

(8) グリホサート耐性トウモロコシにおけるグリホサートの代謝試験

試験機関：

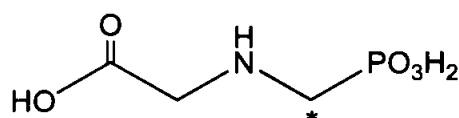
[GLP 対応]

報告書作成年： 1995 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	14.4 mCi/mmol	$^{13}\text{C}$ 存在比 99%
放射化学的純度	99.29%	化学的純度 99%

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；99.8%

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 5.81 mCi/mmol (76272 dpm/ $\mu\text{g}$ 、放射化学的純度 >98%) 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 6.22 mg/g 溶液 (0.2138 mCi/g) の処理溶液を調製した。

供試植物：トウモロコシ (品種名：Jeremy 遺伝型 #599-4-2；ラウンドアップ・レディ®CP4 EPSPS および GOX 遺伝子導入トウモロコシ) を研究用の遺伝資源としてイリノイ大学で管理している MaizeGDB (Maize Genetics and Genomics Database) に登録されている品種 Hi-II に戻し交配して作出した。

栽培環境：2棟の温室内に設置した容器中で、土壌被覆区と無被覆区は分けて、それぞれの温室で栽培した。

栽培場所：ミズリー州 コロンビア ABC ラボラトリーズの温室内

試験容器：約 86 cm x 236 cm x 深さ 58 cm の大型スチールタンクに Elkhorn 微砂質壤土を充填した。

播種：播種間隔 5~8 cm で条間約 50 cm の 2 条蒔きとした (50 種子/容器)。

処理方法： $^{14}\text{C}$ -標識体の土壌との接触による微生物分解由来の  $^{14}\text{CO}_2$  取り込みによる放射能の残留をできるだけ少なくするために、処理時に土壌表面を被覆して処理した土壌被覆区と無被覆区を設けた。できるだけ、推奨慣行圃場処理方法を模して処理した。

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。

試験区：処理薬量および処理時期を以下に示す。

処理薬量/処理時期		対照区		処理区	
		土壤被覆 (CP)	土壤無被覆 (CN)	土壤被覆 (TP)	土壤無被覆 (TN)
処理薬剤		非標識体		<sup>14</sup> C-標識体	
実処理薬量 (グリホサート酸として)	1回目(kg ae/ha)	0.84	0.84	0.92	0.93
	2回目(kg ae/ha)	0.84	0.84	0.84	0.84
処理時期	1回目処理(播種後) (葉期)	42日	43日	42日	43日
		5~6葉期			
	2回目処理(1回目処理後) (葉期)	30日	29日	30日	29日
		10~12葉期			

aeとはグリホサート酸換算の薬量

散布方法：加圧式手動噴霧器で全面茎葉処理。

試料の採取：

土壤：1回目処理直後、2回目処理直後(0日)、3、49、53および83日後に土壤表面から約30cmの深さまでの土壤を容器当り3コアを採取し、約15cmの部位で二分し、部位別に1試料とした。

植物：植物試料は表1のように採取した。

表1 試料採取時期および収穫本数(原報告書 P.175 TABLE IV)

試験区/土壤の被覆			対照区		処理区	
			CP	CN	TP	TN
処理検体			非標識体		<sup>14</sup> C-標識体	
採取時期 /部位	1回目処理直後	未熟植物	6	7	7	7
	2回目処理直後	未熟植物	5	4	6	4
	3日	青刈り茎葉	8	8	4	4
		青刈り茎葉洗浄	-	-	4	4
	49日	サイレージ	-	8	-	4
		サイレージ洗浄	-	-	-	4
	53日	サイレージ	8	-	4	-
		サイレージ洗浄	-	-	4	-
83日	成熟植物	21	20	20	20	

-: 該当なし

採取試料の処置：ドライアイスの下で以下の処理を行った。

未熟植物：フードプロセッサーを用いて均質化。

青刈り茎葉、サイレージ、成熟茎葉：カッター/ミキサーで処理。

穀粒：製粉用ミルを用いて粉砕。

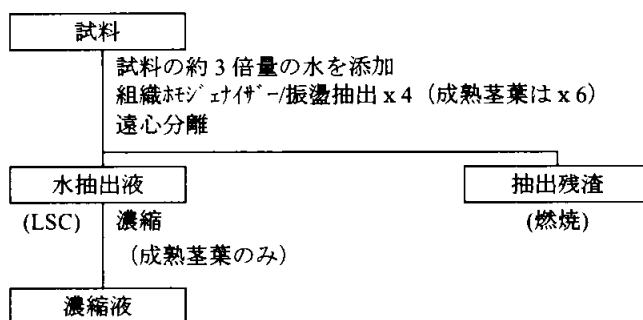
土壤：ブレンダーを用いて処理。

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。

放射能の抽出/分画：均質化試料に3倍量の水を加えて振盪抽出を4回（成熟茎葉は6回）繰り返した後、遠心分離・濾過して上清を得た。

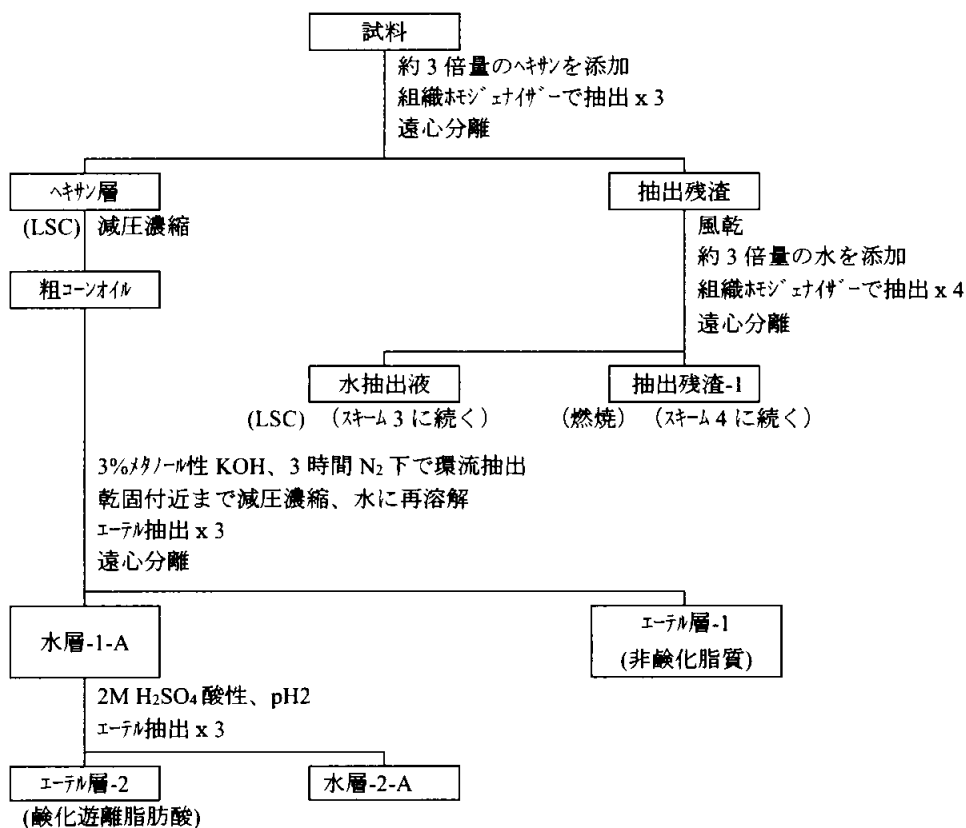
青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉の抽出：<sup>14</sup>C-標識体処理区の青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉は以下のスキームに従って抽出した。対照の土壤無被覆区の成熟茎葉も同様に水で3回抽出した。

スキーム 1（原報告書 P.79 Figure 4）



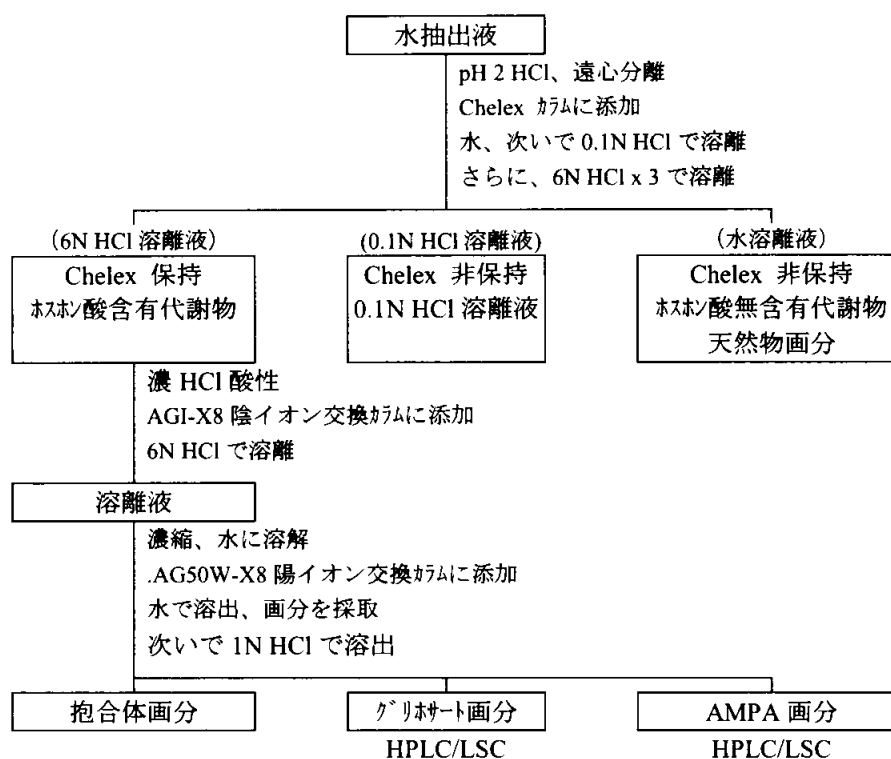
スキーム 2（原報告書 P.231 Figure 1）

穀粒の抽出：<sup>14</sup>C-標識体処理区の穀粒は以下のスキームに従って抽出した。対照の土壤無被覆区の穀粒も粗コーンオイルの分画を除いて同様に抽出した。



成熟茎葉および穀粒からの代謝物の分画/単離はスキーム 1 あるいは 2 により抽出した水抽出液を用いスキーム 3 に従い分画した。

スキーム 3 (原報告書 P.45 Scheme 1)

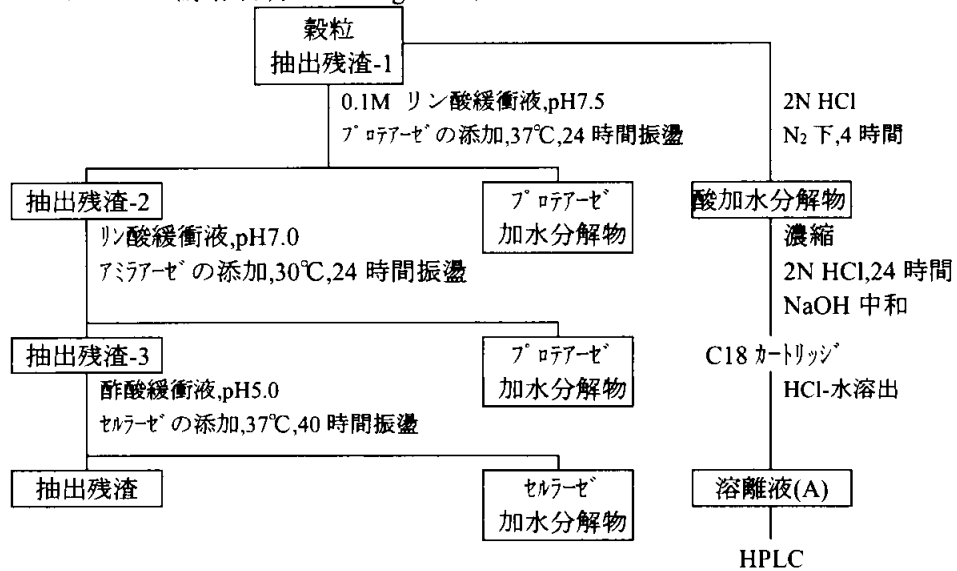


TN-成熟茎葉の抱合体画分の SAX HPLC/LSC で主要な二つのピーク(AおよびB)が認められ、ピーク A は N-グリセリル-AMPA と共溶出した。さらに、1N HCl を用い、加水分解した(これらの結果から、N-アセチル-AMPA および AMPA 抱合体と同定)。ピーク B は SAX HPLC で主要成分 1 個と、多数の微量成分が得られた。そこで、同様に酸加水分解で 2 つの主要成分 (AMPA およびグリホサート) を得た (これらの結果から、主要成分は AMPA およびグリホサート抱合体の混合物と同定)。

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。

穀粒の抽出残渣の分画<sup>1</sup>：スキーム4に従い穀粒の抽出残渣の分画を行った。

スキーム4 (原報告書 P.259 Figure 29)



代謝物の分析：HPLC/LSC で各試料の定量分析を行ったが、1つの HPLC 法では成分の分離ができなかったため、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。

CX HPLC 法 1A：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

ガードカラム：CX

溶媒：4%MeOH 添加 0.005 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.0

CX HPLC 法 1B：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

ガードカラム：CX

溶媒：0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

SAX HPLC 法 2：強陰イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SAX

ガードカラム：AX

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

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

RP HPLC 法 3：逆相クロマトグラフィー (コーンオイル/酸化脂肪酸の分析用)

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.5

B；100%メタノール

<sup>1</sup>：ゼノバイオティックラボラトリーズ インクで実施

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。

RP HPLC 法 4 : 逆相クロマトグラフィー (コーンオイル/非飽和脂肪酸の分析用)

カラム : ODS  
ガードカラム : ODS  
溶媒 : A ; 水  
B ; アセトニトリル

アミノ HPLC 法 5 : 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>カラム  
ガードカラム : ODS  
溶媒 : A ; 100%水  
B ; 100%アセトニトリル

RP HPLC 法 6 : 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  
ガードカラム : ODS  
溶媒 : A ; 100%水  
B ; 100%アセトニトリル

SAX HPLC 法 7 : 強陰イオン交換クロマトグラフィー (抱合体画分の酸加水分解物の分析用)

カラム : SAX  
ガードカラム : AX  
溶媒 : A ; 4%MeOH 添加 0.050 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
B ; 4%MeOH 添加 0.200 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

RP-PIC HPLC 法 8 : 逆相イオンペアークロマトグラフィー (抱合体画分の分析用)

カラム : ODS  
ガードカラム : ODS  
溶媒 : A ; 0.01 M 水酸化テトラブチルアンモニウム+0.01 M 酢酸  
B ; 100%アセトニトリル

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°C で反応させた。反応液の溶媒を蒸発させ、得られた誘導体を酢酸エチルに溶解し、RP HPLC/RAD および MS (GC/EI/MS または GC/PIC/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。

穀粒抽出残渣-1 の酸加水分解物を C18 カートリッジで精製後の溶離液(A)をトリメチルシリル化誘導体として GC/MS で分析した。

粗コーンオイルからの水層-2-A 画分、C18 カートリッジの溶離液(A)の HPLC 溶出液、グリセロールおよび <sup>14</sup>C-グルコースを無水酢酸と反応させてアセチル化誘導体とし、塩化メチレンに溶解して HPLC および GC/MS で分析した。

総放射能の測定 : 抽出前試料中の総放射能 (TRR) 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>CO<sub>2</sub> 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 5 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 (表 2) に分析して確認した。

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

表 2 保存安定性の確認時期 (試料採取後抽出または分析までの日数)  
(原報告書 P.73 Table 4.1)

	初回抽出/分析	保存抽出液/分析	最終抽出/分析
TP-青刈り茎葉			
水抽出	31	31	350
SAX-HPLC	35	359	359
TN-成熟茎葉			
水抽出	20	56	270
SAX-HPLC	26	279	280
TN-穀粒			
ヘキサン抽出	21	21	285
水抽出	22	22	285
SAX-HPLC	29	294	293

結果 : 残留量 ppm は全てグリホサート当量 ppm を示す。

総残留放射能(TRR)および放射能の部位別分布: トウモロコシ試料中の試料採取時および放射能抽出時の TRR の分布を表 3 に示した。

表 3 試料採取時および放射能抽出時に測定した総放射能(dpm/g)  
(原報告書 P.38 TABLE D)

試料部位	土壌被覆(TP 区)		土壌無被覆(TN 区)	
	採取時 <sup>a</sup>	抽出時 <sup>b</sup>	採取時 <sup>a</sup>	抽出時 <sup>b</sup>
青刈り茎葉	1,014,418	871,467*	823,737	904,939
サイレージ	694,838	922,497	731,448	832,228
成熟茎葉	1,136,453	1,637,692	1,456,795	2,172,106**
穀粒	52,246	50,128	79,323	78,669*

