.16	3.5	0.71	0	0	9.28	7.23
オートムキ <sup>°</sup>	89.0	40.8	86.1	87.45	7.31	6.23	1.9	2.68	4.9	2.5	0	1.14
イネ	85.36	33.23	86.4	57.48	10.1	22.33	1.65	4.7	2.2	14.9	0	0.59
ソルガム	100.0	49.57	76.23	90.37	12.67	4.40	5.45	1.0	0	0	5.67	4.23

a) 各部位試料の総残留放射能に対する割合 (%)

b-3) 水耕培養液と植物地上部のグリホサート代謝物組成の比較 ;

表 11 に水耕培養液と植物地上部のグリホサート代謝物組成の比較を示した。全作物の 28 日試料でアミノメチルホスホン酸が水耕培養液中より地上部で多く存在した。このことは、アミノメチルホスホン酸が植物中で代謝されて生成していることを示唆している。また、N-メチルアミノメチルホスホン酸は水耕培養液で生成するが、植物中では、ソルガムを除き、地上部試料の方が水耕培養液より低かった。従って、植物中の N-メチルアミノメチルホスホン酸は植物中での代謝によるものではなく、水耕培養液中の <sup>14</sup>C 標識グリホサートの分解に由来する物と考えられる。

表 11 水耕培養液と植物地上部のグリホサート代謝物組成の比較

作物	グリホサート代謝物組成の比較					
	水耕培養液 [水耕培養液中の割合 (%) ]			植物地上部 [抽出物中の割合 (%) ]		
	グリホサート	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	グリホサート	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
オムキ <sup>°</sup>	87.8	6.8	5.2	73.3	14.0	3.5
オートムキ <sup>°</sup>	90.8	5.7	3.7	86.1	7.3	1.9
イネ	91.1	8.7	4.2	86.4	10.1	1.6
ソルガム	89.8	6.6	3.4	76.2	12.7	5.4

最終的に表 10 の平均データと植物による吸収移行に対する代謝物の割合を水抽出効率の値を乗じて作物中の <sup>14</sup>C 放射能の組成を求め、表 12 に示した。全作物の地上部位では吸収可能放射能の 73.3~76.6%がグリホサート、6.5~14%がアミノメチルホスホン酸及び、1.4~5.4%が N-メチルアミノメチルホスホン酸であった。根部ではグリホサートが 19.1~52.6%、アミノメチルホスホン酸が 2.2~7.4%、N-メチルアミノメチルホスホン酸が 0.4~1.6%であった。また、括弧内で示した処理量に対する割合では、地上部では処理放射能の 2~3.5%がグリホサート、0.2~0.4%がアミノメチルホスホン酸、0.06~0.15%が N-メチルアミノメチルホスホン酸であり、0~0.7%が抽出不能で未同定であった。根部では 1.2~12%がグリホサート、0.3~0.9%がアミノメチルホスホン酸、0.07~0.15%が N-メチルアミノメチルホスホン酸であり、抽出不能物は 4.4~8.9%であった。

表 12 28 日試料における作物中の平均組成

作物	部位	水抽出率 <sup>a)</sup>	グリホサート代謝物組成 [作物中総残留放射能に対する割合(%)] <sup>b)</sup>					
			グリホサート	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	原点	抽出 不能物	測定不能
オムギ	地上部	100.0	73.3 (2.1)	14.0 (0.4)	3.5 (0.1)	0	0	9.3
	根部	61.23	52.6 (12.1)	3.8 (0.9)	0.4 (0.1)	0	38.8 (8.9)	4.4
オートムギ	地上部	89.0	76.6 (2.7)	6.5 (0.2)	1.7 (0.06)	4.4 (0.15)	11.0 (0.38)	0
	根部	40.8	35.7 (4.9)	2.5 (0.34)	1.1 (1.5)	1.0 (0.14)	59.2 (8.14)	0.5
イネ	地上部	85.36	73.7 (3.45)	8.6 (0.40)	1.4 (0.06)	1.9 (0.09)	14.6 (0.68)	0
	根部	33.23	19.1 (1.25)	7.4 (0.48)	1.6 (0.10)	5.0 (0.33)	66.8 (4.36)	0.1
ソルガム	地上部	100.0	76.2 (2.06)	12.7 (0.34)	5.4 (0.15)	0	0	5.7
	根部	49.57	44.8 (6.00)	2.2 (0.29)	0.5 (0.07)	0	50.4 (6.75)	2.1

a) 各部位試料の総残留放射能に対する割合 (%)

b) 括弧内は処理量に対する割合 (%)

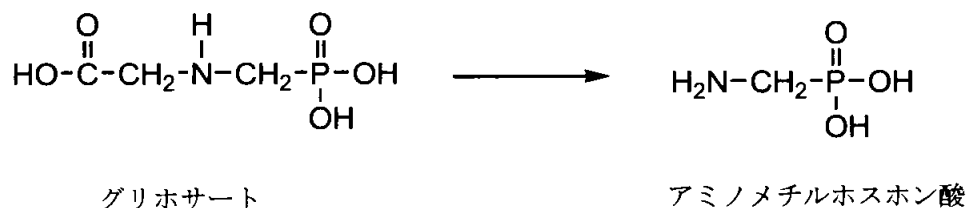
#### 4) 植物中の代謝物

図 1 に示した方法でスペクトル分析用にオムギ及びオートムギ地上部試料を分離精製した。精製されたグリホサート及びその代謝物を無水トリフルオロ酢酸、次いでジアゾメタン/エーテル溶液と反応させてメチル N-トリフルオロアセチル誘導体化し、GLC (FID/RAD)、GC/MS で分析した。その結果、化合物は参照標品とのクロマトグラフィーで行い、植物中に認められた化合物は未変化のグリホサート、アミノメチルホスホン酸及び N-メチルアミノメチルホスホン酸であった。主要残留物はグリホサートであり、アミノメチルホスホン酸は主要代謝物であった。植物中に検出される N-メチルアミノメチルホスホン酸は水耕培養液中で分解されたものが植物に吸収されたものであり、植物代謝に由来するものではないと推定される。

#### 5) 代謝経路

図 2 にグリホサートの植物体内での代謝経路を示す。

図 2 グリホサートの代謝



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) グリホサート耐性ダイズにおけるグリホサートの代謝試験

(資料 No. 10-6)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1994 年

供試標識化合物 :

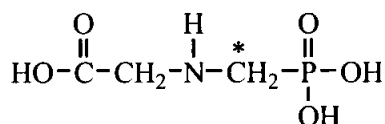
<sup>14</sup>C 標識グリホサート [N-(ホスホノメチル)グリシン]

化学名 : N-phosphonomethylglycine

構造式 ;

(a) CH<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C-グリホサート ; ホスホノメチル基のメチレン位を <sup>13</sup>C または <sup>14</sup>C で標識。

標識位置 : \*



標識同位体	供試化合物	
	<sup>14</sup> C 標識	比放射能
放射化学的純度		99.5%
<sup>13</sup> C 標識	同位体標識純度	96.9%
	化学的純度	99%
非標識	化学的純度	99.9%
<sup>14</sup> C、 <sup>13</sup> C 標識及び非標識化合物の混合物 <sup>a)</sup>	比放射能	7.42mCi/mM
	放射化学的純度	98%以上

標識位置の設定理由 : 主要な代謝物は何れもホスホノメチル基のメチレン炭素を含むと予想されるため。

供試植物 : ダイズ (品種名 : ラウンドアップ・レディ<sup>TM</sup> 遺伝子を有するダイズ)<sup>a)</sup>  
 a) ラウンドアップ・レディ<sup>TM</sup> 遺伝子を有するダイズはモンサントカンパニーが開発。このダイズは *Agrobacterium, sp. strain CP4* (CP4 EPSPS) よりグリホサート耐性 EPSPS (5-エノールピルビル-シキミ酸-3-リン酸 合成酵素) を発現するように遺伝的に修飾されたものを品種 A5547 (A5547) に戻し交配して作出した。

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。ただし、<sup>14</sup>C-標識処理とは、上記の<sup>14</sup>C、<sup>13</sup>C標識及び非標識グリホサートの混合物を処理したことを意味する。

処理量の設定根拠 ; 上記作物の出芽前難防除雑草に対する施用量として5.38kg ae/haを、また、作物の生育期間における耐性を示す最大量として2.52kg ae/haを選択した。(aeとはグリホサート酸換算の薬量)