\* : 2 回測定の平均値      \*\* : 3 回測定の平均値

<sup>a</sup> : ABC ラボラトリーズ インクで分析

<sup>b</sup> : モンサントカンパニーで分析

両測定機関における青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉中の放射能の測定値については、均質化したとはいえ、茎葉処理による表面残留が不均一なために差が見られた。最も大きな差は成熟茎葉で見られ、大量の成熟茎葉試料から少量の均一試料を得ることの難しさを示している。穀粒中の残留放射能の差は少なかった。放射能回収率の計算には ABC Lab. の測定値を用いた。

トウモロコシ試料中の TRR(ppm)の分布を表 1 に示した。

表 4 トウモロコシ試料中の総残留放射能濃度の分布 (原報告書 P.62 TABLE M)

試料部位	PHI <sup>a</sup>	土壌被覆		土壌無被覆	
		<sup>14</sup> C-標識体 処理区	非標識体 処理区	<sup>14</sup> C-標識体 処理区	非標識体 処理区
		TP 区 (ppm)	CP 区 (ppm)	TN 区 (ppm)	CN 区 (ppm)
青刈り茎葉	3	13.3	0.002	10.8	0.017
サイレージ	49/53 <sup>b</sup>	9.11	0.011	9.59	0.049
成熟茎葉	83	14.9	0.043	19.1	0.129
穀粒	83	0.685	0.015	1.04	0.064

<sup>a</sup>: PHI=試料採取時期 (2 回目処理後収穫までの日数)

<sup>b</sup>: サイレージは土壌無被覆区からは PHI 49 日、土壌被覆区からは PHI 53 日に採取。

<sup>14</sup>C-標識体を処理した青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉中の残留放射能は土壌被覆区で 9.11~14.9 ppm、土壌無被覆区で 9.59~19.1 ppm の範囲にあった。土壌被覆区と土壌無被覆区間の残留の差は主として温室間の植物の生育の差にあると考えられる。穀粒中の残留放射能は土壌被覆区で 0.685 ppm、土壌無被覆区で 1.04 ppm であった。

これに対して、非標識体を処理した青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉中の残留放射能は土壌被覆区で 0.002~0.043 ppm、土壌無被覆区で 0.017~0.129 ppm の範囲にあった。穀粒中の残留放射能は土壌被覆区で 0.015 ppm、土壌無被覆区で 0.064 ppm であった。非標識体処理区 (対照) の残留放射能は植物の構成成分中への <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込み由来しており、土壌被覆区より土壌無被覆区で多かった。これは、土壌に処理/滴下した <sup>14</sup>C-標識体の土壌中における分解由来する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 取り込みの結果であることを示唆している。対照区の青刈り茎葉と比較して、成熟茎葉および穀粒中の残留が多いことは経時的に植物の組織中に <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> が徐々に取り込まれていることを示している。しかし、対照区の残留放射能は低濃度であることから、<sup>14</sup>C-標識体処理区の総残留放射能に対する取り込みの影響は小さいものと考えられる。

水による洗浄: 表 5 に処理後の残留放射能および青刈り茎葉およびサイレージの水による表面洗浄の影響を示した。

2 回目処理 3 日後の青刈り茎葉の総残留量は土壌無被覆区で 10.8 ppm、被覆区で 13.3 ppm であった。未吸収表面残留として、水による洗浄で 3.66 ppm (土壌無被覆区) および 4.58 ppm (土壌被覆区) が、回収され、洗浄後の青刈り茎葉中に 5.35 ppm (土壌無被覆区) および 4.87 ppm (土壌被覆区) が残留していた。

サイレージの残留量は 9.59 ppm (土壌無被覆区) および 9.11 ppm (土壌被覆区) で、水による表面洗液から 1.24 および 0.711 ppm が回収され、洗浄後のサイレージの残留は 5.44 および 4.53 ppm 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 未熟植物、青刈り茎葉、サイレージ、成熟茎葉および穀粒中の放射能の残留  
(原報告書 P.176 TABLE V)

PHI	試料		土壌被覆				土壌無被覆			
			<sup>14</sup> C-標識体		非標識体		<sup>14</sup> C-標識体		非標識体	
			(ppm)	水分%	(ppm)	水分%	(ppm)	水分%	(ppm)	水分%
1回目処理直後	未熟植物	無洗浄	34.4	89.8	0.00525	90.1	62.9	89.0	0.0128	89.5
2回目処理直後	未熟植物	無洗浄	8.96	88.0	0.00370	88.0	12.2	87.7	0.0140	89.2
3日後	青刈り茎葉 <sup>a</sup>	無洗浄	13.3	87.1	0.00213	88.3	10.8	87.4	0.0165	88.1
		洗浄後	4.87	88.3	-	-	5.35	87.4	-	-
		洗浄液	4.58	-	-	-	3.66	-	-	-
49/53日後 <sup>b</sup>	サイレージ <sup>a</sup>	無洗浄	9.11	60.4	0.0107	59.6	9.59	63.9	0.0486	60.1
		洗浄後	4.53	58.0	-	-	5.44	64.7	-	-
		洗浄液	0.711	-	-	-	1.24	-	-	-
83日後	成熟	穀粒	0.685	19.7	0.0146	20.1	1.04	12.5	0.0639	16.6
		茎葉	14.9	53.7	0.0433	54.7	19.1	47.6	0.129	50.4

<sup>a</sup>: 異なる試料を使用したために、水で洗浄後の青刈り茎葉および洗浄液中の放射能の合計が無洗浄試料の放射能と一致しない。

<sup>b</sup>: 土壌無被覆区は2回目処理49日後、土壌被覆区は2回目処理53日後に採取した。

抽出性総放射能の分布: トウモロコシ試料中の抽出性残留放射能の分布を表6に示す。

表6 トウモロコシ試料中の抽出性残留放射能の分布 (原報告書 P.71 TABLE 2 及び P.72 TABLE3)

試料部位	TRR (ppm)	抽出性 ppm (%TRR)	結合残留 ppm(%TRR)	回収率 ppm(%TRR)
土壌被覆 TP				
青刈り茎葉	13.3	12.8 (96.2)	0.379(2.9)	13.2 (99.1)
サイレージ	9.11	8.52 (93.5)	0.403 (4.4)	8.92 (97.9)
成熟茎葉	14.9	14.2 (95.2)	0.676 (4.5)	14.86 (99.7)
穀粒	0.685	0.54 (79.2)	0.143(20.9)	0.685 (100.1)
ヘキサン抽出液		0.010 (1.5)		
水抽出液		0.532 (77.7)		
土壌無被覆 TN				
青刈り茎葉	10.8	10.0 (93.0)	0.307(2.8)	10.4 (95.8)
サイレージ	9.59	8.33 (86.8)	0.434 (4.5)	8.77 (91.4)
成熟茎葉	19.1	18.0 (94.4)	1.03 (5.4)	19.0 (99.7)
穀粒	1.04	0.84 (81.1)	0.242 (23.2)	1.09 (104.4)
ヘキサン抽出液		0.012 (1.2)		
水抽出液		0.831 (79.9)		
土壌無被覆 CN				
成熟茎葉	0.129	0.065 (50.3)	0.049 (37.8)	0.114 (88.1)
穀粒	0.064	0.009 (14.5)	0.053 (82.7)	0.062 (97.1)
ヘキサン抽出液		0.004 (6.9)		
水抽出液		0.005 (7.6)		

放射能の総回収率は91~104%TRRと良好であった。

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。

各試料中の残留放射能の 80%TRR 以上が水で抽出され、結合残留は穀粒で 20~23% TRR であったが、その他の試料では 5%TRR 以下であった。非標識体処理の土壤無被覆区(CN)では成熟茎葉中放射能の 50%TRR が水で抽出され、穀粒では約 83%TRR が結合残留であった。表 6 の水抽出性のデータ(%TRR)を定量に用いた。

放射能の抽出性および分画：

<sup>14</sup>C-標識体を処理したトウモロコシの TN 区の成熟茎葉および穀粒中放射能の抽出性および分画結果を表 7 に示す。

<sup>14</sup>C-標識体を処理した TN 区の試料中の TRR は成熟茎葉で 19.1 ppm、穀粒で 1.04 ppm であった。総回収率を 100%としたとき、成熟茎葉ではグリホサート画分は 55.2% TRR と最も多く、次いで、AMPA 画分は 15.8%TRR、天然物画分は 1.7%TRR で、抱合体画分は 1%TRR 以下と少なかった。穀粒では AMPA 画分は 48.5%TRR と最も多く、次いで、抱合体画分は 7.1%TRR、天然物画分は 5.2%TRR で、グリホサート画分は 1.7%TRR と少なかった。

表 7 <sup>14</sup>C-標識体処理(TN)区の成熟茎葉および穀粒中残留放射能の分画  
(原報告書 P.97 Figure 22 及び P.103 Figure 28)

画分	TN-成熟茎葉		TN-穀粒	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm
総放射能	100	19.1	100	1.04
ヘキサン抽出液			0.98	0.010
濃縮液			1.00	0.010
水抽出液	88.51	16.91	77.22	0.803
濃縮液	90.72	17.33		
Chelex 6N HCl	83.61	15.97	63.91	0.665
AGI-X8 陰イオン交換カラム	80.3	15.34	59.69	0.621
AG50W-X8 陽イオン交換カラム	79.52	15.19		
抱合体画分	0.86 (0.9)	0.164	7.33 (7.1)	0.076
グリホサート画分	<b>51.39</b> (55.2)	<b>9.82</b>	<b>1.80</b> (1.7)	<b>0.019</b>
AMPA 画分	<b>14.74</b> (15.8)	<b>2.82</b>	<b>50.14</b> (48.5)	<b>0.522</b>
Chelex 水溶離液 (天然物画分)	<b>1.59</b> (1.71)	<b>0.303</b>	<b>5.37</b> (5.2)	<b>0.056</b>
抽出残渣 (結合残渣)	4.52	0.863	25.27	0.263
総回収率 (水抽出による)	93.03		103.47	

残留の特性：

代謝物は高極性で、水溶性であるために、一つの HPLC 法では成分の分離ができなかった。強陰イオン交換 (SAX HPLC) および陽イオン交換 (CX HPLC) の両方で分析した。その結果を表 8-1 および 8-2 に TP 区および TN 区についてそれぞれ示す。

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 8-1 TP 区試料中の残留放射能の特性 (原報告書 P.41 TABLE E, F, P. 42 TABLE G 及び TABLE H)

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
青刈り 茎葉	AMPA	**	**	**	9.8	1.25	9.4	**	**
	グリホサート	83.9	10.74	80.8	84.0	10.75	80.9	10.75	80.9
	天然物	2.0*	0.25*	1.9	**	**	**	**	**
	N-グリセリル-AMPA	0.4	0.05	0.4	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	0.4	0.05	0.4	**	**	**	**	**
サイレ ージ	AMPA	**	**	**	9.7	0.82	9.0	**	**
	グリホサート	81.7	6.96	76.4	84.7	7.22	79.3	7.09	77.9
	天然物	2.8*	0.23*	2.6*	**	**	**	**	**
	N-グリセリル-AMPA	1.3	0.11	1.2	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	0.73	0.06	0.7	**	**	**	**	**
成熟茎 葉	AMPA	**	**	**	5.2	0.73	4.9	**	**
	グリホサート	86.6	12.28	82.4	88.4	12.53	84.1	12.4	83.3
	天然物	2.5*	0.36*	2.4*	**	**	**	**	**
	N-グリセリル-AMPA	1.2	0.17	1.2	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	1.4	0.2	1.3	**	**	**	**	**
穀粒	AMPA	**	**	**	69.6	0.37	54.1	**	**
	グリホサート	7.9	0.04	6.1	11.2	0.06	8.7	0.05	7.4
	天然物	4.2*	0.02*	3.2*	**	**	**	**	**
	N-グリセリル-AMPA	8.9	0.05	6.9	**	**	**	**	**

\* SAX HPLC データ (天然物+AMPA) および CX HPLC(AMPA)データから算出

\*\* 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。

表 8-2 TN 区試料中の残留放射能の特性 (原報告書 P.43 TABLE I, J, P.44 TABLE K 及び TABLE L)

ピークの特徴		SAX HPLC			CX HPLC			平均	
		分布割合 %	ppm	%TRR	分布割合 %	ppm	%TRR	ppm	%TRR
青刈り 茎葉	AMPA	**	**	**	17.1	1.72	15.9	**	**
	グリホサート	77.5	7.78	72.0	77.2	7.75	71.8	7.77	71.9
	天然物	2.4*	0.24*	2.2*	**	**	**	**	**
	N-グリセリ ル-AMPA	0.6	0.06	0.5	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	0.4	0.04	0.4	**	**	**	**	**
サイレ ージ	AMPA	**	**	**	15.1	1.26	13.1	**	**
	グリホサート	75.8	6.31	65.8	78.6	6.55	68.31	6.43	67.1
	天然物	4.0*	0.34*	3.5*	**	**	**	**	**
	N-グリセリ ル-AMPA	1.7	0.14	1.5	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	0.5	0.04	0.4	**	**	**	**	**
成熟茎 葉	AMPA	**	**	**	11.8	2.13	11.2	**	**
	グリホサート	77.6	13.99	73.3	80.8	14.55	76.2	14.27	74.8
	天然物	3.6*	0.65*	3.4*	**	**	**	**	**
	N-グリセリ ル-AMPA	1.7	0.31	1.6	**	**	**	**	**
	グリホサート 抱合体	2.0	0.36	1.9	**	**	**	**	**
穀粒	AMPA	**	**	**	75.4	0.63	60.3	**	**
	グリホサート	1.4	0.01	1.1	5.23	0.04	4.2	0.03	2.6
	天然物	4.5*	0.04*	3.6*	**	**	**	**	**
	N-グリセリ ル-AMPA	8.7	0.07	6.9	**	**	**	**	**

\* SAX HPLC データ (天然物+AMPA) および CX HPLC (AMPA) データから算出

\*\* 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 9 にトウモロコシの試料別水抽出液中の代謝物の残留量のまとめを示す。

ラウンドアップレディー遺伝子導入トウモロコシにおけるグリホサートの代謝は非耐性トウモロコシで既に報告されており結果と同じであった。グリホサートは主代謝物である AMPA に徐々に代謝された。グリホサートおよび AMPA は青刈り茎葉、サイレージ、成熟茎葉および穀粒でそれぞれ、TRR の少なくとも 87%、80%、86% および 61% を占めていた。

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

表9 トウモロコシの試料別水抽出液中の代謝物の残留量 ppm (%TRR) (原報告書 P.23 TABLE C)

試料	TRR(ppm)	グリホサート	AMPA	天然物	N-グリセリル-AMPA	グリホサート抱合体	合計 <sup>a</sup>
土壤被覆 TP							
青刈り茎葉	13.3	10.8 (80.9)	1.25 (9.4)	0.25 (1.9)	0.05 (0.4)	0.05 (0.4)	12.4 (92.9)
サイレージ	9.11	7.09 (77.9)	0.82 (9.0)	0.23 (2.6)	0.11 (1.2)	0.06 (0.7)	8.32 (91.4)
成熟茎葉	14.9	12.4 (83.3)	0.73 (4.9)	0.36 (2.4)	0.17 (0.12)	0.2 (1.3)	13.8 (93.1)
穀粒 <sup>b</sup>	0.685	0.05 (7.4)	0.37 (54.1)	0.02 (3.2)	0.05 (6.9)	-	0.63 <sup>d</sup> (91.8)
土壤無被覆 TN							
青刈り茎葉	10.8	7.77 (71.9)	1.72 (15.9)	0.24 (2.2)	0.06 (0.5)	0.04 (0.4)	9.8 (91.0)
サイレージ	9.59	6.43 (67.1)	1.26 (13.1)	0.34 (3.5)	0.14 (1.5)	0.04 (0.4)	8.2 (85.6)
成熟茎葉	19.1	14.27 (74.8)	2.13 (11.2)	6.5 (3.4)	0.31 (1.6)	0.36 (1.9)	17.7 (92.8)
穀粒 <sup>c</sup>	1.04	0.03 (2.6)	0.63 (60.3)	0.04 (3.6)	0.07 (6.9)	-	1.0 <sup>d</sup> (95.3)

<sup>a</sup>: 同定/特徴付けした残留の合計

<sup>b</sup>: 穀粒には鹸化性脂肪酸 0.009 ppm (1.3%TRR)および澱粉 0.13 ppm (18.8%TRR)を含む

<sup>c</sup>: 穀粒には鹸化性脂肪酸 0.01 ppm (1.0%TRR)および澱粉 0.22 ppm (20.9%TRR)を含む

<sup>d</sup>: 澱粉および脂肪酸を含む

穀粒のヘキサン抽出液中の残留の特性: 表 10 にコーンオイル画分を鹸化し、残留の特性を検討した結果を示す。

表 10 穀粒のヘキサン抽出画分 (コーンオイル画分) の特徴付け (原報告書 P.174 Table III)

画分	試料中割合 (%)	含有物質
ヘキサン抽出液	100	
エーテル層-1(非鹸化脂質)	11.85(10.5)	不完全分配による脂肪酸関連物質を含む。
水層-1-A	100.96(89.5)	
エーテル層-2 (鹸化脂質)	86.80(78.0)	主にパルミチン酸、オレイン酸、リノレイン酸
水層-2-A (水溶性極性代謝物)	12.79(11.5)	
		アセチル化物を特徴付けできなかった。