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

表1 各種試験のグリホサートによる薬剤処理と試料採取方法

処理	試験区 コード	供試 薬剤	栽培 室 <sup>a)</sup>	1回目処理		2回目処理		植 物 数	試験 内容	採取試料 <sup>c)</sup> 及びその時期
				処理量 (kg ae/ha)	播種後 日数	処理量 (kg ae/ha)	播種後 日数			
発芽前 処理 (土壌 処理)	PRE-4.8-T	<sup>14</sup> C 標識	同室	5.38	0	— <sup>b)</sup>	—	13	吸収 移行 代謝	栽培室大気 <sup>d)</sup> : 随時 未成熟茎葉部: 播種後 56 日 成熟茎葉部: 播種後 86 日 種実: 播種後 104 日
	PRE-4.8-CA	非標識	同室	5.38	0	—	—	13		
	PRE-4.8-CB	非標識	別室	5.38	0	—	—	6		
発芽後 単回処理 (茎葉 処理)	POE-0.75-T	<sup>14</sup> C 標識	同室	0.84	21	—	—	18	吸収 移行 代謝	栽培室大気 <sup>d)</sup> : 随時 未成熟茎葉部: 播種後 56 日 成熟茎葉部: 播種後 86 日 種実: 播種後 104 日
	POE-0.75-CA	非標識	同室	0.84	21	—	—	10		
	POE-0.75-CB	非標識	別室	0.84	21	—	—	6		
発芽後 連続処理 (茎葉 処理)	POE-2.25-T	<sup>14</sup> C 標識	同室	0.84	21	1.68	43	18	吸収 移行 代謝	栽培室大気 <sup>d)</sup> : 随時 未成熟茎葉部: 播種後 56 日 成熟茎葉部: 播種後 86 日 種実: 播種後 104 日
	POE-2.25-CA	非標識	同室	0.84	21	1.68	43	10		
	POE-2.25-CB	非標識	別室	0.84	21	1.68	43	6		

a) <sup>14</sup>C-処理区と非標識処理対照区が同室あるいは別室の区別 (CA 区は <sup>14</sup>C-処理区と同じ栽培室で試験した非標識処理対照試料。CA 非標識処理対照区は <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>の吸収をモニターするため非標識処理対照植物を <sup>14</sup>C-処理植物の間に配置した。CB 非標識処理対照区は <sup>14</sup>C-処理区と別の栽培室で試験した非標識処理対照試料)。

b) これらの試験区には2回目処理はなかった

c) 未成熟茎葉部 (forage) 及び成熟茎葉部 (hay) はそれぞれ栄養生長期及び生殖成長期の茎葉部を区別する用語で、ここでは6-8週目のさやの形成前 (生育ステージ R3 以前) を未成熟茎葉部、さやの形成後で葉が黄化し落葉する前 (生育ステージ R7 以前) を成熟茎葉部として採取した。

d) <sup>14</sup>C 標識処理区試験栽培室のみ採取

ae とはグリホサート酸換算の薬量

a) 植物の栽培；

栽培室で Monmouth 土壌を満たした各ポット (直径 8 インチ、円形) に供試植物の種 3 粒を播種し、各ポットは播種後 12-13 日に間引きして 1 植物にした。播種後 30 日にポットの除草をした。

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	土壌	Monmouth土壌
土性		埴壤土
粘土 (%)		29
シルト (%)		36
砂 (%)		35
pH		6.5
有機物含量 (%)		4.2
陽イオン交換容量 (meq/100g)		27.7
密度 (g/mL)		1.08

b) 試験区；

試験は発芽前処理、発芽後単回処理及び発芽後連続処理の3種の試験の中でそれぞれ<sup>14</sup>C処理区1区と非標識処理対照区2区を設けた。発芽前処理試験では播種後直ちに5.38kg ae/haで発芽前処理した。また、発芽後単回処理では、播種後21日(V3生育段階)に初期発芽後処理として0.84kg ae/haで単回処理した。さらに発芽後連続処理では、播種後21日で初期発芽後処理として0.84kg ae/haで処理し、さらに播種後43日(花芽分化段階)に後期発芽後処理として1.68kg ae/haで処理した。2つの非標識処理対照区のうちの1つは、<sup>14</sup>C処理区と同一の栽培室で生育させ、もう1つの非標識処理対照区は別室で生育させた。

植物試料は、播種56日後に未成熟茎葉部を、86日後に成熟茎葉部、104日後に種実を採取し、試料分析まで冷凍保存した。(aeとはグリホサート酸換算の薬量)

c) 薬剤処理；

薬剤(イソプロピルアミン塩液剤)処理は噴霧器で行い、発芽前では土壌処理し、発芽後は茎葉散布処理した。茎葉散布処理では土壌表面をプラスチック製の吸収剤シートで覆い処理液が土壌に落ちないように散布した。

2) 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) 残留放射能の定性・定量；

未成熟茎葉部試料及び成熟茎葉部試料では粉碎した均一化試料を水で抽出し、抽出液と残渣に分け、それぞれについてLSC測定を行った。また、発芽前非標識処理区(PRE-4.8-CA)未成熟試料については、水抽出物をさらにジクロロメタンで抽出し、水相を水抽出物とした。発芽後連続<sup>14</sup>C処理区(POE-2.25-T)未成熟茎葉部では、水での抽出を2回行い、これら抽出液を合わせて水抽出物とした。

種実試料では均一化試料をヘキサン、50%アセトニトリル水溶液及び水で順次抽出した。抽出残渣はさらに水で抽出し、アセトニトリル/水混液に合わせた。各抽出液はLSC測定し、残渣は燃焼後LSC測定した。50%アセトニトリル/水混液及び水抽出液は合わせて、水抽出物とした。

各抽出物は陰イオン交換(SAX HPLC)カラム及び陽イオン交換(CX HPLC)カラムを用いて

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。

HPLC/LSCにより定性・定量分析した。

成熟茎葉部及び種実抽出残渣についてはプロテアーゼ、アミラーゼ及びセルラーゼを用いて連続酵素加水分解処理を行い、酵素分解性を調べた。

種実試料へキサン抽出物では3%KOH/メタノール溶液で3時間還流による鹼化処理を行い、鹼化可能な脂肪酸画分を逆相カラム HPLC 及び GC/MS で測定した。

種実試料へキサン抽出残渣を6N塩酸で110°C12時間で加水分解し、その特性をHPLC コクロマトグラフィー分析で調べた。

分析法のスキームを図1及び2に示す。

図1 未成熟茎葉及び成熟茎葉部試料の分離精製分析スキーム

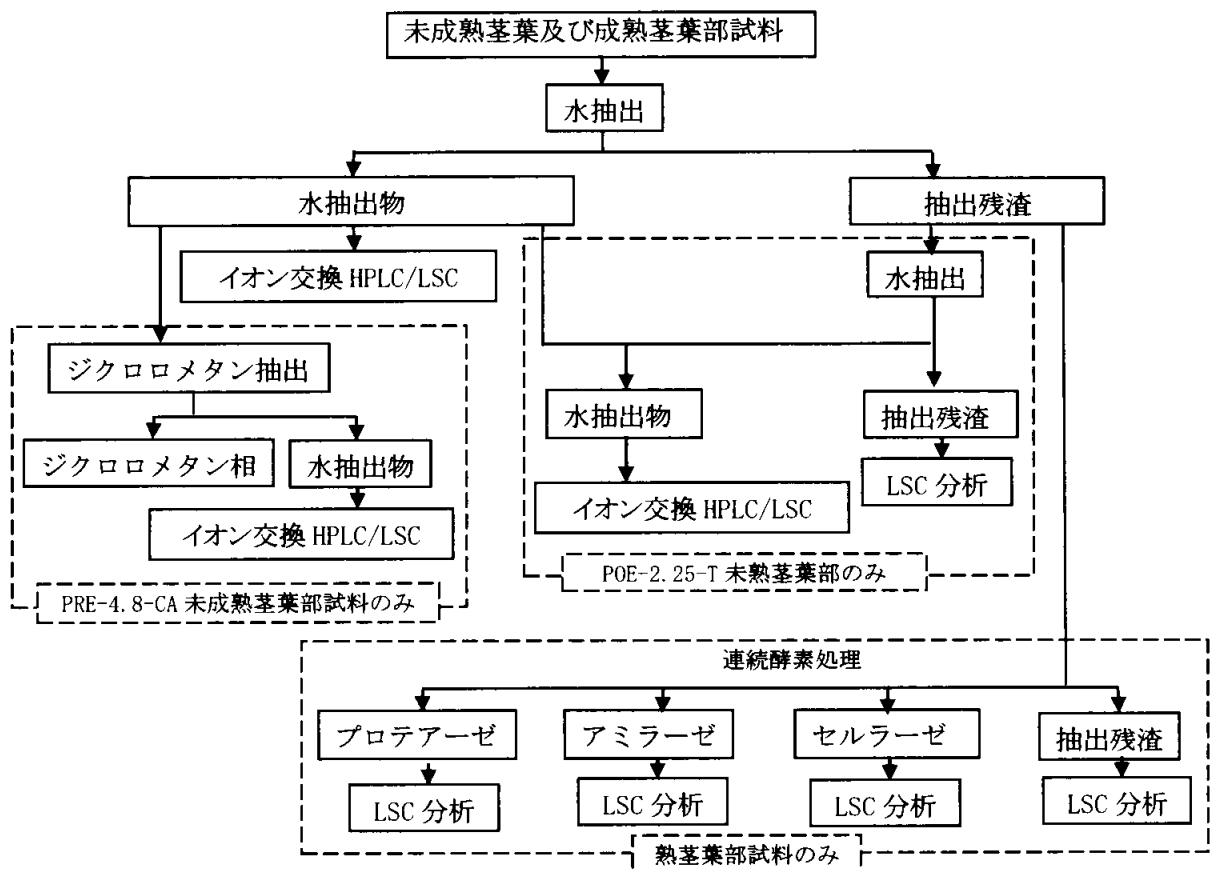
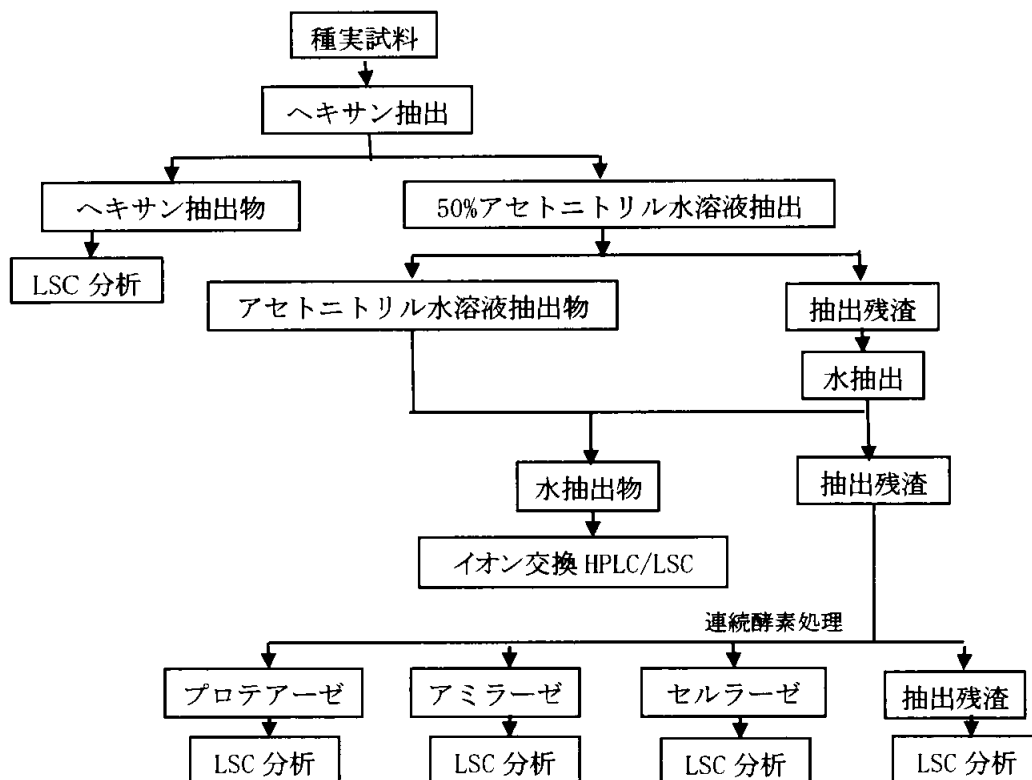