<sup>a</sup>: 同定/特徴付けした残留の合計( )内は抽出液中の総回収率を 100%としたときの各画分の回収率

コーンオイル試料を鹸化した結果、鹸化脂質画分 (エーテル層-2) にオイル中放射能の 78%が含まれており、主にパルミチン酸、オレイン酸、リノレイン酸であった。非鹸化脂質画分 (エーテル層-1) および水溶性極性代謝物画分 (水層-2-A) には約 10%が含まれていたが、放射性物質を容易に分析できなかった。

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

穀粒の抽出残渣中の残留の特性：穀粒の抽出残渣-1 を酵素加水分解した結果、以下のように分画できた。(原報告書 P.259 Figure 29)

酵素加水分解画分	試料中割合%
プロテアーゼ画分	33.49
アミラーゼ画分	19.72
セルラーゼ画分	19.60
残渣	34.27
回収率	107.08

また、酸加水分解物(抽出残渣-1の放射能の90.24%)のRP-HPLCおよびNH<sub>2</sub>-HPLCならびにアセチル化誘導体のGC/MS分析で主要放射能はコーンスターチのモノマーのグルコースであった。

これらの結果から、<sup>14</sup>C-グリホサートの一部は広範に代謝され、共通の代謝サイクルに入り、脂肪酸およびグルコースのような多くの天然物に取り込まれていることを示唆している。

保存安定性試験：凍結保存中の残留放射能の安定性を表11に示す。

実験期間中グリホサート由来の代謝物は安定であった。

表11 トウモロコシの残留放射能の保存安定性 (原報告書 P.73 Table 4.2)

	TRR (dpm/g)	ヘキサン抽出 (%TRR)	水抽出 (%TRR)	結合残渣 (%TRR)	回収率 (%)
TP-青刈り茎葉					
初回抽出	995,188	該当なし	96.2	2.9	99.1
最終抽出	747,747	該当なし	112.9	3.3	116.2
TN-成熟茎葉					
初回抽出	2,050,844	該当なし	94.4	5.4	99.7
中間時抽出	2,235,125	該当なし	88.5	4.5	93.0
最終抽出	2,230,349	該当なし	88.4	4.8	93.2
TN-穀粒					
初回抽出	75,945	1.2	79.9	23.2	104.4
最終抽出	81,393	1.0	71.1	24.0	96.1

土壌中における放射能の残留：表12に<sup>14</sup>C-標識体処理区の土壌中における残留放射能を示した。

表 12 標識体処理区の土壤中における放射能の残留 (原報告書 P.177 TABLE VI)

試料採取時期		0-15cm 層		15-30cm 層	
		土壌無被覆 (ppm)	土壌被覆 (ppm)	土壌無被覆 (ppm)	土壌被覆 (ppm)
1 回目処理	処理前	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	処理直後	0.051	0.001	<0.001	0.002
2 回目処理	処理直前	0.169	0.015	0.002	0.002
	処理直後	0.294	0.022	0.002	0.002
	49 日後	0.049	0.019	0.002	0.002
	53 日後	0.057	0.026	0.004	0.014
	83 日後	0.067	0.024	0.037	0.016

標識体処理区において土壌無被覆区の0~15 cm層における放射エネルギーは1回目処理直後で0.051 ppm、2回目処理直前および処理直後でそれぞれ0.169 ppmおよび0.294 ppmであった。青刈り茎葉採取時(処理後49日)で0.049 ppm、イレージ採取時(処理後53日)で0.057 ppm、成熟時(処理後83日)で0.067 ppmであった。15~30 cm層では成熟時に0.037 ppm検出された以外、0.004 ppm以下であった。土壌被覆区の0~15 cm層における放射エネルギーは1回目処理直後で0.001 ppmであったが、2回目処理後0.026 ppmを超える放射能は検出されなかった。15~30 cm層ではサイレージおよび収穫時に0.014および0.016 ppm検出された以外は全て0.002 ppm当量を超えることはなかった。

## 結論

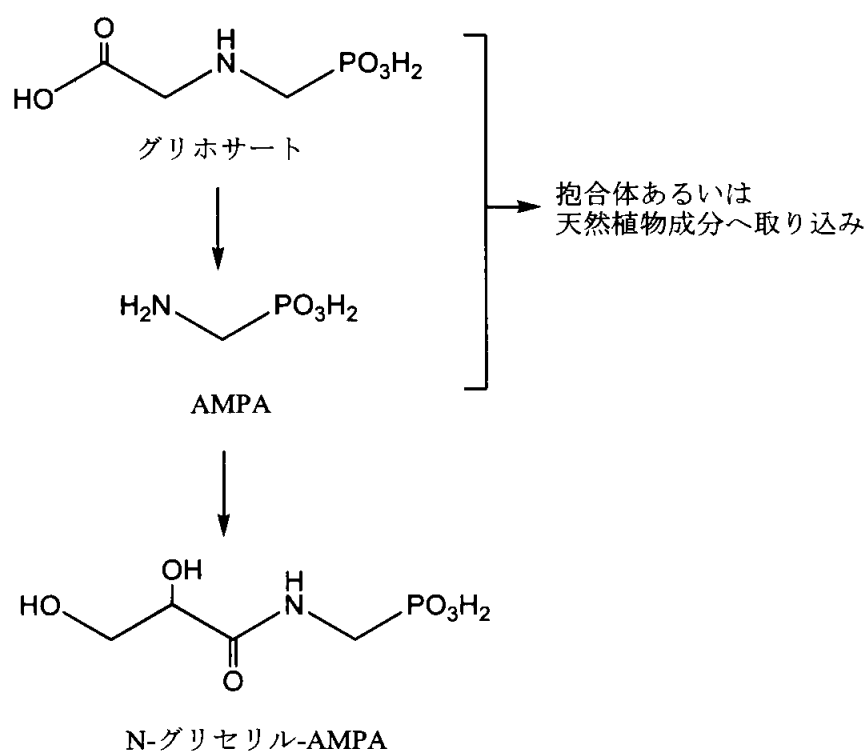
ラウンドアップ®除草剤をラウンドアップ・レディ遺伝子を有するトウモロコシの生育中に合計2回全面茎葉処理して処理後の残留放射能の特性を検討した結果、主要な残留は親化合物のグリホサートでトウモロコシの青刈り茎葉、サイレージおよび成熟茎葉中残留の67~83%TRRを占め、主要な代謝物であるアミノメチルホスホン酸(AMPA)は5~16%TRRを占めていた。穀粒中の残留はグリホサートが3%、AMPAが60%を占めていた。

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抱合体が同定された。最終的には、1炭素原子フラグメントに分解し、天然植物成分へ取り込まれた。

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。

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。

グリホサートのトウモロコシにおける想定代謝経路





(資料 No. 10-9)

(9) グリホサート耐性テンサイにおけるグリホサートの代謝試験

試験機関：

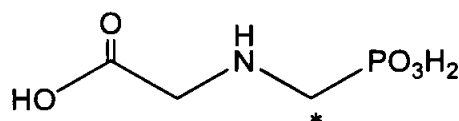
[GLP 対応]

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	39.36 mCi/mmol	$^{13}\text{C}$ 存在比 >97%
放射化学的純度	97.7%	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7.09 mCi/mmol (93080 dpm/ $\mu\text{g}$ 、放射化学的純度98.2%)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および界面活性剤を添加混合して処理用製剤とし、さらに水で希釈して $^{14}\text{C}$ -標識体として5.32 mg/g溶液( $4.95 \times 10^8$  dpm/g)の処理溶液を調製した。

供試植物：テンサイ 77 系統 (品種名：HME Empire RR；ラウンドアップ・レディ®CP4 EPSPS 遺伝子導入テンサイ) を品種 Empire に戻し交配して作出した。

栽培環境：播種後、処理するまでは屋外の土壌表面上に設置した容器中で栽培し、処理後は網室に移した。

栽培場所：カリフォルニア州ワトソンビル

試験容器：約 92 cm x 76 cm x 深さ 61 cm の木枠に Arnold 壤質砂土を充填した。

播種：容器当り播種密度約 3~4 種子/2.5 cm、深さ 2 cm、条間約 15 cm の 5 条蒔きとした。必要により適宜間引きした。

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。

試験区：群 1 と群 3 は 1 区域、群 2 と群 4 は別の区域の近接場所 (容器間隔 50 cm) に設置し、 $^{14}\text{C}$ -標識体の土壌分解に由来する  $^{14}\text{CO}_2$  をモニターした。

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。

処理薬量および処理時期を以下に示す。

(原報告書 P.111 MATERIALS AND METHODS - Test Site)

試験群	処理時期/処理薬量(kg ae/ha)		
	発芽前 (播種 1 日後)	1 回目生育期 (播種 35 日後) (2~4 本葉)	2 回目生育期 (播種 68 日後) (12~14 本葉期)
群 1 発芽前土壌処理区の 無処理対照	0	0	0
群 2 生育期茎葉処理区の 無処理対照	0	0	0
群 3 播種後発芽前 <sup>14</sup> C-標識体土壌処理	0.9 (0.93)	0	0
群 4 生育期 <sup>14</sup> C-標識体 2 回茎葉処理	0	1.08 (1.15)	1.08 (1.08)

ae とはグリホサート酸換算の薬量  
( )内の数値は実散布薬量

群 3：播種翌日に処理し、処理後 7 日間（発芽初期まで）は屋外の囲いの中で管理した。その後網室に移した。

群 4：細長い吸水紙を条間に敷いた後処理した。1 回目処理後 13 植物/容器に間引いた。2 回目も同様に処理して、処理後に間引き、最後に 4 株/容器を残した。

群 2：群 4 と同様に群 4 の 1 回目処理時に 13 植物/容器に間引き、2 回目処理時に 4 株/容器に間引いた。

各生育期茎葉処理後に処理区および無処理区の植物を間引き、水で洗浄して、対照の洗浄液に放射能がないことを確認した。

散布方法：Devillbiss 加圧式手動噴霧器で全面土壌および茎葉処理。

試料の採取：糖含有量が約 17~18%の成熟期に収穫した。(原報告書 P. 48 Table VI)

試験群	採取部位	収穫量(g)	水分含量(%)	処理後日数
1 (無処理)	茎葉部	4,517	ND	—
3 (発芽前土壌処理)	茎葉部	3,966	88.62	158 日
1 (無処理)	根部	3,478	ND	—
3 (発芽前土壌処理)	根部	3,526	80.80	158 日
2 (無処理)	茎葉部	4,693	ND	—
4 (生育期茎葉処理)	茎葉部	3,678	84.32	91 日 / 124 日*
2 (無処理)	根部	3,120	ND	—
4 (生育期茎葉処理)	根部	3,931	79.80	91 日 / 124 日*

ND : Not determined

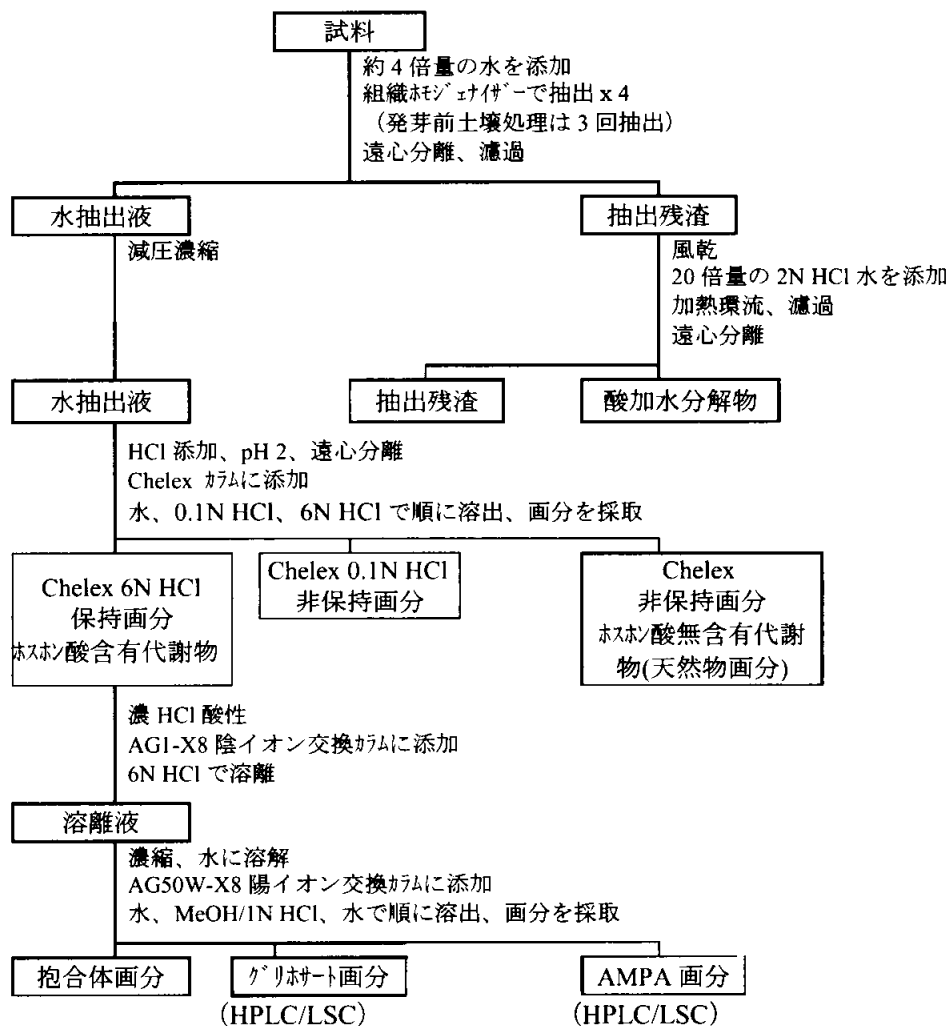
群 4 の 1 回目及び 2 回目の処理後の日数

採取試料の処置：茎葉部を切り取った後、根部を掘り出し、水洗後、根冠部を切り取り、茎葉部と一緒にした。根部は 2.5~5 cm にスライスし、それぞれ生重 (4 株/群) を測定した。試料はドライアイスが存在下で均質化した。

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。

放射能の抽出/分画：<sup>14</sup>C-標識体処理群（発芽前土壌処理および生育期茎葉処理）について抽出した。無処理群の TRR は  $\leq 0.001$  ppm であったので抽出しなかった。代謝物の定量分析は以下のスキームに従って行った。天然物画分の特徴付けは生育期茎葉処理の根部は放射能が少なかったため、茎葉部を用いて行った。なお、代謝物の同定のために、通常の分析定量実験とは別に、大量の茎葉部試料を用いて抽出・分画して代謝物を単離した。

スキーム（原報告書 P.68 Figure 12）



抱合体画分は乾固し、水に溶解した後に、RP PIC HPLC 法 D で分画して、主要な 1 個の放射性成分を得た。この画分を濃縮後水に溶解して AG50W-X4 陽イオン交換カラムに添加して分画/単離した。さらに、1N HCl を用い、加水分解し、2 成分 (AMPA およびグリホサート) を得た。さらに、SAX HPLC でラウンドアップレディ小麦の代謝試験で得られた AMPA/グリホサートアセチル化抱合体とともに分析した。

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。

代謝物の分析：HPLC/LSC で各試料の定量分析を行ったが、1つの HPLC 法では成分の分離ができなかったため、強陰イオン交換 (SAX HPLC) および強陽イオン交換 (CX HPLC) の両方で分析した。

SAX HPLC 法 A：強陰イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SAX

ガードカラム：AX

溶媒：A；4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH2.0

B；4%MeOH 添加 0.100 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH2.0

CX HPLC 法 B1：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

ガードカラム：ODS

溶媒：0.005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

CX HPLC 法 B2：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

ガードカラム：ODS

溶媒：4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.0

アミノ HPLC 法 C：アミノカラムクロマトグラフィー (天然物分析用)

カラム： $\text{NH}_2$

ガードカラム： $\text{NH}_2$

溶媒：A；100%水

B；100%アセトニトリル

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

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；0.01 M 水酸化テトラブチルアンモニウム+0.01 M 酢酸

B；100%アセトニトリル

RP HPLC 法 E：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

ガードカラム：ODS

溶媒：A；100%水

B；100%アセトニトリル

#### 代謝物の誘導体化

AMPA 及び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°C で反応させた。反応液の溶媒を蒸発させ、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) 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  $^{14}\text{CO}_2$  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：最初の抽出および分析は試料採取 3 週間以内に、再度、冷凍保存試料を分析実験の終了する頃に抽出して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析して確認した。

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

結果： 残留量 ppm は全てグリホサート当量 ppm を示す。

総残留放射能(TRR)および放射能の部位別分布：テンサイ試料中の試料採取時および放射能抽出時の TRR の分布を表 1 に示した。

表 1 試料採取時(PTRL)および放射能抽出時(モンサント)に測定した総放射能 (ppm) (原報告書 P.49 Table VII)