図2 種実の分離精製分析スキーム

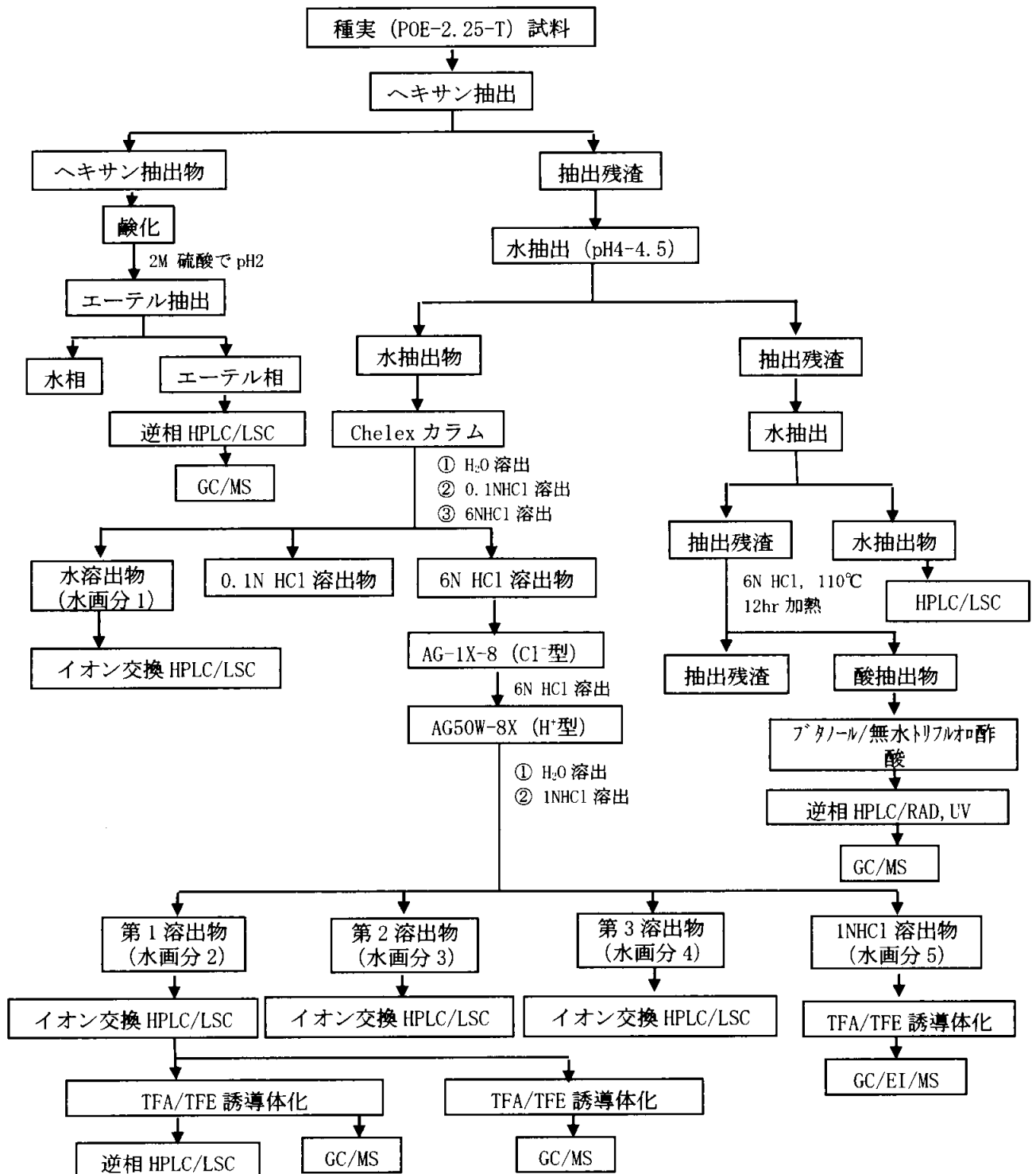


c) 大容量抽出種実試料を用いた代謝物の同定及び特徴付け

発芽前処理の成熟茎葉部及び種実の非標識処理対照試料及び処理区さらに発芽後連続処理の大容量抽出種実試料を用いて代謝物の同定及び特徴付けを行った。同定及び特徴付けは HPLC、単離成分の無水トリフルオロ酢酸 (TFA) / トリフルオロエタノール (TFE) 及び無水酢酸 / ジアゾメタン誘導体化後、GC/MS、LC/MS、TLC 等を用いて分析し、保持時間及びマススペクトルの参照標準品との比較、さらに抽出物と参照標準品とのクロマトグラフィーにより行った。分析法のスキームを図3に示す。



図3 大容量抽出種実試料精製操作フローチャート



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

結果：

1) 総残留放射能 (TRR) 及び放射能の分布

a) 発芽前土壌処理

土壌処理による発芽前処理のダイズ試料中の総残留放射能の分布を表 3 に示した。

表 3 ラウンドアップ®除草剤を発芽前処理後のダイズ試料中の総残留放射能及び放射能の分布

処理	作物部位	試験コード	処理後 試料 採取 日数	残留放射能濃度 (ppm) <sup>a)</sup>			総回収率 (%)	
				抽出前 試料	ヘキサン濃縮物	水濃縮物		抽出残渣
発芽前 処理	未成熟 茎葉部	PRE-4.8-CA (非標識処理)	56 日	0.135	— <sup>b)</sup>	0.024 (17.7)	0.113 (83.7)	101.4
		PRE-4.8-T ( <sup>14</sup> C 処理)	56 日	0.239	—	0.056 (23.5)	0.175 (73.2)	96.6
	成熟 茎葉部	PRE-4.8-CA (非標識処理)	84 日	0.121	—	0.029 (24.3)	0.094 (77.9)	102.2
		PRE-4.8-T ( <sup>14</sup> C 処理)	84 日	0.205	—	0.063 (30.8)	0.153 (74.4)	105.2
	種実	PRE-4.8-CA (非標識処理)	104 日	0.445	0.076 (17.0)	0.092 (20.6)	0.269 (60.5)	98.0
		PRE-4.8-T ( <sup>14</sup> C 処理)	104 日	0.748	0.106 (14.2)	0.207 (27.6)	0.420 (56.1)	98.0

a) 濃度はグリホサート換算濃度。括弧内は総残留放射能に対する割合 (%)

b) 未成熟茎葉部及び成熟茎葉部試料は水のみで抽出

発芽前処理の未成熟茎葉部、成熟茎葉部及び種実の非標識処理対照区 (PRE-4.8-CA-非標識処理区) 試料中に <sup>14</sup>C-処理植物 (PRE-4.8-T-<sup>14</sup>C 処理区) 中の放射能に対して 56~59%の放射能が検出された。これは表 4 に試験植物の栽培期間中の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> と <sup>14</sup>C 揮発性物質を分析した結果を示したが、発芽前植物試験に使用した栽培室の大気中に高濃度の <sup>14</sup>C-放射能が存在していた。したがって、<sup>14</sup>C-処理植物区 (PRE-4.8-T-<sup>14</sup>C 処理区) の土壌中で <sup>14</sup>C 標識グリホサートが分解して発生した <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込みの結果といえる。また、発芽前 <sup>14</sup>C-処理植物及び非標識処理対照植物の試料抽出物中の放射能分布が類似していたことにより <sup>14</sup>C-処理植物の抽出物中放射能の大部分は土壌からの <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 由来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。

表4 栽培室における揮発性物質及び<sup>14</sup>C<sub>2</sub>発生量

日付	揮発性物質及び <sup>14</sup> C <sub>2</sub> 発生量 (dpm)			
	発芽前栽培室		発芽後栽培室	
	揮発性物質	<sup>14</sup> C <sub>2</sub>	揮発性物質	<sup>14</sup> C <sub>2</sub>
1993年 1月 4日	0	8,915	0	142
1月10日	0	4,233	158	192
1月16日	73	4,428	0	199
1月23日	73	4,458	90	204
2月 1日	1,850	20,766	0	0
2月 8日	213	43,569	69	158
2月16日	0	24,112	109	262
2月26日	59	35,256	193	3,492
3月 8日	0	19,800	372	3,988
3月15日	0	16,556	418	2,999
3月22日	78	19,661	481	4,620
3月29日	58	32,050	374	10,920
4月 6日	0	35,727	0	26,419

2) 発芽前処理試験区の連続酵素加水分解

発芽前処理区 (PRE-4.8) の成熟茎葉部及び種実の抽出残渣試料をプロテアーゼ、アミラーゼ及びセルラーゼで連続的加水分解した結果を表5に示す。その結果、成熟茎葉部及び種実の非標識処理対照 (PRE-4.8-CA-非標識処理) 及び<sup>14</sup>C 処理 (PRE-4.8-T-<sup>14</sup>C 処理) 試料において、対応する各試料でほぼ同等の放射エネルギーが遊離されることから、発芽前処理試験区の<sup>14</sup>C-処理植物 (PRE-4.8-T-<sup>14</sup>C 処理) の抽出残渣中放射能の大部分は土壌からの<sup>14</sup>C<sub>2</sub>由来であると考えられた。

表5 放射能標識したラウンドアップ®除草剤を発芽前処理した成熟茎葉部及び種実試料の連続酵素加水分解

作物部位	試験コード	残留放射能濃度 (ppm) <sup>a)</sup>						
		抽出前試料	水抽出物	プロテアーゼ抽出物	アミラーゼ抽出物	セルラーゼ抽出物	抽出不能物	抽出物合計
成熟茎葉部 抽出残渣	PRE-4.8-CA (非標識処理)	0.094 (77.0)	0.005 (4.3)	0.016 (13.2)	0.007 (6.1)	0.019 (16.0)	0.038 (31.2)	0.085 91.0% <sup>b)</sup>
	PRE-4.8-T ( <sup>14</sup> C 処理)	0.153 (74.6)	0.009 (4.2)	0.037 (18.2)	0.002 (1.1)	0.021 (10.1)	0.074 (36.3)	0.143 93.5% <sup>b)</sup>
種実 抽出残渣	PRE-4.8-CA (非標識処理)	0.269 (60.5)	0.032 (7.1)	0.062 (14.0)	0.014 (3.3)	0.028 (6.2)	0.088 (19.8)	0.224 83.3% <sup>b)</sup>
	PRE-4.8-T ( <sup>14</sup> C 処理)	0.420 (56.2)	0.017 (2.2)	0.151 (20.2)	0.013 (1.8)	0.024 (3.2)	0.097 (13.0)	0.302 71.9% <sup>b)</sup>

a) 濃度はグリホサート換算濃度。括弧内はTTRに対する割合(%)

b) %総回収率 = (ppm 総回収率 / 抽出残渣中の ppm) × 100.

b) 発芽後茎葉処理

発芽後単回及び連続処理後の総残留放射能の分布を表6に示した。発芽後非標識処理対照試料 (POE-0.75-CA、POE-2.25-CA-非標識処理) 中の放射エネルギーは未成熟茎葉部、成熟茎葉部、種実の順で時間と共に増加したが、発芽後単回処理試験区 (POE-0.75-CA-非標識処理) 種実を除いて非標識処理対照植物中の放射エネルギーは<sup>14</sup>C 処理植物中でみられた量の6.2% (発芽後単回処

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。

理試験区成熟茎葉部試料)を越えなかった。発芽後単回処理試験区(POE-0.75)の種実では、 $^{14}\text{C}$ 処理植物中放射能の47.5%が非標識処理対照植物中でみられたが、これは表4から、発芽後茎葉処理試験区栽培室において $^{14}\text{CO}_2$ の発生が確認されており、少なくとも47.5%の放射能は $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みの結果であると考えられた。その他の非標識処理対照試料中の $^{14}\text{C}$ 活性は低く、従って発芽後単回 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-0.75- $^{14}\text{C}$ 処理区)種実を除いて放射能の大部分は $^{14}\text{C}$ グリホサート由来であることが示された。

発芽後単回あるいは連続処理における未成熟茎葉部及び成熟茎葉部試料ではそれぞれ総残留放射能の94%及び77%以上が水抽出で遊離された。抽出されなかった放射能は全て9%未満であった。また、発芽後単回処理区(POE-0.75)種実ではヘキサン及び水抽出によって種実中含有放射能の9.0%及び49.2%がそれぞれ遊離された。これとは対照的に発芽後連続処理区(POE-2.25)種実のヘキサン及び水抽出では種実中含有放射能の0.5%及び83.3%がそれぞれ遊離された。また、発芽後連続 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-2.25- $^{14}\text{C}$ 処理区)種実の総残留放射能の11.6%がヘキサン及び水抽出の抽出残渣に残存した。さらに、発芽後単回 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-0.75- $^{14}\text{C}$ 処理区)種実では総残留放射能の36.5%が抽出残渣に残存した。発芽後単回 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-0.75- $^{14}\text{C}$ 処理区)において非標識処理及び $^{14}\text{C}$ 処理の種実の抽出物における放射能分布を発芽後連続 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-2.25- $^{14}\text{C}$ 処理区)種実と比較すると、ヘキサン抽出物が増加し水抽出物が減少したことは、 $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによる放射性標識天然物成分の相対的増加と一致している。発芽後単回 $^{14}\text{C}$ 処理区(POE-0.75- $^{14}\text{C}$ 処理区)種実中の放射能の少なくとも47.5%が $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによるものなので、非抽出性残留放射能(結合型残留放射能)の割合が高いのは $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによって生成した非抽出性残留放射能天然物成分に由来するものと考えられた。

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。

表 6 ラウンドアップ®除草剤を発芽後処理後のダイズ試料中の総残留放射能及び放射能の分布

処理	作物 部位	試験コード	処理後 試料 採取 日数	残留放射能濃度 (ppm) <sup>a)</sup>				総回収率 (%)
				抽出前 試料	ヘキサン濃縮物	水濃縮物	抽出残渣	
発芽後 単回 処理	未成熟 茎葉部	POE-0.75-CA (非標識処理)	35	0.014	— <sup>b)</sup>	—	—	—
		POE-0.75-T ( <sup>14</sup> C 処理)	35	0.863	—	0.818 (94.8)	0.040 (4.7)	99.5
	成熟 茎葉部	POE-0.75-CA (非標識処理)	63	0.034	—	—	—	—
		POE-0.75-T ( <sup>14</sup> C 処理)	63	0.546	—	0.436 (79.9)	0.048 (8.9)	88.8
	種実	POE-0.75-CA (非標識処理)	83	0.193	0.041 (21.2)	0.049 (25.2)	0.102 (52.8)	99.2
		POE-0.75-T ( <sup>14</sup> C 処理)	83	0.406	0.037 (9.0)	0.200 (49.2)	0.148 (36.5)	94.6
発芽後 連続 処理	未成熟 茎葉部	POE-2.25-CA (非標識処理)	35&13	0.014	—	—	—	—
		POE-2.25-T ( <sup>14</sup> C 処理)	35&13	23.651	—	24.637 (104.2)	0.908 (3.8)	108.0
	成熟 茎葉部	POE-2.25-CA (非標識処理)	63&41	0.033	—	—	—	—
		POE-2.25-T ( <sup>14</sup> C 処理)	63&41	10.416	—	8.015 (77.0)	0.787 (7.6)	84.5
	種実	POE-2.25-CA (非標識処理)	83&61	0.224	—	—	—	—
		POE-2.25-T ( <sup>14</sup> C 処理)	83&61	17.459	0.086 (0.5)	14.545 (83.3)	2.020 (11.6)	95.4

a) 濃度はグリホサート換算濃度。括弧内は TTR に対する割合 (%)

b) 未成熟茎葉部及び成熟茎葉部試料は水のみで抽出。また、非標識処理対照区は抽出しなかった。

### 3) 放射性残留物の特性及び量

各試験区試料の放射性残留物の特性及び量の結果を表 7 に示す。

ラウンドアップ®除草剤を発芽後処理したダイズの未成熟茎葉部、成熟茎葉部及び種実試料中の放射性残留物を同定及び特徴付けした。発芽後連続 <sup>14</sup>C 処理区 (POE-2.25-T-<sup>14</sup>C 処理区) 種実のヘキサン抽出画分中の放射能は、鹼化処理により天然に生ずる脂肪酸と関連していると考えられた。また、抽出残渣中の結合型放射能の 88%が酸加水分解により遊離され、酸加水分解物中の放射能は天然に生成する有機酸及びアミノ酸関連物質であった。発芽後単回 <sup>14</sup>C 処理区 (POE-0.75-T-<sup>14</sup>C 処理区) の種実を除いて、発芽後処理の各サンプル中総放射能の 72%以上の同定または特徴づけを行った。これらサンプル中総残留放射能の 66%以上がグリホサート及びアミノメチルホスホン酸 (AMPA) であった。