試験群	採取部位	PTRL 分析値	モンサント分析値
1 (無処理)	茎葉部	<0.001*	NA
3 (発芽前土壌処理)	茎葉部	0.006#	0.005#
1 (無処理)	根部	0.002*	NA
3 (発芽前土壌処理)	根部	0.009#	0.008#
2 (無処理)	茎葉部	<0.001*	NA
4 (生育期茎葉処理)	茎葉部	3.561#	3.437#
2 (無処理)	根部	0.001*	NA
4 (生育期茎葉処理)	根部	1.256#	1.396#

\* : 5 回測定の平均値 # : 10 回測定の平均値 NA : 分析せず

両測定機関における測定結果は茎葉部および根部ともにほとんど同等であった。全ての残留濃度はモンサント社の測定した TRR 値に基づいて計算した。

発芽前土壌処理区の TRR は非常に少なく 0.005~0.008 ppm で、無処理区の TRR は茎葉部および根部とも<0.001~0.002 ppm であった。無処理区には <sup>14</sup>C-標識体を処理していないので、無処理区の <sup>14</sup>C-残留は土壌に処理された <sup>14</sup>C-標識体の分解に基づく <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> に由来している。発芽前土壌処理区の植物は <sup>14</sup>C-標識体処理土壌中で生育しているため、無処理区の残留より多いことは予想されることである。発芽前土壌処理区の低残留は既実施の結果と一致している。

生育期茎葉処理区の TRR は茎葉部で 3.437 ppm、根部で 1.396 ppm であったのに対して、処理区に近接して設置した無処理区の残留は茎葉部および根部とも ≤0.001 ppm であった。このことは無処理区の残留は <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 由来で、生育期茎葉処理区の残留のほとんどが <sup>14</sup>C-標識体の分解に基づく残留であることを示している。

放射能の抽出性：

テンサイ茎葉部および根部の残留の抽出性を表 2 に示す。

表 2 テンサイ茎葉部および根部の残留の抽出性 (原報告書 P.50 Table VIII)

試料	発芽前土壌処理		生育期茎葉処理	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm
茎葉部				
未抽出	100	0.005	100	3.437
水抽出液	59.22	0.003	86.65	2.978
抽出 (結合) 残渣	49.99	0.003	1.81	0.062
回収率	109.21	0.006	88.46	3.040
根部				
未抽出	100	0.008	100	1.396
水抽出液	85.56	0.007	103.30	1.442
抽出 (結合) 残渣	20.43	0.002	1.32	0.018
回収率	105.99	0.009	104.62	1.460

発芽前土壌処理区の茎葉部および根部では水でそれぞれ 59.22 および 85.56%TRR が

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。

抽出されたが、抽出液中の残留は非常に少なかった (<0.01 ppm) ので、これ以上の分析はしなかった。

生育期茎葉処理区の茎葉部および根部では水で残留のほとんどが抽出され、残渣にはそれぞれ 1.81 および 1.32 %TRR が含まれているのみであった。抽出残渣の酸加水分解で残渣中放射能の 84.57% が遊離した。

残留の特性：

代謝物は一つの HPLC 法では成分の分離ができなかったため、強陰イオン交換 (SAX HPLC) および強陽イオン交換 (CX HPLC) の両方で分析した。その結果を表 3 にそれぞれ示す。

表 3 生育期茎葉処理区の茎葉部および根部の残留放射能の特性  
(原報告書 P.31 Table IV 及び V)

試料	ピークの特徴	SAX HPLC			CX HPLC			平均	
		分布率	ppm	%TRR	分布率	ppm	%TRR	ppm	%TRR
茎葉部	AMPA	**	**	**	2.12	0.06	1.84	**	**
	グリホサート	91.00	2.71	78.85	92.84	2.77	80.45	2.74	79.65
	天然物	1.60*	0.05*	1.38*	**	**	**	**	**
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	0.92	0.03	0.80	**	**	**	**	**
根部	AMPA	**	**	**	3.67	0.05	3.79	**	**
	グリホサート	92.00	1.33	95.04	92.53	1.33	95.58	1.33	95.31
	天然物	1.18*	0.02*	1.22*	**	**	**	**	**
	グリホサート/AMPA-アセチル化抱合体	0.53	0.01	0.55	**	**	**	**	**

\* SAX HPLC (天然物+AMPA) および CX HPLC のデータから算出

\*\* 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 に生育期茎葉処理区のテンサイの水抽出液中の代謝物の残留量のまとめを示す。

表 4 生育期茎葉処理区の茎葉部および根部の残留放射能の特性  
(原報告書 P.51 Table IX)

画分	茎葉部		根部	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm
総放射能	100	3.437	100	1.396
水抽出液	86.65	2.978	103.30	1.442
グリホサート	79.65	2.74	95.31	1.33
AMPA	1.84	0.06	3.79	0.05
グリホサート/AMPA アセチル化抱合体	0.80	0.03	0.55	0.01
天然物画分	1.38	0.05	1.22	0.02
抽出残渣 (結合残渣)	1.81	0.062	1.32	0.018
総回収率 (水抽出による)	88.46	3.040	104.62	1.460
同定/特徴付け合計	83.67	2.88	100.87	1.41

最も多い放射性成分はグリホサートで約 80~95%TRR を占めていた。次いで、AMPA が主要代謝物で、約 2~4%TRR を占めていた。この二つで茎葉部および根部の TRR

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。

の 81%および 99%を占めていた。放射性グリホサート/AMPA アセチル化抱合体および天然物は少なく、いずれも<2%TRR であった。

ラウンドアップレディ遺伝子導入テンサイにおけるグリホサートの代謝は非耐性テンサイで既に報告されている結果と同じであった。

また、代謝物同定を目的とした大量試料の分析結果は上記と整合性のある結果となった。

保存安定性試験：凍結保存後の残留放射能の安定性を初回の分析結果と比較し、表 5 に示す。

実験期間中グリホサート由来の代謝物は安定であった。

表 5 テンサイの残留放射能の保存安定性（原報告書 P.52 Table X, P.53 Table X I 及び P.54 Table X II）

試料		茎葉部		根部	
		初回分析	最終分析	初回分析	最終分析
収穫後 日数	抽出	16	56	16	56
	SAX HPLC	17	57	17	57
生育期茎葉処理 (%TRR)					
	抽出液 1	56.2	54.1	69.9	63.0
	抽出液 2	20.0	19.0	25.5	31.9
	抽出液 3	6.4	6.6		9.3
	合計抽出回収率	82.6	79.7	95.4	104.2
SAX HPLC (%)					
	グリホサート	95.8	95.8	95.4	94.0
	AMPA+天然物	4.2	4.2	4.7	6.1

結論：

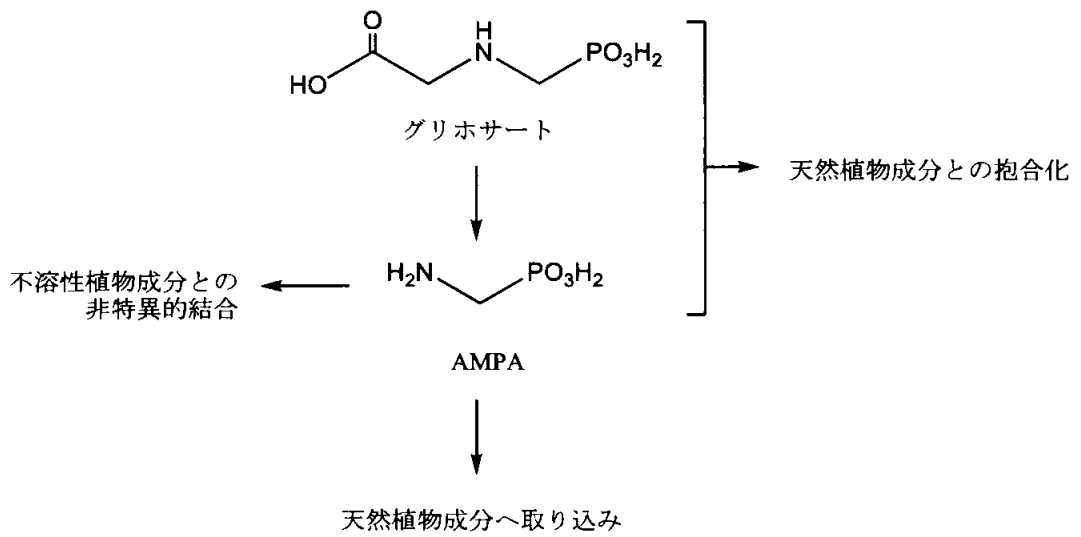
ラウンドアップ®除草剤をラウンドアップ・レディ遺伝子導入テンサイの発芽前に土壌処理して、土壌代謝由来の  $^{14}\text{CO}_2$  による残留への寄与について、また実使用法に準じて生育中に合計 2 回全面茎葉処理して成熟期テンサイの残留放射能の特性を検討した。その結果、発芽前土壌処理区の TRR は非常に少なく(0.005~0.008 ppm)、処理区に近接して設置した無処理区の TRR はさらに少なく (<0.001~0.002 ppm)、土壌代謝由来の  $^{14}\text{CO}_2$  の寄与は非常に少なかった。

生育期茎葉処理区では、主要な残留は親化合物のグリホサート (約 80~95%TRR) で、ついで AMPA (約 2~4%TRR) で、この二つで茎葉部および根部の TRR の大部分 (81~99%) を占めていた。放射性グリホサート/AMPA アセチル化抱合体および天然物は少なく、いずれも微量 (<2%TRR) であった。

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。グリホサートおよび AMPA は天然の分子量の小さい成分と抱合体を形成し、微量代謝物を生成する。AMPA は最終的には、1 炭素原子フラグメントに分解し、天然植物成分へ取り込まれる。ラウンドアップ・レディ遺伝子導入テンサイの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。想定代謝経路を次頁に示す。

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。

グリホサートのテンサイにおける想定代謝経路





(資料 No. 10-10)

(10) グリホサート耐性カノーラにおけるグリホサートの代謝試験

試験機関：

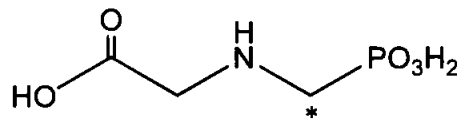
[GLP 対応]

報告書作成年： 1994 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	19.93 mCi/mmol	$^{13}\text{C}$ 存在比 96.9%
放射化学的純度	98.60%	化学的純度 >99%

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； 99.8%

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7.7 mCi/mmol (100190 dpm/ $\mu\text{g}$ 、放射化学的純度 >98%)の試験標識体とした。これをイソプロピルアミン、水および市販のラウンドアップ製剤に使用されている界面活性剤の混液に溶解して、試験製剤を調製した。さらに水で希釈して0.7263 mg/mLおよび0.3636 mg/mLの処理溶液を調製した。

対照区には市販のラウンドアップ製剤を使用し、標識体と同様に希釈して処理溶液とした。

供試植物： グリホサート耐性カノーラ(カナダにおけるカノーラの商業品種に下記の系統を掛け合わせたもの)

- ・GT73 系統(グリホサート耐性(ラウンドアップ・レディ<sup>®</sup>)CP4EPSPS を発現する遺伝子及びグリホサートオキシドレダクターゼ(GOX)を発現する遺伝子の両方を導入した系統、PV-BNGT04)
- ・GT200 系統(GOX を発現する遺伝子のみを導入した系統、PV-BNGT03)を品種 Westar に戻し交配して作出した。

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

栽培環境：

栽培場所：ミズリー州 セントルイスのモンサント社研究所の環境制御グロースチャンパー内

試験容器：Sable-91 微砂質壤土を充填した直径 15 cm の鉢。

播種：鉢当り 1 種子を深さ 1.3 cm に播種。

処理方法：<sup>14</sup>C-標識体の土壌との接触による微生物分解由来の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 取り込みによる放射能の残留をできるだけ少なくするために、処理時に土壌表面を被覆して処理した。また、処理後もプラスチックのシートで土壌面を覆い、処理植物の落葉、花卉等を土壌面から定期的に除去した。

試験区：(原報告書 P.34 Application Treatment Groups)

供試化合物	試験区呼称*	1 回目処理		2 回目処理		グロースチャンパー番号	供試植物数
		処理量 (kg ac/ha)	播種後日数	処理量 (kg ac/ha)	播種後日数		

カノーラ GT73 系統

<sup>14</sup> C-標識体	GT73-45-T	0.455	14	**	**	28	22
	GT73-90-T	0.908	14	0.905	23	28	57
非標識体	GT73-45-CA	0.455	14	**	**	28	8
	GT73-90-CA	0.908	14	0.905	22	28	9
	GT73-45-CB	0.455	14	*	*	112	2
	GT73-90-CB	0.908	15	0.905	22	112	2

カノーラ GT200 系統

<sup>14</sup> C-標識体	GT200-45-T	0.455	14	**	**	17	22
	GT200-90-T	0.908	14	0.905	22	17	56
非標識体	GT200-45-CA	0.455	14	**	**	17	8
	GT200-90-CA	0.908	14	0.905	22	17	7
	GT200-45-CB	0.455	14	**	**	112	2
	GT200-90-CB	0.908	14	0.905	22	112	2

ae とはグリホサート酸換算の薬量

\*: GT73 および GT200 はカノーラの系統、T は <sup>14</sup>C-標識体、CA 及び CB は非標識体処理、CA は <sup>14</sup>C-標識体の近くで同一チャンパー内で栽培、CB は <sup>14</sup>C-標識体とは別のチャンパー内で栽培を意味する。

\*\* : 2 回目処理をしなかった。

処理時の植物の大きさ：1 回目処理；2~4 葉期

2 回目処理；6 葉期

散布方法：DeVilbiss 噴霧器で全面茎葉処理。

試料の採取：

上部の莢が乾燥したとき、植物を地際部で刈り取り、グロースチャンパー内で乾燥させた。乾燥後、莢から種子のみを集めて 1 試料とした。

植物試料は表 1 のように採取した。

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

表 1 試料収穫時期、収穫本数、収量および水分含有量 (原報告書 P.98 TABLE 5)

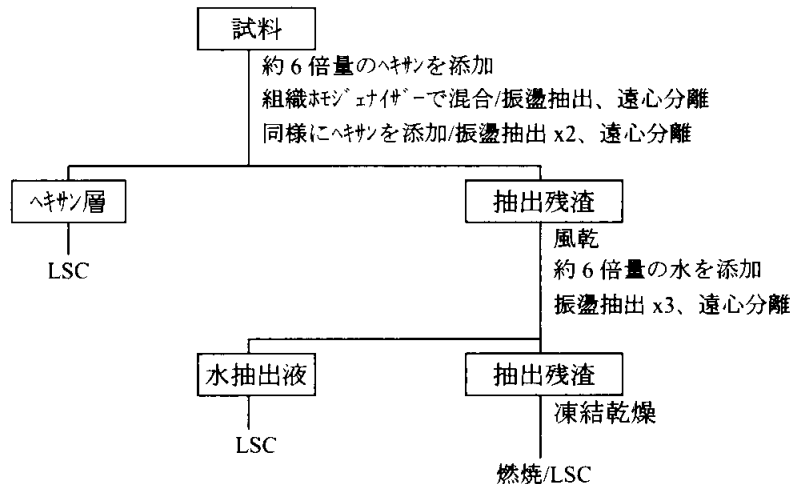
供試化合物	試験区	収穫本数	収穫時期 (最終処理後日数)	種子平均 収量(g)	種子の水分 含有量(%)
カノーラ GT73 系統					
<sup>14</sup> C-標識体	GT73-45-T	20	87	12.2	2.7
	GT73-90-T	55	79	12.2	2.9
標識体	GT73-45-CA	8	87	12.5	2.7
	GT73-90-CA	9	79	12.4	2.7
	GT73-45-CB	2	87	15.2	1.9
	GT73-90-CB	2	79	15.3	1.7
カノーラ GT200 系統					
<sup>14</sup> C-標識体	GT200-45-T	20	87	19.9	3.3
	GT200-90-T	53	78	17.8	3.1
標識体	GT200-45-CA	8	87	22.5	2.9
	GT200-90-CA	7	79	20.7	3.0
	GT200-45-CB	2	87	16.2	1.7
	GT200-90-CB	2	78	14.8	2.1

採取種子の処置：ドライアイスの存在下で凍結後、ブレンダーで粉碎した。

放射能の抽出/分画：

予備抽出：<sup>14</sup>C-標識体処理区 (T) と非標識体処理区 (CA) の種子をスキーム 1 のように抽出して GT73 系統と GT200 系統間の代謝について比較した。

スキーム 1



<sup>14</sup>C-標識体処理区種子からの放射能の抽出/分画：GT73-45-T および GT73-90-T 区から採取した種子を用いて、スキーム 2 (GT73-45-T 区の種子) (P.171)、スキーム 3 (P.172) およびスキーム 4 (GT73-90-T 区の種子) (P.174) にしたがって、抽出/分画した。これらの抽出方法は基本的に同じであるが、スキーム 3 は 1 回目の水抽出液を用いて、スキーム 4 は全ての水抽出液を用いて放射性成分の同定・定量用に分画/精製した。これらのスキームは各画分の残留濃度 (ppm) および総放射能 (TRR) に対する割合と共に結果の項に示す。