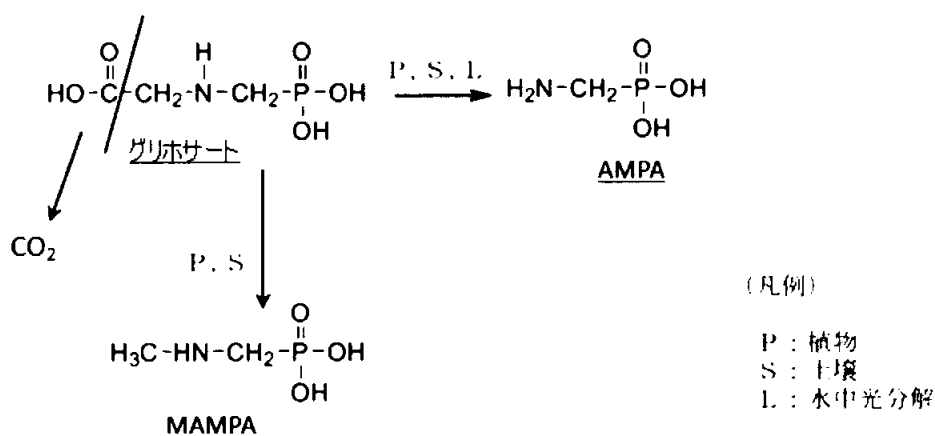
未成熟茎葉部、成熟茎葉部及び種実におけるグリホサート及びアミノメチルホスホン酸 (AMPA) の残留レベルの結果では、グリホサートは緩やかにアミノメチルホスホン酸に代謝されることが示された。未成熟茎葉部ではグリホサート及びアミノメチルホスホン酸はそれぞれ総残留放射能の 88.5~89.1%及び 2.3~6.8%、成熟茎葉部ではグリホサートは総残留放射能の 53.6~64.7%に減少し、アミノメチルホスホン酸は 5.3~12.8%に増加した。種実では、グリホサート及びアミノメチルホスホン酸はそれぞれ総残留放射能の 10.1~25.2%及び 22.9~49.1%検出され、ア

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。

ミノメチルホスホン酸が主要残留放射能であった。

この結果は、アミノメチルホスホン酸がおそらく種々の天然有機酸類との反応によりさらに代謝されて、N-グリセリルアミノメチルホスホン酸 (N-グリセリル-AMPA)、N-アセチルアミノメチルホスホン酸 (N-アセチル-AMPA) 及び N-マロニルアミノメチルホスホン酸 (N-マロニル-AMPA) などの微量のアミノメチル抱合体に変換されると考えられた。これらの抱合体は、発芽後連続<sup>14</sup>C 処理区 (POE-2.25-T-<sup>14</sup>C 処理区) 成熟茎葉部と発芽後単回及び連続処理区の種実試料に検出された。これらの結果から、N-グリシルアミノメチルホスホン酸 (N-グリシル-AMPA)、N-アセチルアミノメチルホスホン酸 (N-アセチル-AMPA) 及び N-マロニルアミノメチルホスホン酸 (N-マロニル-AMPA) はアミノメチルホスホン酸と種々の天然有機酸類 (例えばグリセリン ニリン酸、アセチル CoA あよびマロニル CoA) との反応により生成すると考えられた。

また、N-メチルアミノメチルホスホン酸 (N-メチル-AMPA) (MAMPA) が発芽後連続<sup>14</sup>C 処理区 (POE-2.25-T-<sup>14</sup>C 処理区) の未成熟茎葉部、成熟茎葉部及び種実試料中にそれぞれ総残留放射能の 0.6、1.3 及び 0.8% 検出された。N-メチルアミノメチルホスホン酸 (N-メチル-AMPA) (MAMPA) は、全ての試料において検出されたが、種実中では残留量の増加は認められなかったため、N-メチルアミノメチルホスホン酸 (N-メチル-AMPA) (MAMPA) はアミノメチルホスホン酸 (AMPA) を経由せずに直接グリホサートの開裂によって生成していることが示唆された。



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

表7 放射能標識したラウンドアップ®除草剤を発芽後処理後の放射性残留物の特性及び量

試験コード	画分 (同定または特徴付け)	放射性残留物の特性及び量					
		未成熟茎葉部		成熟茎葉部		種実	
		濃度 <sup>a)</sup> (ppm)	TRR (%)	濃度 <sup>a)</sup> (ppm)	TRR (%)	濃度 <sup>a)</sup> (ppm)	TRR (%)
POE-0.75-T ( <sup>14</sup> C 処理)	抽出前試料	0.863	100.0	0.546	100.0	0.406	100.0
	ヘキサン抽出物	—	—	—	—	0.037	9.0
	水抽出物	0.818	94.8	0.436	79.9	0.200	49.2
	(グリホサート)	0.764	88.5	0.354	64.7	0.041	10.1
	(AMPA)	0.020	2.3	0.029	5.3	0.093	22.9
	(N-メチル-AMPA)	—	—	0.003	0.6	—	—
	(N-グリセリル-AMPA)	—	—	—	—	0.005	1.2
	(N-アセチル-AMPA)	—	—	—	—	0.004	1.0
	(N-マロニル-AMPA)	—	—	—	—	0.003	0.9
	(天然成分)	0.013	1.5	0.015	2.7	—	—
	抽出残渣 (結合型残留物)	0.040	4.7	0.048	8.9	0.148	36.5
	総回収率 <sup>b)</sup>	0.858	99.5	0.485	88.8	0.384	94.6
	同定/特徴付け <sup>c)</sup>	0.797	92.3	0.401	73.3	0.146	36.1
	POE-2.25-T ( <sup>14</sup> C 処理) <sup>d)</sup>	抽出前試料	23.651	100.0	10.416	100.0	17.459
ヘキサン抽出物		—	—	—	—	0.159	0.9
(鹸化性脂肪酸)		—	—	—	—	0.137	0.8
水抽出物		24.637	104.2	8.015	77.0	15.388	88.1
(グリホサート)		21.078	89.1	5.582	53.6	4.402	25.2
(AMPA)		1.619	6.8	1.328	12.8	8.579	49.1
(N-メチル-AMPA)		0.140	0.6	0.130	1.3	0.131	0.8
(N-グリセリル-AMPA)		—	—	0.084	0.8	0.278	1.6
(AMPA 抱合体)		—	—	—	—	0.177	1.0
(N-アセチル-AMPA)		—	—	—	—	0.235	1.4
(N-マロニル-AMPA)		—	—	—	—	0.309	1.8
(未同定物)		—	—	0.059	0.6	—	—
(天然成分)		0.618	2.6	0.274	2.6	0.468	2.7
塩酸抽出物		—	—	—	—	1.007	5.8
(アミノ酸及び天然有機酸)	—	—	—	—	0.897	5.1	
抽出残渣 (結合型残留物)	0.908	3.8	0.787	7.6	0.143	0.8	
総回収率 <sup>b)</sup>	25.545	108.0	8.802	84.5	16.474	94.4	
同定/特徴付け <sup>c)</sup>	23.455	99.1	7.457	71.7	15.613	89.5	

a) ppm=グリホサート相当。

b) 未成熟茎葉部及び成熟茎葉部では総回収率は水抽出物と残渣試料の放射能の合計。種実では総回収率はヘキサン及び水抽出物と残渣試料の放射能の合計。

c) POE-0.75-T 種実では同定/特徴付けされたものは水抽出物中で同定及び特徴付けされた放射能の合計 (注、水抽出物中の大部分を占める天然成分は SAX あるいは CX クロマトグラフィーで代謝物と分離できなかった)。POE-2.25-T では同定/特徴付けされたものはヘキサン抽出物と水及び塩酸抽出物中で同定及び特徴付けされた放射能の合計。

d) POE-2.25-T 種実ではヘキサン抽出物、水及び塩酸抽出物及び抽出残渣中の放射能分布は POE-2.25-T 種実の大容量抽出から得た (付表 F 参照)。  
—は検出せず。

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

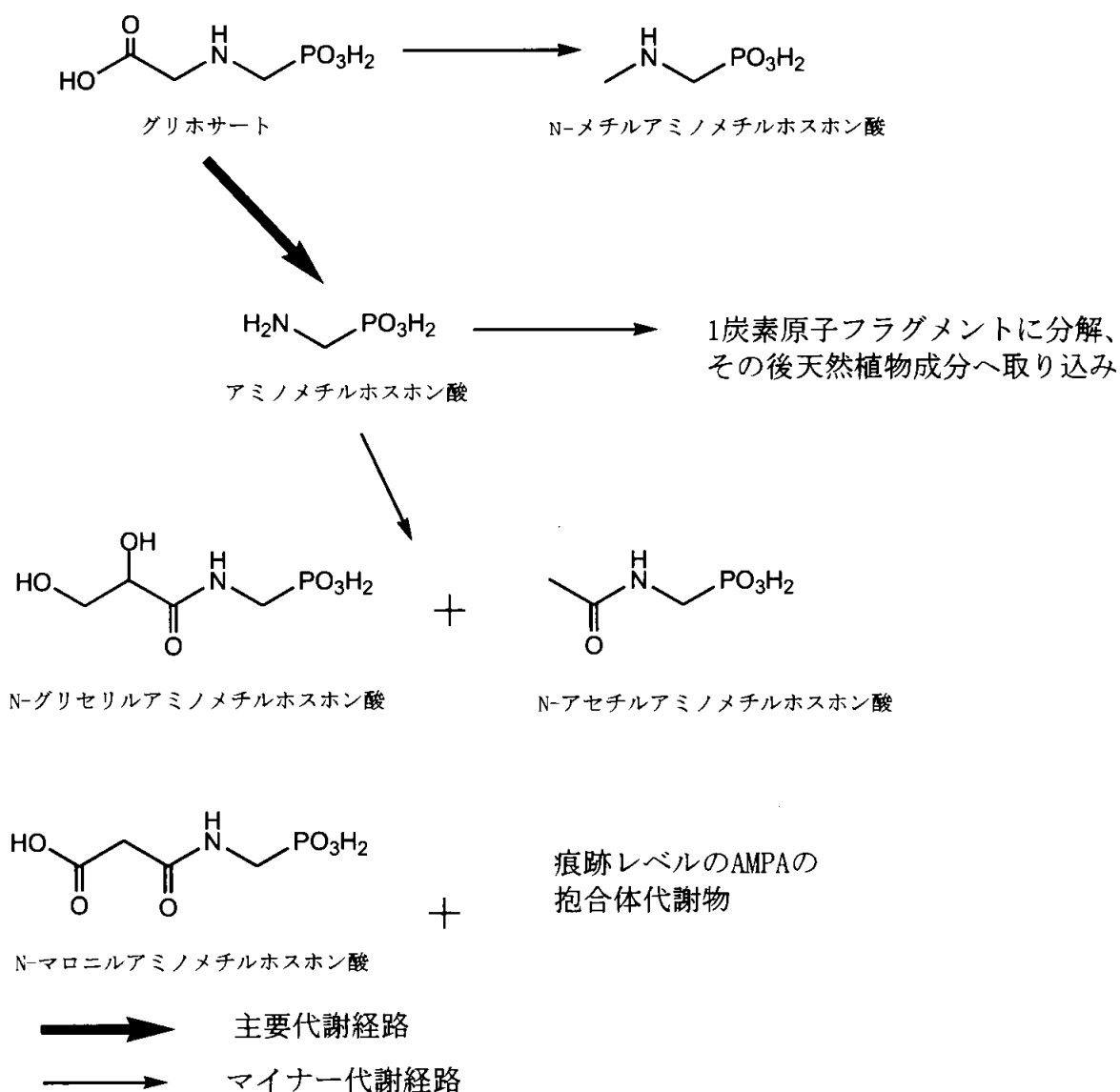
4) 代謝

各試料中で同定された代謝物を表8にまとめ、またその想定代謝経路を図4に示す。

表8 <sup>14</sup>C 標識グリホサート処理したダイズ試料中の同定された代謝物

試料	化合物名
未成熟茎葉部	グリホサート、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
成熟茎葉部	グリホサート、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、N-グリセリルアミノメチルホスホン酸
種実	グリホサート、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、N-グリセリルアミノメチルホスホン酸、N-アセチルアミノメチルホスホン酸、N-マロニルアミノメチルホスホン酸

図4 グリホサートのダイズにおける想定代謝経路





(資料 No. 10-7)

(7) グリホサート耐性コムギにおけるグリホサートの代謝試験

試験機関 :

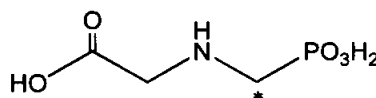
[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000 年

供試化合物 : (一般名 : グリホサート)

標識体

化学構造 :



\*: 標識部位「窒素とホスホン酸エステル部位間の炭素原子(ホスホノメチレン炭素)を  $^{13}\text{C}$  および  $^{14}\text{C}$  で標識」

化学名 ; N-(ホスホノメチル) グリシン

	$^{14}\text{C}$ -標識体	$^{13}\text{C}$ -標識体
比放射能	39mCi/mmol	$^{13}\text{C}$ 存在比 >97%
放射化学的純度	99.6%	化学的純度 98%

標識位置の設定理由 ; 毒性的に重要な代謝物はいずれもホスホノメチレン炭素を含むこと。  
 $^{13}\text{C}$  標識はグリホサート由来残留物の同定を容易にするため。

非標識体

純度 ; 99.9%

処理溶液の調製 :  $^{14}\text{C}$ -標識体を  $^{13}\text{C}$ -標識体および非標識体で希釈して 4.59 mCi/mmol (60,259 dpm/ $\mu\text{g}$ 、放射化学的純度 99.2%) の試験標識体とした。これを水に溶解、イソプロピルアミンを添加混合、さらに水で希釈して  $^{14}\text{C}$ -標識体 4.62 mg/g 溶液 ( $2.7825 \times 10^8$  dpm/g) の処理溶液を調製した。

供試植物 : コムギ (品種名 : ラウンドアップ・レディ® CP4 EPSPS 発現遺伝子導入コムギ)  
このコムギは *Agrobacterium*, sp. strain から分離した CP4 株にグリホサート耐性である EPSPS (5-エノールピルピル-シキミ酸-3-リン酸 合成酵素) をコード化して作出した遺伝子 CP4 EPSPS を導入したものを品種 Bobwhite に戻し交配して作出した。

栽培環境 : 屋外の土壌表面上に設置した容器中で栽培した。

栽培場所 : カリフォルニア州ワトソンビル

試験容器 : 約 76 cm x 91 cm x 深さ 46 cm の木枠に Elkhorn 微砂質壤土を充填した。1 区 2 容器として処理区と無処理区を近接した場所に設置し、 $^{14}\text{CO}_2$  の取り込みを調べた。

播種 : 容器の端から約 14cm 離して条間約 13cm とし、種子約 3 個/2.5cm ずつ播種した。

処理方法 : できるだけ、推奨慣行圃場処理方法を模して処理した。

処理量 ; 0.84 kg ae/ha (ae とはグリホサート酸換算の薬量)

処理時期 : 1 回目処理 (播種 30 日後) - 5 葉期、草丈約 32~36 cm、分けつ 1~3 本/植物 (デシマルコード 15)

2 回目処理 (1 回目処理 12 日後) - 7~8 葉期、草丈約 53 cm (植物の約 10% がデシマルコード 43 で、穂孕前期)

散布方法 : 加圧式手動噴霧器で全面茎葉処理。

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。

試料の採取：植物の約 10% (12 植物/容器) を各収穫時に地表面から約 2.5 cm の部位で切り取り、処理区別に 1 試料とした。最終収穫は残りの全植物を地上約 5 cm 部位で刈り取った。

採取物	採取時期		採取時の試料の状態	
	1 回目からの 処理後日数	2 回目からの 処理後日数		
青刈茎葉	5 日	-	デシマルコード 30、6 葉期、分けつ 2~4 本/植物、草丈 41 から 43 cm	
乾草	未熟状態で 収穫	36 日	24 日	デシマルコード 73~77、乳熟期に収穫。6 日間風乾し、乾燥茎葉を採取 (穀粒、茎葉の水分測定用試料各 5g 採取)。
	乾燥状態で 収穫	42 日	30 日	乾重量を測定。(穀粒、茎葉の水分測定用試料各 5g 採取)。
藁/穀粒	96 日	84 日	成熟時に穂は切り取り、1~3 日間乾燥後、穀粒と籾殻に分離。 藁は地上約 5 cm 部で刈り取り。	

### 分析方法

採取試料の処置：ドライアイスの存在下で以下の処理を行った。

茎葉 (青刈り、乾草 (未熟、乾燥))：フードプロセッサーを用いて均質化。

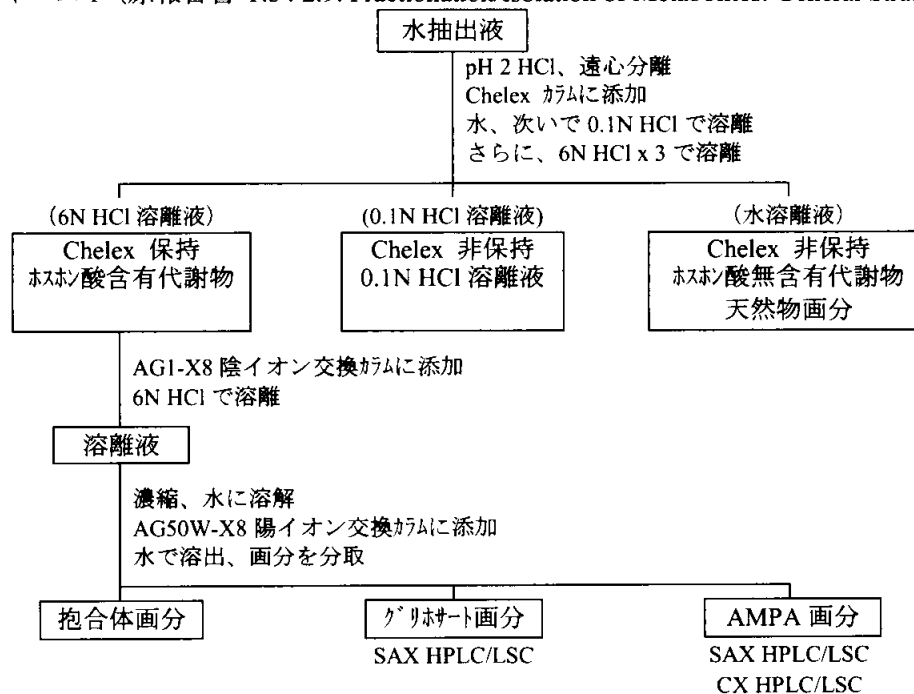
穀粒：コーヒー豆用グラインダーを用いて均質化。

藁および籾殻：両試料を合わせた後、ミキサーで細断・混合して均質化。

放射能の抽出/分画：均質化試料に 3~4 倍量の水を加えて振盪抽出を 4 回 (茎葉部は 2 回) 繰り返した後 (PTRL では茎葉部は 2 回、穀粒は 3 回抽出)、遠心分離・濾過して上清を得た。さらに、乾草および藁は水/アセトニトリル(80/20、v/v)を用いて同様に抽出した。

試料からの代謝物の分画/単離はスキーム 1 に従い分画した。

スキーム 1 (原報告書 P.34 2.9. Fractionation/Isolation of Metabolites: General Strategy)