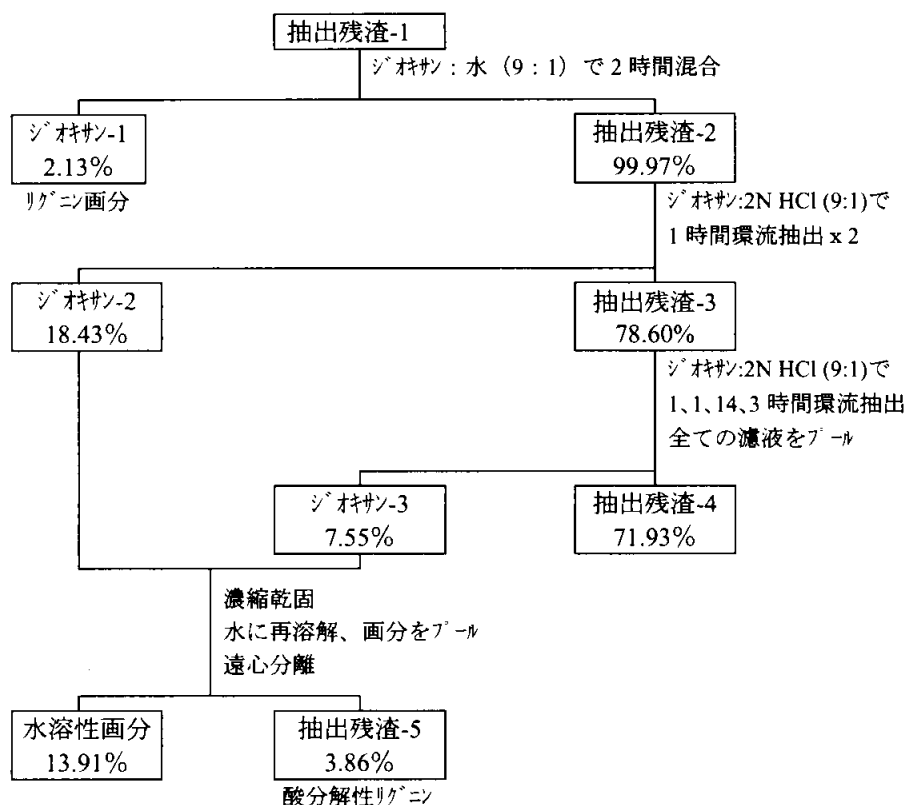
なお、種子粉末のヘキサン抽出によりカノーラオイルを得、スキーム 5 (P.175) により遊離脂肪酸画分及びグリホサートとその関連物質の同定定量を行った。

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

抽出残渣の分画：抽出残渣の分画は 1%ラウリル硫酸ナトリウム抽出、酵素加水分解、ジオキサン（リグニン）抽出および酸加水分解（6N HCl）を以下のように行った。

- 1) 1%ラウリル硫酸ナトリウム抽出：残渣に 1%ラウリル硫酸ナトリウムを添加して、約 4 日間振盪抽出し、濾過した。
- 2) 酵素加水分解：残渣をプロテアーゼ（24 時間、37℃）、アミラーゼ（65.5 時間、30℃）およびセルラーゼ（48 時間、37℃）の順に加水分解した。
- 3) ジオキサン（リグニン）抽出：以下のようにリグニン画分を抽出した。

（原報告書 P.221 Figure 23）



注：各画分の数値（%）は初期抽出残渣-1 の放射能に対する各画分の放射能の割合。

4) 酸加水分解：残渣を約 12 時間 110℃で 6 N HCl 加水分解を行った。酸加水分解物を RP HPLC で分析し、各画分を採取後アミノ酸の n-ブチル-N-TFA 誘導体あるいは有機酸の n-ブチルエステルを誘導し、HPLC で放射性成分を単離した。

5) アルカリ加水分解：緩慢な条件下でのアルカリ加水分解は 0.1 N NaOH を用いて、100℃で行い、陽イオン交換 HPLC で分析した。強アルカリ加水分解は 2.5 N NaOH を用いて、85℃で 65 時間行い抽出し、ついで、水を用いて 85℃で 2 回抽出した。抽出液を合わせて、酸性とした後、濾過して HPLC で分析した。

代謝物の分析：

各試料の定量分析には HPLC/RAD および HPLC/LSC で行い、以下に記載のように種々のカラムおよび溶媒系を使用した。同定は標品との比較分析および GC/MS(DP/PICI/MS、GC/HR/EI/MS、GC/PCIC/MS、GC/EI/MS、LC/ESI/MS)で行った。

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

- SAX HPLC 法-1：強陰イオン交換クロマトグラフィー（全般の分析用）  
カラム：SAX  
溶媒：A；4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 2.0  
B；4%MeOH 添加 0.100 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 2.0
- SAX HPLC 法-2：強陰イオン交換クロマトグラフィー（蟻酸塩分析用）  
カラム：SAX  
溶媒：4%MeOH 添加 0.050 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 6.42
- SAX HPLC 法-3：強陰イオン交換クロマトグラフィー（N-アセチル-AMPA 共溶出用）  
カラム：SAX  
溶媒：4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 2.0
- SAX HPLC 法-4：強陰イオン交換クロマトグラフィー（AMPA 共溶出用）  
カラム：SAX  
溶媒：4%MeOH 添加 0.20 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 4.72
- RP HPLC 法-5：逆相クロマトグラフィー（抽出残渣の塩基加水分解物の分析用）  
カラム：ODS  
ガードカラム：ODS  
溶媒：A；1%蟻酸水  
B；100%メタノール
- CX HPLC 法-6：強陽イオン交換クロマトグラフィー（全般の分析用）  
カラム：SCX  
溶媒：4%MeOH 添加 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 2.0
- RP-PIC HPLC 法-7：逆相イオンペアークロマトグラフィー（保存安定性の分析用）  
カラム：ODS  
ガードカラム：ODS  
溶媒：A；イオンペアー試薬添加磷酸緩衝液  
B；90%MeOH にリン酸テトラブチルアンモニウム添加
- RP-アミノ HPLC 法-8：アミノカラムクロマトグラフィー（蔗糖分析用）  
カラム： $\text{NH}_2$   
ガードカラム：ODS  
溶媒：A；100%水  
B；100%アセトニトリル
- RP HPLC 法-9：逆相クロマトグラフィー（鹼化カノーラ油の分析用）  
カラム：ODS  
ガードカラム：ODS  
溶媒：A；0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH 2.5  
B；100%MeOH
- RP HPLC 法-10：逆相クロマトグラフィー（抽出残渣の酸加水分解物の分析用）  
カラム：ODS  
ガードカラム：ODS  
溶媒：A；水  
B；アセトニトリル

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。

RP-PIC HPLC 法-11：逆相イオンペークロマトグラフィー（水溶性画分2の分析用）

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；0.01 M 水酸化テトラブチルアンモニウムおよび0.1 M 酢酸

B；100%アセトニトリル

RP HPLC 法-12：逆相クロマトグラフィー（誘導体化代謝物の分析用）

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；100%水

B；100%アセトニトリル

RP HPLC 法-13：逆相クロマトグラフィー（誘導体化代謝物の分析用）

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；100%水

B；100%MeOH

RP HPLC 法-14：逆相クロマトグラフィー（誘導体化代謝物の分析用）

カラム：ODS

ガードカラム：ODS

溶媒：A；1%蟻酸水

B；100%MeOH

総放射能の測定：抽出前試料中の総放射能（TRR）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<sub>2</sub>を捕集液に捕集して、また、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：GT73-91-T区の種子を用い試料採取後、表2の時期に分析して安定性を確認した。

表2 保存安定性の確認時期（試料採取後抽出または分析までの日数）

（原報告書 P.100 Table 7.1.）

分析法	初回抽出/分析	保存後最初の抽出/分析	最終抽出/分析
燃焼	11	11	473
抽出	12	12	495
PIC HPLC	18	497	497
CX HPLC	28	497	5,001

CX：陽イオン交換カラム使用

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。

結果： 残留量 ppm は全てグリホサート当量 ppm を示す。

総残留放射能(TRR)：カノーラ種子中の TRR を表 3 に示した。

<sup>14</sup>C-標識体を 1 回処理した残留放射能濃度は GT73 系統で 0.483 ppm、GT200 系統で 0.845 ppm であった。<sup>14</sup>C-標識体を 2 回処理した残留放射能濃度は GT73 系統で 8.093 ppm、GT200 系統で 4.876 ppm であった。<sup>14</sup>C-標識体を処理した植物と同一のチャンバー内で栽培した CA 区の植物には微量の放射能 (GT73 系統で 0.027 ppm、GT200 系統で 0.075~0.077 ppm) が検出された。

表 3 総残留放射能(TRR) (原報告書 P.99 TABLE 6)

供試化合物	試験区呼称*	ppm	dpm/g	処理放射能に対する検出%
カノーラ GT73 系統				
<sup>14</sup> C-標識体	GT73-45-T	0.483	48,431	0.71
	GT73-90-T	8.093	810,827	2.19
非標識体	GT73-45-CA	0.027	2,679	NA
	GT73-90-CA	0.027	2,684	NA
	GT73-45-CB <sup>1</sup>	ND	ND	NA
	GT73-90-CB <sup>1</sup>	ND	ND	NA
カノーラ GT200 系統				
<sup>14</sup> C-標識体	GT200-45-T	0.845	84,610	2.04
	GT200-90-T	4.876	488,512	1.82
非標識体	GT200-45-CA	0.075	7,498	NA
	GT200-90-CA	0.077	7,688	NA
	GT200-45-CB <sup>1</sup>	ND	ND	NA
	GT200-90-CB <sup>1</sup>	ND	ND	NA

ND：検出限界(95dpm/g または 0.001ppm) 以下

NA：非標識体処理のため、該当なし。

<sup>1</sup>：非標識体処理を処理し、<sup>14</sup>C-標識体処理植物と別のチャンバー内で栽培。

残留放射能の抽出/分画/同定：

予備抽出試験：結果を表 4 に示した。

表 4 GT73 系統と GT200 系統間の放射能の抽出性の比較

(原報告書 P.52 Preliminary Extractions of GT73 and GT200 Canola Seed)

供試化合物	試験区呼称*	TRR (ppm)	ヘキサン抽出 %TRR(ppm)	水抽出 %TRR(ppm)	抽出残渣 %TRR(ppm)	回収率 (%)
カノーラ GT73 系統						
<sup>14</sup> C-標識体	GT73-45-T	0.483	4.0 (0.019)	26.9 (0.130)	71.0 (0.34)	101.9
	GT73-90-T	8.093	1.6 (0.13)	22.0 (1.784)	80.2 (6.49)	103.8
非標識体	GT73-90-CA	0.027	42.8 (0.012)	20.1 (0.005)	35.0 (0.009)	97.9
カノーラ GT200 系統						
<sup>14</sup> C-標識体	GT200-45-T	0.845	5.4 (0.046)	18.8 (0.159)	50.8 (0.43)	75.1
	GT200-90-T	4.876	2.1 (0.10)	23.8 (1.160)	68.8(3.36)	94.8
非標識体	GT200-90-CA	0.077	54.3 (0.042)	10.3 (0.008)	20.0 (0.015)	84.5

GT73 系統と GT200 系統間において、処理回数(45-T は 1 回、90-T および 90-CA は 2 回処理) の違いによる放射能の抽出性に差は認められなかった。<sup>14</sup>C-標識体処理種子では大部分の放射能が抽出残渣中に存在し、抽出性放射能は水抽出で 19~27%TRR、

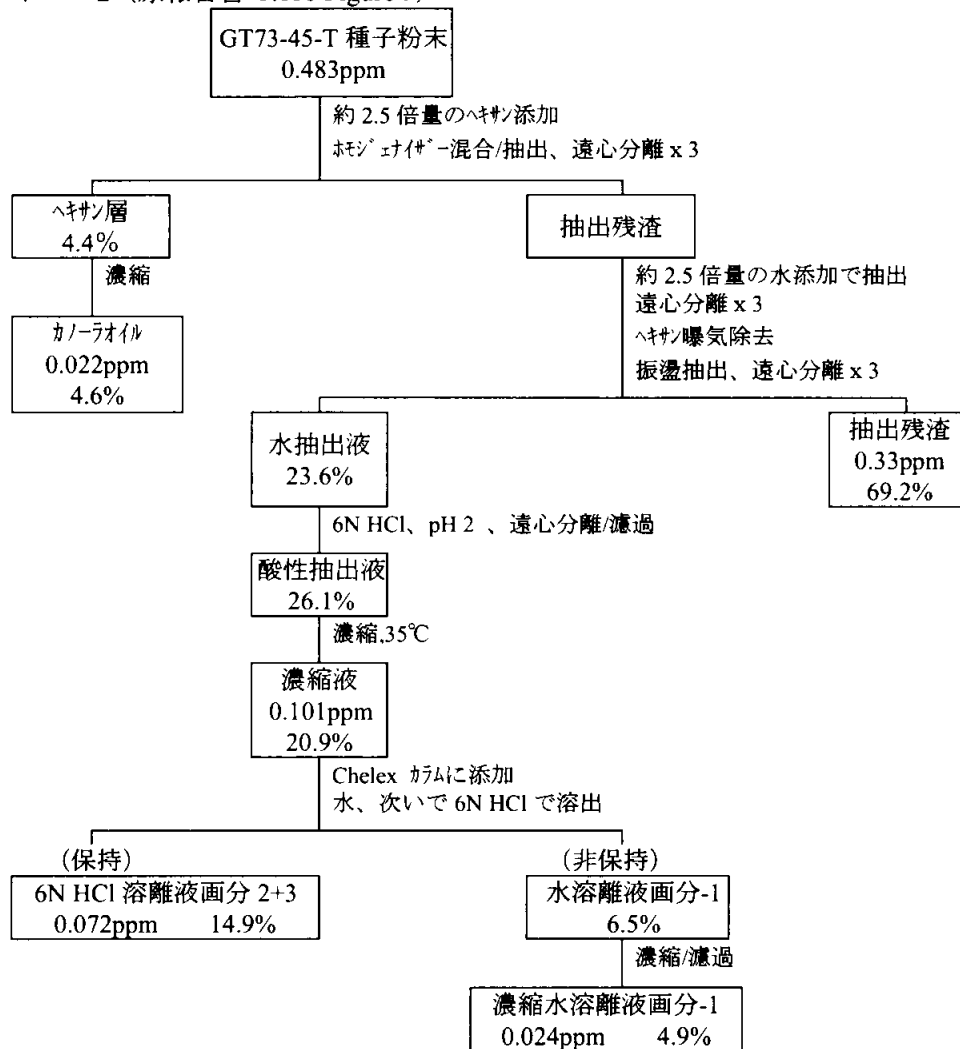
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

ヘキサン抽出で 1~5%であった。対照種子（非標識体を処理し、<sup>14</sup>C-標識体処理植物と同一チャンバー内で栽培）では、種子中放射能の約半分はヘキサンで抽出された。これは、代謝分解し生成した <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> が最後にはオイル中に取り込まれていることを示している。

<sup>14</sup>C-標識体処理区の種子の 1 回目の水抽出液（水抽出液中の放射能の 65~70%を占める）を用いて、RP-PIC HPLC 法-7、CX HPLC 法-6 で代謝物を分析した結果、GT73 系統と GT200 系統間および処理回数で代謝物に顕著な差は認められなかった。また、GT200 系統は開発しないことが決定されたので、以降の分析は全て GT73 系統で行った。

GT73-45-T 種子からの抽出：スキーム 2 に従って放射性成分の抽出/分画を行った。

スキーム 2（原報告書 P.110 Figure 9）



注：各画分の数値（%）は初期試料中放射能に対する各画分の放射能の割合。

GT73-45-T 種子のヘキサン抽出液のオイルには 4.6%TRR (0.022ppm) が含まれていた。ヘキサン抽出残渣を水で抽出した後の濃縮液中には 20.9%TRR(0.101ppm) が含まれており、抽出残渣には 69.2% (0.33ppm) が含まれていた。この段階の総回収率は 94.7%であった。

さらに、濃縮液を Chelex カラムで分画した濃縮水溶離液画分に 4.9%TRR (0.024ppm)、

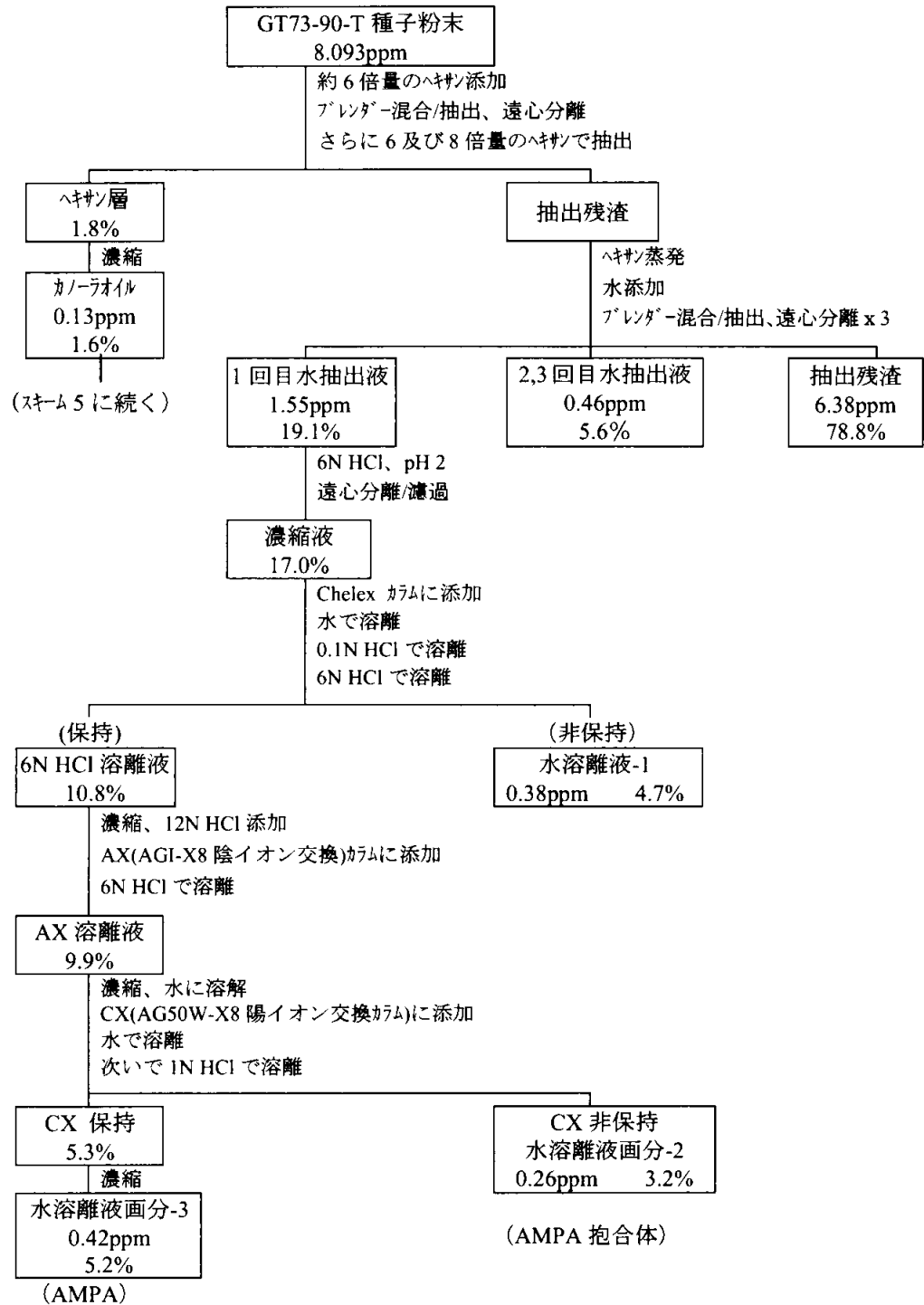


本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

6N HCl 溶離液画分に 14.9%TRR (0.072ppm) が含まれていたが、これ以上分画しなかった。

GT73-90-T 種子からの抽出/同定(A)：この抽出法ではスキーム 3 に従い、1 回目の水抽出液を用いて放射性成分の抽出・分画を行った。

スキーム 3 (原報告書 P.111 Figure 10 及び P.112 Figure 11)



注：各画分の数値 (%) は初期試料中放射能に対する各画分の放射能の割合。

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。

GT73-90-T 種子のヘキサン抽出液のオイルには 1.6%TRR (0.13ppm) が含まれていた。ヘキサン抽出残渣の 1 回目の水抽出で水溶性放射能の、60~70%が含まれていた。2 および 3 回目の水抽出液には 5.6%TRR、抽出残渣には 78.8%TRR (6.38ppm) が含まれていた。この段階の総回収率は 105.1%であった。

さらに、1 回目水抽出画分を Chelex カラムで分画し、得た水溶離液画分-1 (4.7%TRR、0.38ppm) を RP-アミノ HPLC 法-8 で主要ピーク-1 を単離精製した。標品の  $^{14}\text{C}$ -蔗糖とのクロマトグラフィー、NMR、ピーク-1 および標品  $^{14}\text{C}$ -蔗糖のアセチル化誘導体の結果から主要ピーク-1 を蔗糖と同定した。

6N HCl 溶離液画分に 10.8%TRR が含まれており、陰イオンおよび陽イオン交換カラムを通して精製分画して、陽イオン交換カラムに保持されない 3.2%TRR (0.26ppm) の水溶離液画分-2 を、さらに、1N HCl で溶出する水溶離液画分-3 (5.2%TRR、0.42ppm) を得た。

水溶離液画分-3 には一つのピークがあり、標品の  $^{14}\text{C}$ -AMPA、AMPA のエステルおよびアセチル誘導体とのクロマトグラフィー、GC/PIC/MS、LC/ESI/MS 分析の結果から AMPA と同定した。

GT73-90-T 種子からの抽出/同定(B)：この抽出法ではスキーム 4 に従い、水抽出液はプールして放射性成分の抽出・分画を行った。

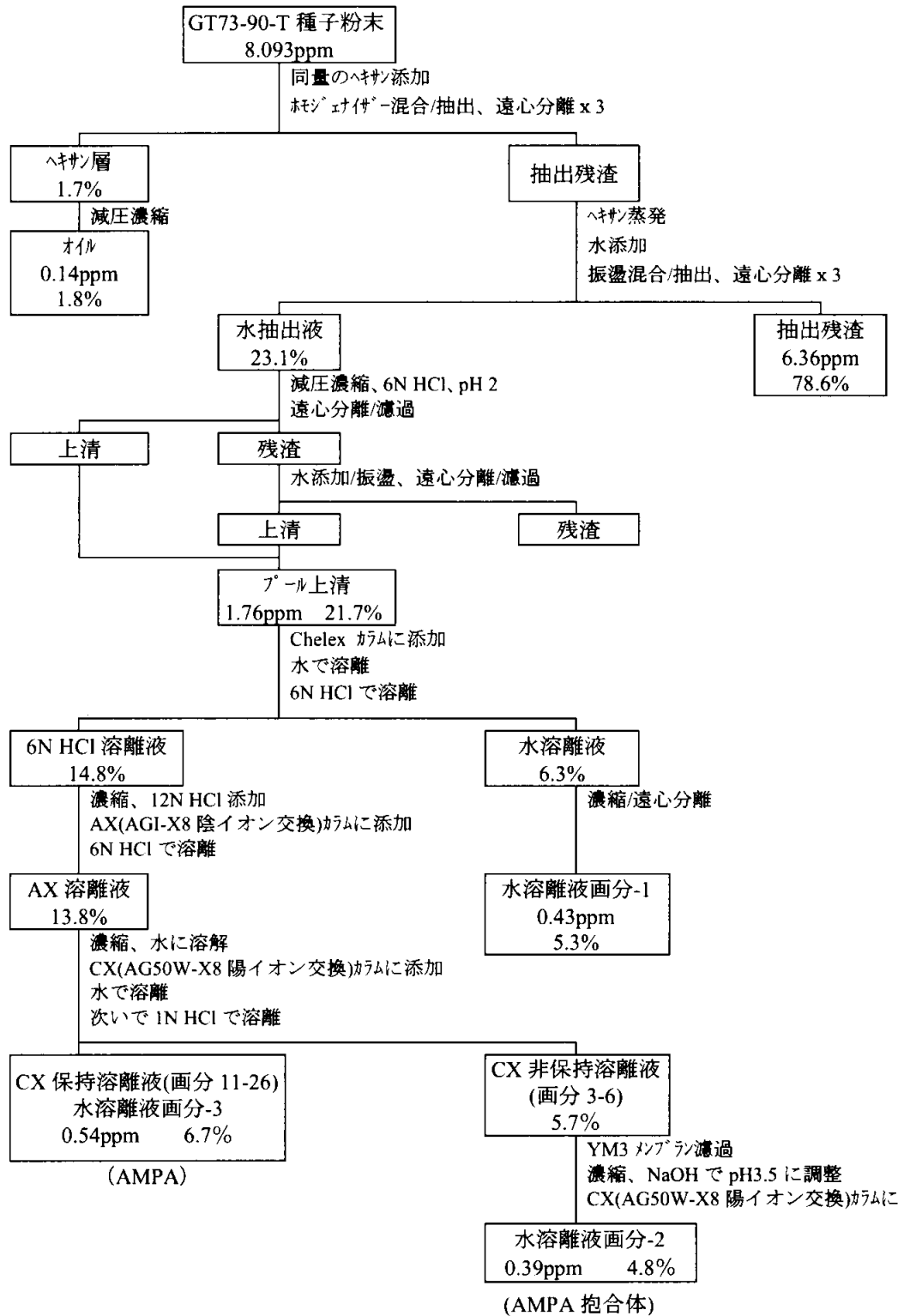
GT73-90-T 種子のヘキサン抽出液のオイルには 1.8%TRR (0.14ppm) が含まれていた。ヘキサン抽出残渣のプールした水抽出液に 21.7%TRR が含まれていた。抽出残渣には 78.6%TRR (6.36ppm) が含まれていた。この段階の総回収率は 102.1%であった。

プールした水抽出液を Chelex カラムで分画し、得た水溶離液画分に 5.3%TRR (0.43ppm)、6N HCl 溶離液画分に 14.8%TRR が含まれていた。6N HCl 溶離液画分を陰イオン及び陽イオン交換カラムを通して精製分画して、陽イオン交換カラムに保持されない水溶離液画分-2 (4.8%TRR、0.39ppm) 及び 1N HCl で溶出する水溶離液画分-3 (6.7%TRR、0.542ppm) を得た。

水溶離液画分-2 の主要なピークを単離・精製して、アセチル化及びメチル化誘導体の MS と標品の誘導体との比較から N-グリセリル AMPA および N-アセチル AMPA と同定された。さらに、微量成分は加水分解により AMPA を生成することから AMPA 抱合体と同定された。

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。

スキーム 4 (原報告書 P.113 Figure 12 及び P.114 Figure 13)

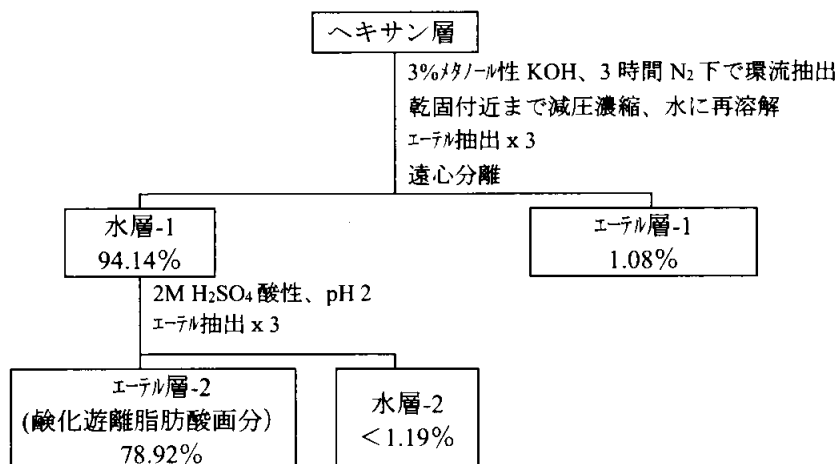


注：各画分の数値 (%) は初期試料中放射能に対する各画分の放射能の割合。

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。

スキーム 5

カノーラオイルからの抽出/同定：(原報告書 P.199 Figure 1)



注：各画分の数値 (%) はヘキサン層中放射能に対する各画分の放射能の割合。

エーテル層-2 の放射能は天然の脂肪酸に取り込まれており、リノレン酸 (2.22%)、リノール酸(8.07%)、オレイン酸(25.63%)、パルミチン酸(9.65%)およびステアリン酸 (微量) と同定された。グリホサートは検出されなかった。

表 5 水抽出液中の同定/特徴付けされた残留放射能のまとめ

(原報告書 P.22 Identification and Characterization of Radioactive Residues in the Aqueous Extract)

代謝物	GT73-45-T		GT73-90-T	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm
水溶性抽出物総量	20.9	0.101	21.7	1.76
AMPA <sup>a</sup>	7.7	0.037	7.1	0.58
N-グリセリル-AMPA <sup>b</sup>	3.4	0.017	3.9	0.31
N-アセチル-AMPA <sup>b</sup>	0.9	0.004	0.7	0.060
水溶性画分 1 <sup>c</sup>	4.9	0.024	5.3	0.43
蔗糖 <sup>d</sup>	<2	<0.01	1.6	0.13
同定/特徴付けした合計	16.9	0.082	17.0	1.38

<sup>a</sup>：陽イオン交換 H'PLC で定量

<sup>b</sup>：強塩基性イオン交換 HPLC で定量

<sup>c</sup>：蔗糖を含む中性天然物として特徴付け

<sup>d</sup>：RP-アミノ H'PLC で定量

抽出後結合残渣の特徴付け：GT73-90-T 種子からの抽出(A)の結合残渣を用いて行った。

予備抽出(表 6)：穏和な条件下における抽出残渣中の結合残留の抽出を行った結果、遊離した放射能はいずれの溶媒とも残渣中放射能の<8%しか遊離しなかったため、これ以上の分析はしなかった。

表 6 穏和な条件下における抽出残渣中の結合残留放射能の抽出  
(原報告書 P.86 Extraction of Bound <sup>14</sup>C-Activity in Extracted Meal)

溶媒	条件	抽出された結合放射能%
水	約 25°C、68 時間	2.6
0.1N HCl	約 25°C、68 時間	6.6
0.1M EDTA	約 25°C、68 時間	4.4
DMF	約 25°C、68 時間	0.6
1%ナトリウム硫酸ナトリウム	約 25°C、約 72 時間	7.4

EDTA：エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩

DMF：ジメチルホルムアミド

連続酵素加水分解（表 7）：プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼによる連続加水分解で残渣中放射能の<8%しか遊離しなかったため、これ以上の分析はしなかった。

結合残留のバイオアベイラビリティを評価するために、抽出残渣をペプシン含有人工胃液(pH 1.2) (SGF) で処理し、次いで、アミラーゼ、リパーゼ、リボヌクレアーゼ、プロテアーゼ等を含むパンクレアチン含有腸液(pH 7.5) (SIF) で処理した結果、SGF で結合残留放射能の 7.9%、SIF で 3.2%が遊離したが、酵素を含まない SGF および SIF でもそれぞれ 7.3 および 2.4%が遊離したことから、ペプシンおよびパンクレアチンは結合放射能の遊離にほとんど影響がなかった。したがって、これらの結果は動物が <sup>14</sup>C-由来の結合残留を摂取したとしてもバイオアベイラビリティはごく僅かであることを示唆している。

ジオキサンによる抽出（リグニン関連物質の遊離）（表 7）：遊離リグニンが残留放射能の 2.1%、塩酸酸性ジオキサン溶解性のリグニンが 26.0%遊離し、このうち水不溶性のリグニンは 3.9%、水溶性のリグニンは 13.9%であった。

酸加水分解（表 7）：酸加水分解物を RP HPLC で分析したところ、<sup>14</sup>C-放射能の 87%を占めるピークが認められ、これを誘導体化して分析した結果、<sup>14</sup>C-グリホサートの分解した 1 炭素ユニットが取り込まれた天然物のアミノ酸および有機酸であった。

表 7 抽出後残渣の特徴付け（原報告書 P.198 Table IV）

分析法	画分	抽出残渣中放射能に対する割合 (%)	成分
連続酵素加水分解	プロテアーゼ	7.53	NA
	アミラーゼ	1.08	NA
	セルラーゼ	2.11	NA
	非抽出性	87.2	NA
ジオキサン抽出	ジオキサン-I	2.13	Bjorkman リグニン
	酸性ジオキサン	25.98	
	水溶解性	13.91	NA
	水不溶性	3.86	酸溶解性リグニン
	非抽出性	71.93	NA
酸加水分解	HCl 可溶性物質	16.89	アミノ酸/有機酸 <sup>a</sup>
	非抽出性	104.6	NA

NA：分析せず。

<sup>a</sup>：アミノ酸/有機酸として、琥珀酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリン、セリン-ロイシンジペプチド、スレオニン、プロリン、水酸化プロリン、グリシン、アラニン、ノルバリン、チロシン、グリシン-チロシンジペプチドが同定された。

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。

塩基加水分解 (表 8) : 緩慢な塩基(0.1 N NaOH、100°C、83.5 時間)および強塩基(2.5 N NaOH、85°C、65 時間)で加水分解した。

緩慢な塩基で加水分解し、抽出残渣中の放射能の 50.7%が遊離し、陽イオン交換カラム HPLC で主要な 3 つのピークが認められ、2 つは蟻酸塩 (16.5%TRR) および AMPA (2.9%TRR) と同定された。

強塩基加水分解で初回の加水分解で残渣中放射能の 80.9%が遊離した。酸不溶性物質を除いた濾液の放射能は 55.9%であった。酸不溶性物質は天然のバイオポリマーと推察されたが、特徴付けはしなかった。

陽イオン交換カラム HPLC で主要な 3 つのピークが認められ、2 つは蟻酸塩 (16.5% TRR) および AMPA (3.7%TRR) と同定された。このカラムの回収率は 60.3%と低く、カラムに 14.9%TRR が保持されており、<sup>14</sup>C-グリホサートの分解した 1 炭素フラグメントに由来する天然物の不溶性植物成分であると考えられた。

AMPA は 2.5 N NaOH で 110°C、99 時間加水分解すると徐々に分解されて蟻酸塩を生成し、AMPA は 27.0%のみ残存した。

表 8 抽出残渣の塩基加水分解  
(原報告書 P.89 Results of Mild Base Hydrolysis of Extracted Meal 及び P.90 Results of Strong Base Hydrolysis of Extracted Meal)

画分	抽出残渣中の放射能%	%TRR	ppm	同定/特徴付け
抽出残渣	100.0	78.6	6.36	
緩和な塩基加水分解				
加水分解物	50.7	39.9	3.23	
陽イオンピーク 1	4.4	3.5	0.28	未知物質
陽イオンピーク 2	21.0	16.5	1.34	蟻酸塩
陽イオンピーク 3	3.7	2.9	0.23	AMPA
強塩基加水分解				
初回加水分解物*	80.9	63.6	5.15	
濾過加水分解物	55.9	43.9	3.56	
陽イオンピーク 1	7.1	5.6	0.45	未知物質
陽イオンピーク 2	21.0	16.5	1.34	蟻酸塩
陽イオンピーク 3	4.8	3.7	0.30	AMPA
逆相カラム保持	19.0	14.9	1.21	天然物関連マトリックス
濾過時損失	25.0	19.7	15.9	不溶性天然物バイオポリマー/揮発性蟻酸
塩基未加水分解物	7.4	5.8	0.47	結合放射能

\* : 2.5 N NaOH を用いて、85°C で 65 時間抽出し、ついで、水を用いて 85°C で 2 回抽出した抽出液の合計。

保存安定性試験 : 凍結保存中の残留放射の安定性を表 9 および 10 に示す。

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 9 カノーラ種子の残留放射能の保存安定性 (GT73-90-T 試料)  
(原報告書 P.100 Table 7.2.)