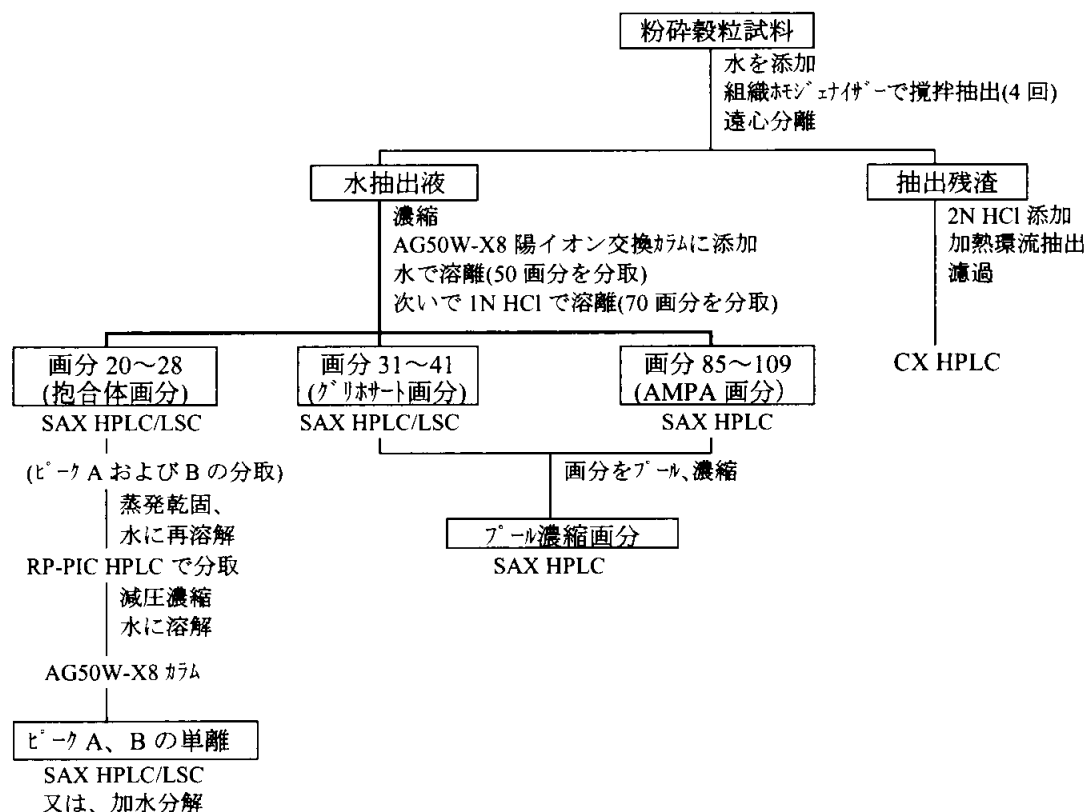


スキーム 1 では抱合体画分中の 3 個の微量代謝物のうち 2 個 (AMPA 抱合体および

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/AMPA-アセチル化抱合体)は強酸性条件下で不安定であることが確認されたので、穀粒からの代謝物の分離では抽出液を直接 AG50W-X8 陽イオン交換カラムに添加し、スキーム 2 に従って分画/単離した。抱合体画分中のピーク A は SAX HPLC で N-グリセリル-AMPA と共溶出した。さらに、1N HCl を用い、加水分解した(これらの結果から、N-アセチル-AMPA および AMPA 抱合体と同定)。ピーク B は SAX HPLC で主要成分 1 個と、多数の微量成分が得られた。そこで、濃塩酸加水分解で 2 つの主要成分 (AMPA およびグリホサート) を得た。希塩酸加水分解で、AMPA およびグリホサートの他に N-アセチル-AMPA が得られた(これらの結果から、主要成分は N-アセチル-AMPA およびグリホサート抱合体と同定)。AMPA を無水酢酸/ピリジン(2:1, v/v)の混液中でアセチル化して確認した。

スキーム 2 : 穀粒 (原報告書 P.64 Figure 4., P.65 Figure 5., P.66 Figure 6. 及び P.67 Figure 7.)



代謝物の分析 : HPLC/LSC で各試料の定量分析を行ったが、代謝物は高極性で、水溶性であるために、1 つの HPLC 法では成分の分離ができなかったため、以下の HPLC 法で分析した。

SAX HPLC 法 : 強陰イオン交換クロマトグラフィー

カラム : SAX

プレカラム : AX

溶媒 : A ; 4%MeOH 添加 0.005M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH2.0

B ; 4%MeOH 添加 0.100M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH2.0

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。

CX HPLC 法：強陽イオン交換クロマトグラフィー

カラム：SCX  
プレカラム：ODS  
溶媒：0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

アミノ HPLC 法：アミノカラムクロマトグラフィー（天然物分析用）

カラム：NH<sub>2</sub>  
プレカラム：NH<sub>2</sub>  
溶媒：A；アセトニトリル  
B；水

RP-PIC HPLC 法：逆相イオンペアークロマトグラフィー（抱合体画分の単離用）

カラム：ODS  
プレカラム：ODS  
溶媒：A；アセトニトリル  
B；0.01M 水酸化テトラブチルアンモニウム、0.01M 酢酸

RP HPLC 法：逆相クロマトグラフィー（誘導体化 AMPA 代謝物の分析用）

カラム：ODS  
プレカラム：ODS  
溶媒：A；アセトニトリル  
B；水

代謝物の誘導体化：代謝物/グリホサート混合物含有試料を反応バイアルに入れて、濃縮後、残渣をトリフルオロエタノールに溶解し、次いで、無水トリクロロ酢酸を加えて 100℃で反応させた。反応液を室温で蒸発乾固させ、得られた誘導体をアセトニトリルに溶解し、RP HPLC/RAD および MS (GC/EI/MS または LC/ISP/MS) で分析した。同時にグリホサートおよび AMPA の標品を用いて同様に誘導体を合成・分析して代謝物を同定した。

総放射能の測定：抽出前試料中の総放射能 (TRR)<sup>1</sup> および風乾後の抽出残渣中の総放射能はその一部を燃焼して生成した <sup>14</sup>C<sub>2</sub>O を捕集液に捕集して、液体試料（抽出液および HPLC 画分）の放射能は液体シンチレーションカウンター (LSC) で計測した。

保存安定性の確認：試料採取 3 週間以内に処理、抽出して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。試料は冷凍保存し、再度、分析実験の終了する頃（茎葉部は 271 日後、穀粒は 174 日）に分析して確認した。

結果：ppm は全てグリホサート当量 ppm を示す。

総放射性残留物(TRR)および放射能の部位別分布

グリホサート除草剤をコムギの生育期に 2 回処理し、処理後のコムギ試料中における TRR の分布を表 1 に示した。

<sup>1</sup> TRR はモンサントカンパニーおよびプラント サイエンス インク (PTRL) の両者で計測した。

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 1 コムギ試料の収穫量および試料中の総放射能の分布 (分析 2 試験機関の比較)  
(原報告書 P.52 Table VII及び P.53 Table IX)

試料	試験群	PHI <sup>a</sup>	収穫量 (g)	水分含量 (%)	TRR(ppm)	
					PTRL	モンサント
青刈茎葉	無処理区	5	90.8	85.97	<0.01 <sup>b</sup>	NA
	処理区	5	126.0	85.96	18.30	20.22
乾燥状態で 収穫した乾草	無処理区	30	204.0	28.88	0.015	NA
	処理区	30	234.0	29.51	27.72	27.83
藁	無処理区	84	810.0	15.09	0.029	NA
	処理区	84	828.0	12.63	39.16	34.81
穀粒	無処理区	84	906.0	13.82	0.022	NA
	処理区	84	931.0	13.51	12.37	12.12

NA:分析せず

<sup>a</sup>:青刈茎葉は1回処理後、その他は2回目処理後収穫までの日数

<sup>b</sup>:無処理区の青刈茎葉の放射能は検出限界以下

処理区のコムギ試料中の各部位の TRR は 12.12~34.81ppm の範囲にあり、穀粒の放射能が最も少なかった。これに対して、無処理区の試料中の放射能は 0.029ppm 以下であった。検体の処理は土壌面を含め全面茎葉処理をしたので、土壌中における <sup>14</sup>C-標識体の分解に由来する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込みの結果であると考えられる。しかし、無処理区試料中の放射能は処理区の試料中放射能の 0.2% 以下に過ぎないことから、処理区試料中の残留放射能のほとんどは <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 由来ではなく、<sup>14</sup>C-標識体に由来すると考えられる。無処理区は <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込みをモニターすることを目的として設けたので、無処理区の試料についてはこれ以上の分析はしなかった。

TRR は両試験機関でほぼ類似していた。以降の分析にはモンサントのデータを基に全ての計算を行った。

#### 放射能の抽出性および分画

コムギの各部位別試料中放射能の抽出性および分画結果を表 2 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日本モンサント株式会社にある。

表2 コムギの各部位別試料中放射能の分画 (原報告書 P.54 Table X及びP.76 Figure 16, P.79 Figure 19, P.82 Figure 22, P.85 Figure 25, P.95 Figure 35)

画分	青刈茎葉		乾草		藁	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm
総放射能	100	20.22	100	27.83	100	34.81
水抽出液	92.33	18.67	93.33	25.97	84.17	29.80
Chelex 6N HCl	78.23	15.82	(83.88)	(23.34)	(80.07)	(27.87)
AGI-X8 陰イオン交換カラム	86.95		89.09	24.79	78.32	27.26
AG50W-X8 陽イオン交換カラム	89.38		88.38		79.14	
抱合体画分	0.44	0.09	104.06		73.26	
グリホサート画分	<b>0.44</b>	<b>0.09</b>	1.17	0.33	2.63	0.92
AMPA 画分	<b>87.39</b>	<b>17.67</b>	<b>94.71</b>	<b>26.36</b>	<b>62.94</b>	<b>21.91</b>
Chelex 0.1N HCl	<b>0.95</b>	<b>0.19</b>	<b>7.30</b>	<b>2.03</b>	<b>6.54</b>	<b>2.28</b>
Chelex 水溶離液	0.05	0.01	0.07	0.02	0.18	0.06
抽出残渣 (結合残渣)	0.26	0.053	<b>1.10</b>	<b>0.31</b>	<b>1.44</b>	<b>0.50</b>
総回収率 (水抽出による)	2.45	0.49	3.86	1.07	8.06	2.81
			(7.13)	(1.98)	(5.31)	(1.85)
総回収率 (水抽出による)	94.78	19.16	97.19	27.04	92.23	32.11

画分	穀粒(1)		穀粒(2)	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm
総放射能	100	12.12	100	12.12
水抽出液	89.61	10.86	89.97	10.90
Chelex 6N HCl	83.42	10.11	-	-
AGI-X8 陰イオン交換カラム	87.52		-	-
AG50W-X8 陽イオン交換カラム	87.75		84.64	
抱合体画分	1.19	0.14	<b>3.34</b>	<b>0.40</b>
グリホサート画分	<b>74.56</b>	<b>9.04</b>	<b>69.39</b>	<b>8.41</b>
AMPA 画分	<b>10.99</b>	<b>1.33</b>	<b>10.40</b>	<b>1.26</b>
Chelex 0.1N HCl	0.13	0.02	-	-
Chelex 水溶離液	<b>1.54</b>	<b>0.19</b>	-	-
抽出残渣 (結合残渣)	14.32	1.74	14.68	1.78
総回収率 (水抽出による)	103.93	12.60	104.65	12.68

青刈茎葉、乾草、藁および穀粒(1)：スキーム1による分画  
 ( )内の数値：水/アセトニトリル (80:20) 混液による抽出  
 太字の画分：HPLC/LSC 分析に供した。

穀粒(2)：スキーム2による分画  
 -：該当なし

放射能の総回収率は92~104%TRRと良好であった。

残留放射能の大部分は水で抽出され、コムギの各部位で最も多い画分はグリホサート画分で約60~90%TRRを占めていた。次いで、AMPA画分が多く、約7~10%TRR(青刈りを除き)を占めていた。抽出残渣は青刈茎葉および乾草で2~4%TRR、藁で8%、穀粒で14%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。

### 残留の特性

表3に青刈茎葉、乾草、藁および穀粒について、強塩基性陰イオン交換 (SAX HPLC) および陽イオン交換 (CX HPLC) の両方で分析した結果をそれぞれ示す。

表3 コムギの各部位別試料中放射能の残留の特性 (原報告書 P.32 Table IV, V, 及び P.33 Table VI, VII)

試料	ピークの特性	SAX HPLC			CX HPLC			平均	
		分布割合%	ppm	%TRR	分布割合%	ppm	%TRR	ppm	%TRR
青刈茎葉	AMPA	**	**	**	0.82	0.15	0.76	**	**
	グリホサート	96.94	18.10	89.50	96.80	18.07	89.38	18.09	89.44
	天然物	0.29*	0.06*	0.26*	**	**	**	**	**
	N-グリセリン-AMPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	AMPA 抱合体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	0.48	0.09	0.44	**	**	**	**	**
乾草	AMPA	**	**	**	3.72	0.96	3.45	**	**
	グリホサート	89.77	23.32	83.78	89.93	23.36	83.93	23.34	83.86
	天然物	1.50*	0.39*	1.40*	**	**	**	**	**
	N-グリセリン-AMPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	AMPA 抱合体	0.36	0.09	0.34	**	**	**	**	**
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	1.59	0.41	1.48	**	**	**	**	**
藁	AMPA	**	**	**	6.04	1.77	5.08	**	**
	グリホサート	82.23	24.09	69.21	82.18	24.08	69.17	24.09	69.19
	天然物	1.99*	0.58*	1.68*	**	**	**	**	**
	N-グリセリン-AMPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	AMPA 抱合体	1.73	0.51	1.46	**	**	**	**	**
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	2.87	0.84	2.42	**	**	**	**	**
穀粒	AMPA	**	**	**	12.02	1.31	10.77	**	**
	グリホサート	81.75	8.88	73.26	79.83	8.67	71.54	8.78	72.40
	天然物	0.64*	0.06*	0.57*	**	**	**	**	**
	N-グリセリン-AMPA	0.38	0.04	0.34	**	**	**	**	**
	AMPA 抱合体	0.70	0.08	0.63	**	**	**	**	**
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	0.72	0.08	0.65	**	**	**	**	**

\* SAX HPLC (天然物+AMPA) 値から CX HPLC 値を減じて算出

\*\* 分離せず

平均値: SAX および CX HPLC の両方で十分分離しなかった代謝物については算出しなかった。

AMPAはCX HPLC/LSCで速く溶離する天然物から分離できた。グリホサートはSAX HPLC/LSCおよびCX HPLC/LSCの両方で十分分離したので平均値を算出した。その他の代謝物はCX HPLC/LSCでは分離しなかった。

表4にコムギの部位別代謝物の残留量を示す。

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。

表4 コムギの部位別代謝物の残留量 (原報告書 P.55 Table X I)

画分	青刈茎葉		乾草		藁		穀粒	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm
総放射能(TRR)	100	20.22	100	27.83	100	34.81	100	12.12
水溶性抽出液	92.33	18.67	93.33	25.97	84.17	29.30	89.61	10.86
親化合物(グリホサート)	89.44	18.09	83.86	23.34	69.19	24.09	72.40	8.78
AMPA	0.76	0.15	3.45	0.96	5.08	1.77	10.77	1.31
天然物	0.26	0.06	1.40	0.39	1.68	0.58	0.57	0.06
N-グリセリル-AMPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.34	0.04
AMPA 抱合体	ND	ND	0.34	0.09	1.46	0.51	0.63	0.08
グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	0.44	0.09	1.48	0.41	2.42	0.84	0.65	0.08
抽出残渣	2.45	0.49	3.86	1.07	8.06	2.81	14.32	1.74
総回収率	94.78	19.16	97.19	27.04	92.23	32.11	103.93	12.60
同定/特徴付けした合計	90.90	18.39	90.53	25.19	79.83	27.79	85.36	10.35

コムギの青刈茎葉、乾草、藁および穀粒中の主要残留は親化合物で、それぞれ TRR の 89、84、69 および 72% を占めていた。主要な代謝物は AMPA で TRR の 0.8~11% を占め、PHI 84 日の試料 (藁、穀粒) で最も多かった。N-グリセリル-AMPA は穀粒から 0.34%TRR 検出された。

グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体ならびにその他の AMPA 抱合体がそれぞれ <2.5%TRR 検出された。さらに、<sup>14</sup>C-グリホサートに由来する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> およびその他の炭素 1 個のフラグメントに由来する天然物 (<2%) も検出され、藁で最も多かった。同定特徴付けされた放射能は合計で 80~91% であった。

非抽出性 (抽出残渣中) 放射能は穀粒を除く全ての試料で <10%TRR であった。穀粒は 14%TRR を含み、酸加水分解で残渣中放射能の 76% が遊離し、SAX HPLC で分析したところ、遊離放射能の約 85% は植物の構成成分と強く結合したグリホサートおよび AMPA であった。

天然物画分(Chelex 非保持放射能)の SAX HPLC/LSC クロマトグラムの主要ピークをアミノ HPLC で分析した結果、数個の放射性ピークが認められ、最大のピークは乾草、藁および穀粒でそれぞれ画分中放射能の 26% (0.29%TRR)、29% (0.42%TRR) および 44% (0.68%TRR) を占めていた。この天然物はリン酸塩分子を含まない放射性成分で天然の植物成分であることを示唆している。同様の結果はラウンドアップレディ-遺伝子を含む他の作物でも確認されている。

#### 保存安定性試験

凍結保存中の残留放射の安定性を表 5 に示す。

試料採取 3 週間以内の分析結果と実験終了時の分析結果にほとんど差がなく、実験期間中グリホサート由来の代謝物は安定であった。



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 5 残留の保存安定性 (原報告書 P.56 Table X II, P.57 X III 及び P.58 X IV)

試料		青刈茎葉 <sup>a</sup>		穀粒 <sup>b</sup>	
		初回分析	最終分析	初回分析	最終分析
収穫後の日数	抽出 SAX HPLC	17	287	18	197
		18	288	23	197
抽出					
	抽出液 1	70.5	69.4	49.4	63.0
	抽出液 2	32.3	33.7	22.3	18.5
	抽出液 3	-	-	8.5	5.2
	合計抽出回収率	102.8	103.1	80.2	86.7
SAX HPLC					
	グリホサート	98.3	98.1	85.2	86.6
	AMPA+天然物	1.1	1.35	12.9	12.9

- : 抽出せず

<sup>a</sup>: 青刈の抽出液 1 および 2 を別々に分析し、結果は平均値で示した。

<sup>b</sup>: 穀粒の抽出液は合わせて SAX HPLC /LSC で分析した。

## 結論

ラウンドアップ®除草剤をラウンドアップ・レディ遺伝子を有するコムギの生育中に実用慣行処理量で合計 2 回全面茎葉処理して処理後の残留放射能の特性を検討した結果、主要な残留は親化合物のグリホサートでコムギの各部位の残留の 70~90% を占め、主要な代謝物であるアミノメチルホスホン酸 (AMPA) は 1~11% を占め、成熟時収穫試料 (藁、穀粒) で最も多かった。

グリホサートはアミノメチルホスホン酸 (AMPA) に緩やかに代謝される。微量代謝物として、N-グリセリル-AMPA およびその他のグリホサート/AMPA 抱合体が検出され、2.5% TRR 以上を占める代謝物はなかった。代謝経路は他のラウンドアップ®耐性作物および非耐性作物で認められている経路と同じであった。以下に想定代謝経路を示した。