分析時期	TRR (dpm/g)	ヘキサン抽出 (%TRR)	水抽出 (%TRR)	抽出残渣 (%TRR)	回収率 (%)
初回抽出 <sup>a</sup>	810,827	1.59 (1.53)	22.04 (21.22)	80.20 (77.25)	103.83 (100.00)
最終抽出 <sup>b</sup>	880,561	1.83 (2.00)	19.89 (21.78)	69.58 (76.21)	91.29 (100.00)

( )内は抽出液中の総回収率を 100%としたときの各画分の回収率

<sup>a</sup>: 収穫後 2 週間以内に分析

<sup>b</sup>: 収穫後 16~17 ヶ月で分析

表 10 保存安定性試料の水抽出画分の放射能の分布 (GT73-90-T 試料)  
(原報告書 P.100 Table 7.3.)

保存安定性試料 (分析時期)	HPLC 分析法	主要ピーク	ピークの 面積割合%
初回抽出 <sup>a</sup> (収穫 18 日後)	RP PIC-HPL 法 C-7	RP-1	55.69
		RP-2	26.18
		RP-3	3.04
		RP-4	12.43
保存後初回抽出 (収穫 497 日後)	PIC-HPLC 法-7	RP-1	51.21
		RP-2	26.72
		RP-3	3.19
		RP-4	15.97
最終抽出 (収穫 497 日後)	PIC-HPLC 法-7	RP-1	57.42
		RP-2	22.6
		RP-3	4.32
		RP-4	14.03
初回抽出 (収穫 28 日後)	CX HPLC 法-6*	CX-1	65.54
		CX-2	32.93
保存後初回抽出 (収穫 497 日後)	CX HPLC 法-6*	CX-1	64.61
		CX-2	34.48
最終抽出 (収穫 501 日後)	CX HPLC-法 6*	CX-1	64.12
		CX-2	35.57

\*申請者が方法 1 から方法 6 に修正した。

## 結論

ラウンドアップ®除草剤をグリホサート耐性(ラウンドアップ・レディ®)CP4EPSPS 遺伝子およびグリホサートオキシドレダクターゼ(GOX)を有するカノーラの生育中に実用使用量で合計 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、カノーラオイルからは親化合物のグリホサートは検出されず、放射性天然物のみが検出された(IX-175 スキーム 5 参照)。種子の水抽出液中の放射能は代謝物 AMPA (7%TRR)、N-グリセリル-AMPA (約 4%TRR)、アセチル-AMPA (0.7% TRR)、抽出性天然物および結合残留からなっていた(表 5)。抽出残渣の人工胃液および腸液による連続消化実験で遊離型のグリホサート、あるいはその代謝物が吸収可能な形で存在することはなく、残留による毒性学的に意義はないと考えられた(表 7)。

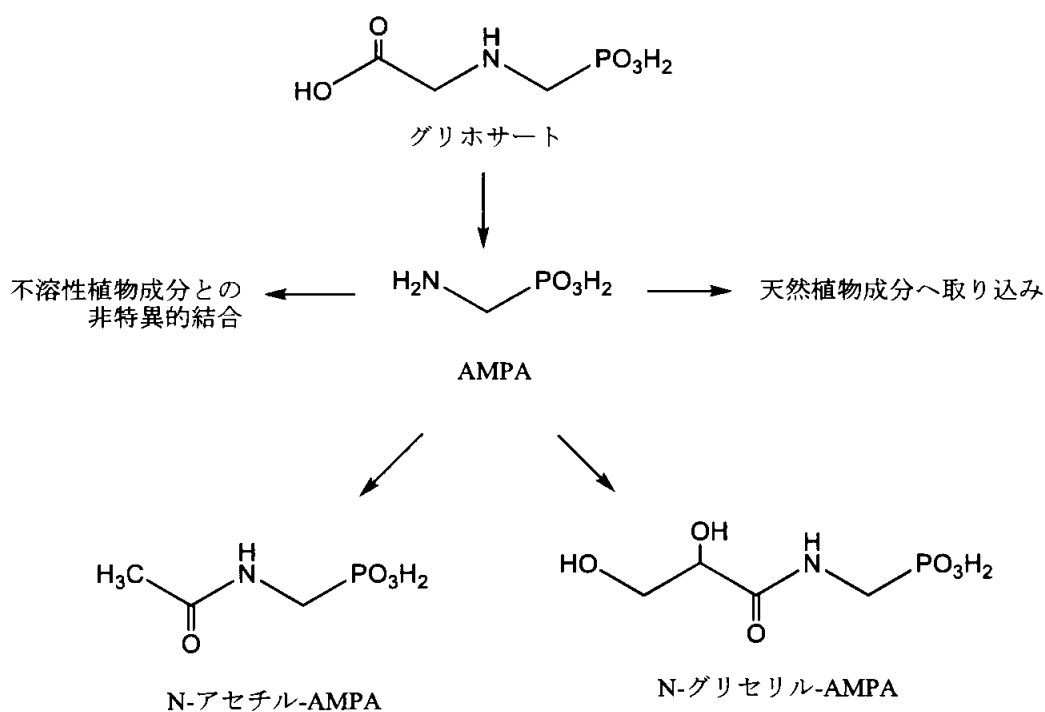
検出された代謝物から判断して、代謝経路は次のように考察された。代謝経路として、グリホサートオキシドレダクターゼ酵素により、まず、グリホサート由来の代謝物として知られている AMPA に速やかに分解される。AMPA はグリセリン酸&

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

アセチル補酵素との反応でそれぞれN-グリセリル-AMPA&N-アセチル-AMPAを生成して抱合体となる。また、AMPAは不溶性植物成分に非特異的に結合する。AMPAの1炭素フラグメントへの正確な経路は不明であるが、一つの経路として、細菌で認められているように、炭素-リン結合の開裂が起こり、N-メチルアセトアミドあるいはメチルアミンを生成し、さらにCO<sub>2</sub>に分解する。別な経路として、アミノ基転移が起こり、ホルミルリン酸となり、さらに、CO<sub>2</sub>に分解することが考えられる。いずれにしろ、AMPAは1炭素フラグメントに分解し、種々の脂肪酸、アミノ酸および他の天然物に広く取り込まれ、植物の天然構成成分を形成する。

従って、グリホサート耐性カノーラにおける想定代謝経路は、既知の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。

#### グリホサートのトウモロコシにおける想定代謝経路





(資料 No. 10-11)

(11) グリホサート耐性ワタにおけるグリホサートの代謝試験

試験機関：

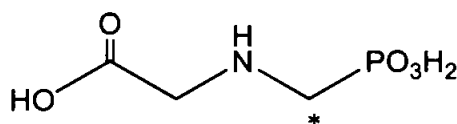
[GLP 対応]

報告書作成年： 1997 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<sup>13</sup>Cおよび<sup>14</sup>Cで標識]

化学名；N-(ホスホノメチル)グリシン

	<sup>14</sup> C-標識体	<sup>13</sup> C-標識体
比放射能	14.4 mCi/mmol	<sup>13</sup> C 存在比 99%
放射化学的純度	99%	化学的純度 99%

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。  
<sup>13</sup>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； 99.8%

処理溶液の調製：<sup>14</sup>C-標識体を<sup>13</sup>C-標識体および非標識体で希釈して5.81 mCi/mmol (76272 dpm/μg、放射化学的純度98.08%)の試験標識体とした。これをイソプロピルアミン、水および市販のラウンドアップ製剤に使用されている界面活性剤の混液に溶解して、試験製剤を調製した(0.2138 mCi/g)。さらに、水で希釈して処理溶液を調製した。

対照区(非標識体処理区)には市販のラウンドアップ製剤を使用し、標識体と同様に希釈して処理溶液とした。

供試植物：ワタ [PV-GHGT07、遺伝子型 1445；ラウンドアップ・レディ® CP4 EPSPS 遺伝子導入]

このワタは *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-エノールピルビル-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 Coker 312 (C312)に戻し交配して作出した。

栽培環境：

栽培場所：ミズリー州 コロンビア ABC ラボラトリーズの 2 棟の温室内。土壤被覆区と無被覆区は別棟の温室内で栽培した。

試験容器：約 91 cm x 240~305 cm x 深さ 61 cm のスチールタンクに微砂質壤土を充填した。

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。

播種： 容器当り土壤被覆区は 60 種子、無被覆区は 40 種子を、条間約 50 cm の 2 条に播種間隔約 8~10 cm、播種深度 2.5 cm として播種。

処理方法：

試験区：<sup>14</sup>C-標識体の土壤との接触による微生物分解由来の<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>取り込みによる放射能の残留をできるだけ少なくするために、処理時に土壤表面を被覆して処理した土壤被覆区と無被覆区を設けた。処理薬量および処理時期等を以下に示す。

(原報告書 P.24 APPLICATION TREATMENT GROUPS)

供試化合物	試験区呼称*	1 回目処理			2 回目処理			温室番号
		処理量 (kg ae/ha)	播種後日数	供試植物数	処理量 (kg ae/ha)	播種後日数	供試植物数	
土壤被覆区								
<sup>14</sup> C-標識体	TP	0.93	42	56	1.27	51	43	4
非標識体	CP	0.85	42	54	1.29	51	43	
土壤無被覆区								
<sup>14</sup> C-標識体	TN	0.93	42	20	1.27	51	18	1a
非標識体	CN	0.85	42	16	1.28	51	15	

\*：T は<sup>14</sup>C-標識体処理、C は非標識体処理、P は土壤被覆、N は土壤無被覆を意味する。  
ae とはグリホサート酸換算の薬量

処理時の植物の大きさ：1 回目処理；3~4 葉期  
2 回目処理；5~6 葉期

散布方法：加圧式噴霧器で全面茎葉処理。

試料の採取：

土壤：1 回目処理直後、2 回目処理直前および直後（0 日）、27 および 158 日後に土壤表面から約 30 cm の深さまでの土壤を容器当り 3 コアーを採取し、約 15 cm の部位で二分し、部位別に 1 試料とした。

植物：<sup>14</sup>C-標識体処理植物は表 1 のように採取した。

表 1 試料採取時期別採取本数（原報告書 P.117 TABLE IV）

試料採取時期	採取植物	非標識体処理		<sup>14</sup> C-標識体処理	
		土壤被覆 CP	土壤無被覆 CN	土壤被覆 TP	土壤無被覆 TN
1 回目処理直後 (播種後 42 日)	未熟植物	11	1	13	2
2 回目処理直後 (播種後 51 日)	未熟植物	4	1	4	2
2 回目処理後 27 日 (播種後 78 日)	茎葉	9	2	4	2
	茎葉洗浄	0	0	5	2
2 回目処理後 158 日 (播種後 209 日)	成熟期	30	12	30	12

採取試料の処置：未熟植物および茎葉は植物全体を用い、成熟期試料はワタ毛、ワタ子実および茎に分けた。試料はドライアイスが存在下で凍結後、ブレンダー、カッター/ミキサーあるいは製粉ミル等を用いて均質化した。

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。

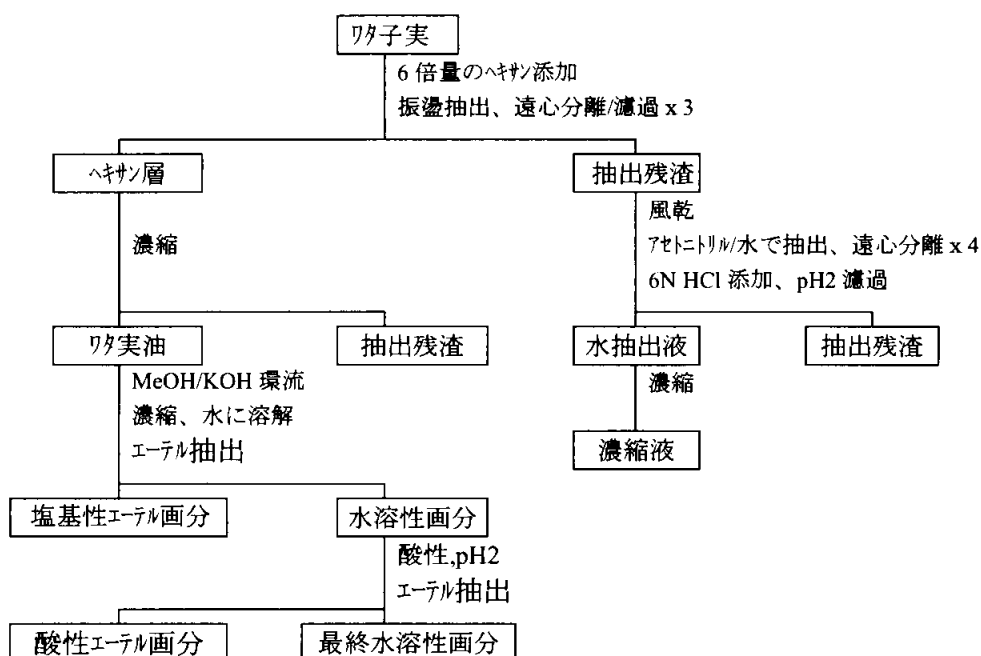
#### 放射能の抽出/分画：

$^{14}\text{C}$ -標識体処理植物の茎葉およびワタ子実を抽出し、分析した。非標識体処理 CN 区  
のワタ子実も抽出したが、放射能が少なく分析しなかった。非標識体処理 CP 区  
の放射能は 0.05ppm 以下と少なく、抽出しなかった。茎およびワタ毛は残留量のみ測  
定した。

茎葉からの抽出：茎葉試料に約 3 倍量の水を添加し、組織ホモジェナイザーで混合/振盪  
抽出、遠心分離を 4 回繰り返した。洗浄茎葉も同様に抽出したが、結果は無洗浄試  
料と類似していたので、これ以上分析しなかった。

ワタ子実からの抽出： $^{14}\text{C}$ -標識体処理の TP 区および TN 区ならびに非標識体処理の CN  
区からの均質化試料を用いて抽出した。

スキーム (原報告書 P.69 Figure 12, P.70 Figure 13 及び P.71 Figure 14)



#### 代謝物の分析：

各試料の定量分析には HPLC/RAD および HPLC/LSC で行い、以下に記載のように  
種々のカラムおよび溶媒系を使用した。同定は標品との比較分析および ESI/MS で  
行った。

SAX HPLC 法-1：強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SAX

溶媒：A；4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.0

B；4%MeOH 添加 0.100 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.0

SCX HPLC 法-2：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

溶媒：0.005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH 2.0 (必要により 0.5 mM EDTA 添加)

CX HPLC 法-3：強陽イオン交換クロマトグラフィー (全般の分析用)

カラム：SCX

溶媒：4%MeOH 添加 0.005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.0

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。

総放射能の測定：抽出前試料中の総放射能（TRR）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<sub>2</sub>を捕集液に捕集して、また、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：<sup>14</sup>C-標識体処理TN区の茎葉およびワタ子実を用い、表2の時期に分析して安定性を確認した。

表2 <sup>14</sup>C-標識体処理TN区の保存安定性の確認時期（試料採取後抽出または分析までの日数）（原報告書 P.53 Table 9）

分析法	初回抽出/分析	最終抽出/分析
茎葉		
燃焼	48	393
抽出	35	393
SAX HPLC	46	393
ワタ子実		
燃焼	65	272
ヘキサン抽出	63	267
水抽出	64	268
SAX HPLC	69	273

結果： 残留量 ppm は全てグリホサート当量 ppm を示す。

総残留放射能(TRR)：ワタのTRRを表3に示した。

表3 処理直後の未熟植物、茎葉および成熟期の茎、ワタ子実、ワタ毛中のTRR(ppm)（原報告書 P.118 TABLE V）

試料採取時期	試料		<sup>14</sup> C-標識体		非標識体	
			TN	TP	CN	CP
1回目処理直後	未熟植物	無洗浄	289	180	0.005	0.006
2回目処理直後	未熟植物	無洗浄	352	316	0.014	0.006
2回目処理後27日	茎葉	無洗浄	15.2	30.4	0.039	0.008
		洗浄後	6.28	6.98	NA	NA
		洗液	11.2	15.9	NA	NA
2回目処理後158日	成熟期	茎	0.179	0.105	0.047	0.008
		ワタ子実	0.181	0.107	0.070	0.018
		ワタ毛	0.140	0.083	0.057	0.016

NA：非標識体処理区の茎葉は洗浄しなかった。

<sup>14</sup>C-標識体処理後27日に採取した茎葉には土壌被覆（TP）区および無被覆（TN）区でTRRはそれぞれ30.4および15.2 ppmであった。この差は、使用した植物数が少ない（前者が4植物、後者が2植物）ことによる変動と考えられる。

非標識体処理区ではTP区およびTN区とも微量（<0.05 ppm）の残留放射能が認められ、量が少ないので、<sup>14</sup>C-標識体処理区の残留に及ぼす影響は少ないことを示唆している。洗浄した茎葉では約6~7 ppmが吸収残留であり、25~50%TRRが水洗浄

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。

後の茎葉中に残っていた。

茎葉の残留が高いのに対して、成熟期に採取した茎、ワタ子実およびワタ毛では<0.2 ppmの残留であった。成熟期採取試料において、<sup>14</sup>C-標識体処理 TN 区の残留は0.140~0.181 ppmであったのに対して、対応する非標識体 CN 区は0.047~0.070 ppmで、TN 区試料中の残留の26~41%を占めている。非標識体 CP 区の残留は<sup>14</sup>C-標識体処理 TP 区の残留の8~19%を占めていた。<sup>14</sup>C-標識体処理の TN 区の残留は被覆区の残留より約70%多く、試料中の TRR は<sup>14</sup>C-標識体の土壌分解によって生成した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>の取り込み以上の残留であることを示している。

残留放射能の抽出/分画：茎葉およびワタ子実における総残留放射能の抽出性について表4に示した。

茎葉において、残留放射能は水できわめて効率よく>95%TRR が抽出され、結合残留は<5%TRR であった。

ワタ子実において、ヘキサンでワタ実油分が<sup>14</sup>C-標識体処理(TP および TN)区で11~15%TRR が抽出され、非標識体処理 (CN) 区でも<sup>14</sup>C-標識体処理 (TN) 区のワタ実油中放射能の約60%に相当する23%TRR が抽出された。これは、処理した植物の葉面吸収および土壌に散布/滴下し分解した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>のワタ実油中への取り込みによることを示唆している。アセトニトリル/水で抽出した画分には<sup>14</sup>C-標識体処理区で0.034 ppm (TP 区で31.9%TRR、TN 区で18.6%TRR)、非標識体処理 (CN) 区で0.006 ppm (8.8%TRR)が含まれていた。

表4 総残留放射能の茎葉およびワタ子実における分布  
(原報告書 P.46 Table 2, P.47 Table 3, P.48 Table 4 及び P.49 Table 5)

供試化合物	試験区呼称 <sup>a</sup>	PHI <sup>b</sup>	TRR (ppm)	ヘキサン抽出 ppm (%TRR)	水抽出 ppm (%TRR)	抽出残渣 ppm (%TRR)	回収率 (%)
<b>茎葉</b>							
<sup>14</sup> C-標識体	TP	27	30.4	*	30.0 (98.5)	0.447 (1.47)	100.0
	TN	27	15.4	*	14.7 (96.9)	0.708 (4.7)	101.6
非標識体	CP	27	0.008	**	**	**	**
	CN	27	0.039	**	**	**	**
<b>ワタ子実</b>							
<sup>14</sup> C-標識体	TP	158	0.107	0.012 (11.3)	0.034 (31.9)	0.058 (54.1)	97.3
	TN	158	0.181	0.027 (14.7)	0.034 (18.6)	0.136 (75.4)	108.7
非標識体	CP	158	0.018	**	**	**	**
	CN	158	0.070	0.016 (22.9)	0.006 (8.8)	0.053 (76.1)	107.8

\*: 水でのみ抽出      \*\*: 抽出せず

<sup>a</sup>: TP=<sup>14</sup>C-標識体を土壌被覆して処理 (対照)、TN=<sup>14</sup>C-標識体を土壌無被覆で処理  
CP=非標識体を土壌被覆して処理 (対照)、CN=非標識体を土壌無被覆で処理

<sup>b</sup>: PHI=2 回目処理後収穫までの日数

残留の同定：代謝物は高極性で、水溶性であるために、一つの HPLC 法では成分の分離ができなかったため、強塩基性陰イオン交換 (SAX HPLC) および強陽イオン交換 (SCX HPLC) の両方で分析した結果を表5に、ワタ実油画分 (表6) および抽出残渣画分 (表7) の特性分析結果のまとめと共に示す。

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5  $^{14}\text{C}$ -標識体を2回処理後のワタの茎葉および子実中の残留放射能の特性  
(原報告書 P.48 Table 4, P.49 Table 5 及び P.52 Table 8)

画分	$^{14}\text{C}$ -標識体処理 土壤被覆(TP)区				$^{14}\text{C}$ -標識体処理 土壤無被覆(TN)区				非標識体処理土 壤無被覆(CN)区	
	茎葉		ワタ子実		茎葉		ワタ子実		ワタ子実	
	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm
未抽出	100	30.4	100	0.107	100	15.2	100	0.181	100	0.070
ヘキサン抽出ワ実油 鹼化脂肪酸			11.3 10.4	0.012 0.011			14.7 12.3	0.027 0.022	22.9	0.016
水抽出液	98.5	30.0	31.9	0.034	96.9	14.7	18.6	0.034	8.83	0.006
グリホサート	95.7	29.1	23.7	0.025	91.5	13.9	12.0	0.022		
AMPA	0.66	0.201	1.38	0.001	1.60	0.243	<1	<0.002		
抱合体	0.29	0.087			0.54	0.082				
天然物	0.4	0.123	6.93	0.007	0.83	0.127	5.83	0.011		
抽出残渣(結合残渣)	1.47	0.447	54.1	0.058	4.7	0.708	75.4	0.136	76.1	0.053
塩基可溶性			10.7	0.011						
非抽出性			43.4	0.047						
総回収率	100.0	30.4	97.4	0.104	101.6	15.4	108.7	0.197	107.8	0.075
同定/特徴付け合計	97.1	29.5	53.1	0.057	94.5	14.4	30.1	0.054		

茎葉において、主要な残留はグリホサート (>90%TRR)および主要な代謝物である AMPA (<2%TRR)であった。この両者で>93%TRR を占めていた。この他に微量 (<1% TRR) の抱合体および天然物が認められた。

ワタ子実において、ワタ子実の水抽出画分においても茎葉と同様主要な残留はグリホサート (12~24%TRR)で、ついで、天然物画分に 6~7%TRR が含まれていた。AMPA は<2%TRR と少なかった。グリホサートおよび AMPA の合計残留は 12~25% TRR を占めるが、<0.03ppm と少なかった。

ワタ実油画分を鹼化した後、加水分解物を酸性にする前後にエーテル抽出して、約 10~12%TRR (ワタ実油中放射能の 83~92%) の鹼化脂肪酸 (酸性エーテル画分) を得た。非鹼化脂質 (塩基性エーテル画分) は 0.03~0.3%TRR (ワタ実油中放射能の 0.3~2%) 含まれていた (表6)。

表6 ヘキサン抽出ワ実油画分の特性 (原報告書 P.49 Table 5 及び P.50 Table 6)

画分	$^{14}\text{C}$ -標識体処理 土壤被覆(TP)区			$^{14}\text{C}$ -標識体処理 土壤無被覆(TN)区			非標識体処理土 壤無被覆(CN)区	
	ワ実油 画分 の%	%TRR	ppm	ワ実油 画分 の%	%TRR	ppm	%TRR	ppm
ヘキサン抽出ワ実油	100.00	11.32	0.012	100.00	14.68	0.027	22.9	0.016
塩基性エーテル	0.25	0.03	<0.001	2.02	0.30	0.001		
酸性エーテル	92.32	10.45	0.011	83.36	12.24	0.023		
水溶性	7.62	0.86	0.001	5.66	0.83	0.002		
総回収率	100.19	11.34	0.012	91.05	13.37	0.025	107.8	0.075

ワタ子実の結合残留は非常に多く、 $^{14}\text{C}$ -標識体処理の TP 区で 54.1%TRR、TN 区で 75.4%TRR、非標識体処理の CN 区で 76.1%TRR を占めていた。この CN 区における高い結合残留は天然物への  $^{14}\text{CO}_2$  の取り込みを示している。抽出残渣の放射能の抽出は 1%ラウリル硫酸ナトリウムおよび 0.1N NaOH で最も効率良く抽出でき、それ

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。

ぞれ残渣中放射能の約 18~22%を抽出できた。これらの抽出後の残渣中の放射能は TP 区で 0.045~0.047 ppm、TN 区で 0.083~0.086 ppm であった。0.1N NaOH 抽出液中にグリホサートも AMPA も検出されなかった (<0.001 ppm)。

表 7 ワタ子実抽出残渣の残留放射能の特性 (原報告書 P.51 Table 7)

画分	<sup>14</sup> C-標識体処理 土壌被覆区 TP <sup>a</sup>				<sup>14</sup> C-標識体処理 土壌無被覆区 TN <sup>b</sup>			
	抽出量		抽出残渣		抽出量		抽出残渣	
	残渣画 分の%	% TRR	ppm	ppm	残渣画 分の%	% TRR	ppm	ppm
抽出残渣 (結合残渣)		54.13	0.058			57.97	0.105	
水	8.16	4.42	0.005	0.053	0.95	0.55	0.001	0.104
アセトニトリル	2.97	1.61	0.002	0.056	2.22	1.28	0.002	0.103
0.1N HCl	14.95	8.09	0.009	0.049	16.31	9.45	0.017	0.088
0.1N NaOH	19.81	10.72	0.011	0.047	18.41	10.67	0.019	0.086
1%ラウリル硫酸ナトリウム	21.74	11.77	0.013	0.045	21.01	12.18	0.022	0.083
70%アセトン/水	14.56	7.88	0.008	0.050	5.82	3.37	0.006	0.099

<sup>a</sup>: 定量分析用に抽出後の残渣

<sup>b</sup>: 最終保存安定性分析用に抽出後の残渣

保存安定性試験: 実験開始時の初回抽出と凍結保存後の最終抽出時の残留放射能の抽出性 (表 8) および水抽出画分の HPLC 分析 (表 9) 結果を以下に示す。

実験期間中グリホサート由来の代謝物は安定であった。

表 8 <sup>14</sup>C-標識体処理 TN 区の保存安定性 (原報告書 P.54 Table 10)

試料/分析時期		TRR (dpm/g)	ヘキサン抽出 (%TRR)	水抽出 (%TRR)	抽出残渣 (%TRR)	回収率 (%)
茎葉	初回抽出	1,162,950	NA	85.76	4.53	90.29
	最終抽出	1,144,606	NA	96.86	4.66	101.52
ワタ子実	初回抽出	14,565	13.83	17.66	62.89	94.38
	最終抽出	15,563	12.38	18.11	57.97	88.46

NA: 適用なし

表 9 水抽出画分の SAX HPLC/LSC 分析による主要放射性物質の安定性 (原報告書 P.55 Table 11)

分析時期		主要ピーク		
		AMPA	グリホサート	ピーク 1 <sup>a</sup>
茎葉	初回抽出	1.67	96.19	
	最終抽出	1.97	94.31	
ワタ子実	初回抽出		56.07	35.03
	最終抽出		52.42	39.45

<sup>a</sup>: 初期 (4~8 分) の溶出ピーク

土壤中の残留放射能：土壤中の残留放射能を表 10 に示す。

<sup>14</sup>C-標識体を処理後土壌無被覆(TN)区の 0~15 cm 層の残留濃度は 1 回目処理直後で 0.472 ppm、2 回目処理前後で、それぞれ 0.569 および 0.569 ppm であった。2 回目処理 27 日後（茎葉採取時）で 1.07 ppm、2 回目処理 158 日後（成熟時）で 0.701 ppm であった。15~30 cm 層の濃度は 2 回目処理 27 日後の 0.018 ppm を除いていずれも <0.010 ppm であった。

土壌被覆 (TP) 区の 0~15 cm 層の濃度は 1 回目処理直後で 0.002 ppm、2 回目処理前後で、それぞれ 0.001 および 0.004 ppm で、158 日後で 0.016 ppm であった。15~30 cm 層の濃度は 2 回目処理 158 日後の 0.023 ppm を除いていずれも <0.003 ppm であった。

表 10 <sup>14</sup>C-標識体処理区の土壌中における放射能の残留  
(原報告書 P.119 TABLE VI)

試料採取時期		0-15cm 層		15-30cm 層	
		TN (ppm)	TP (ppm)	TN (ppm)	TP (ppm)
1 回目処理	処理前	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	処理直後	0.472	0.002	0.010	<0.001
2 回目処理	処理直前	0.569	0.001	-	0.003
	処理直後	0.569	0.004	0.002	<0.001
	27 日後	1.070	0.013	0.018	<0.001
	158 日後	0.701	0.016	0.009	0.023

MQL=1.515~1.656 x 10<sup>-3</sup> ppm      -: 分析せず

## 結論

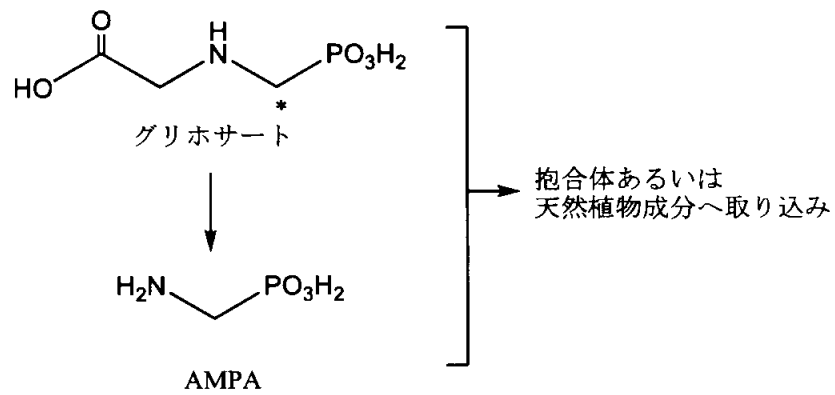
ラウンドアップ®除草剤をラウンドアップ・レディ遺伝子導入ワタの生育中に実用使用量で合計 2 回全面茎葉処理して処理後の残留放射能の特性を検討した結果、茎葉中の残留は 15~30 ppm と高かったが、成熟時ワタ子実中の残留は 0.1~0.2 ppm のみであった。茎葉では >91%TRR がグリホサートで、主要代謝物の AMPA は <2%TRR と少なかった。ワタ子実においても、同様にグリホサート (12~24%TRR) に比較して、AMPA (<1.5%TRR) は少なく、ワタ中のグリホサートの代謝は緩慢であることを示唆している。天然物として特徴付けられた放射能は 6~7%TRR を占めていた。ワタ子実中の残留放射能の 54~75%TRR が結合残留であり、11~15%TRR がワタ実油に残留していた。非標識体処理後、<sup>14</sup>C-標識体処理植物と同じ温室で栽培したワタ子実のこれらの画分にも高い放射能が認められ、天然植物構成成分への <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込みがワタ子実中の残留放射能に大きく寄与していることを示している。

ワタにおける主要な代謝経路は既実施の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。



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。

グリホサートのワタにおける想定代謝経路



申請者注) 原報告書には想定代謝経路は記載されていないが、同定及び特徴付けの結果から申請者が上記の経路を作成した。