

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. 土壌中動態に関する試験

1. 好氣的湛水土壌中動態試験

(資料No. 11-5)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1990年

供試標識化合物： 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート	[¹⁴ C] アミノメチルホスホン酸
化学名 (IUPAC)	<i>N</i> -(phosphonomethyl)-glycine	aminomethylphosphonic acid
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}-\overset{*}{\text{C}}\text{H}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$	$\text{H}_2\text{N}-\overset{*}{\text{C}}\text{H}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$
比放射能	3.98 mCi/mMole	23.8 mCi/mMole
放射化学的純度	98.8% (HPLCで確認)	95-97%

供試土壌：池（ケンタッキー州、フェイエットカウnty、米国）で採取した底質を用いた。表1にその特性をまとめる。

表1 供試土壌の特性

pH	6.6
土性分類：	シルト質埴壌土
砂	12%
シルト	59%
粘土	29%
有機物質	0.9%
陽イオン交換容量	16 meq/100 g
圃場容水量 (1/3 bar)	36.0%

供試池水：水試料は底質を採取したのと同じ池から採取した。その特性を表2に示す。

表2 供試池水の特性

総アルカリ度	84 mg/L CaCO ₃
pH	7.3
総懸濁物質	6 mg/L
特異的伝導度	264 μmhos/cm

方法：

試験系：

試験容器：500 mLの三角フラスコに擦りガラス製ストッパーとガラス製コックのある導入チューブと排出チューブを付け、底質および池水を入れる前にオートクレーブで滅菌した。チューブは、フラスコ内の空気置換のために用いた。

温度条件：23～25℃（平均温度24.6±0.57℃）

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。

被験物質の調製および底質への施用； ^{14}C グリホサートは水で調製した（25,607,120 dpm/mL、 $11.5 \mu\text{Ci/mL}$ ）。この溶液1.0 mLを池水（92 mL）に添加後、底質20 g（乾燥重量）を加えた。

試験濃度； ^{14}C グリホサート濃度，4.1 ppm
（水100 mLと底質20 gからなる懸濁液120gに対する濃度。（ $120\text{g} \times 4.1 \mu\text{g/g} = 492 \mu\text{g}$ ））

インキュベーション；土壌および水を混合し、フラスコをアルミホイルで覆い、酸素を通気後、約25°Cの暗所でインキュベートした。コントロール試料（被験物質なし）も同時に調製し、インキュベートした。

採取時期；試料は各採取時点で2連採取した。
施用区試料：0、1、3、7、10、15、20、24、30日後
コントロール試料：30日後

揮発性代謝物および $^{14}\text{CO}_2$ の採取；
捕集剤：エチレングリコール（有機揮発性物質用）
10%水酸化ナトリウム（ $^{14}\text{CO}_2$ 用）
採取時点：約7日間毎および試料の採取時点
採取方法：新鮮酸素をフラスコ内に通気し、フラスコ内に放出された有機揮発性物質を完全に捕集剤に吸収されるようにした。

放射能の測定；
液体試料：直接LSC測定。
底質：燃焼後、LSC測定。

試料の処理；通気置換後直ちにpHおよび溶存酸素（mg/L）を測定した。各内容物を水で洗浄しながら250 mL容プラスチック製遠沈管に移し、遠心分離した。各試料の上清を分取し容量を測定した後、一部を放射能測定用に分取した。水試料は、4°Cで保存した。

底質の抽出；全底質試料を250 mL容プラスチック製遠沈管に入れ、0.5 N水酸化カリウム溶液で抽出した。表3に各試料の抽出手順の詳細を示す。各採取時点での試料を○で示した方法を用いて、順次抽出した。抽出液は遠心分離後分取し、KOH抽出液およびEDTA抽出液を得た。

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

表3 底質の抽出方法

試料採取 時点 (日)	0.5 N KOH抽出				0.03 M EDTA抽出		
	3×50 mL 20分間	1×50 mL 20分間, 1×100 mL 一晩	2×50 mL 30分間, 1×50 mL 一晩	1×50 mL 30分間, 1×100 mL 一晩	2×50 mL 1時間	3×50 mL 1時間	1×100 mL 一晩
0	○						
1		○					
3			○		○		
7			○		○		
10				○			○
15				○			○
20				○			○
24				○		○	
30				○	○		

コントロール試料；処理30日後に採取し、溶存酸素およびpHを測定。水および底質の抽出液には放射能は検出されなかった。

放射性成分の特徴づけ；水および土壌抽出液中の放射性成分はHPLCにより特徴づけた。さらに [¹⁴C] グリホサートおよび [¹⁴C] AMPA標準品との比較により確認した。

計算方法；

半減期： [¹⁴C] グリホサートの代謝速度定数および半減期は擬似一次反応式を用いて算出した。

以下の式から分解速度定数を計算した：

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (y = mx + b)$$

ここで k = 速度定数

C = 化合物の濃度

t = 時間

C₀ = 化合物の初期濃度 (t=0)

グリホサートの半減期は以下の式を用いて算出した：

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k}$$

結果：

1) [¹⁴C] グリホサートの放射化学的純度

[¹⁴C] グリホサートの放射化学的純度は、施用前にHPLC分析で求め、98.8%であった。 [¹⁴C] グリホサートおよび [¹⁴C] AMPAの放射化学的純度を最終採取時点後に測定した結果、安定であった。

2) 試料の処理

全ての底質/水試料のpHは5.9~7.0であった。溶存酸素は5.0~20.0 mg/Lであり、試験系は試験中、好気条件下であった。

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。

- 3) [^{14}C] グリホサートの抽出および物質収支
底質および水試料の放射能分布と物質収支を表4に示す。

表4 放射能分布と物質収支

試料採取時点 (日) / フラスコNo.	施用放射能 (%)						総回収率 (%)
	水	KOH 抽出液	EDTA 抽出液	NaOH 捕集液	エチレングリ コール捕集液	抽出 残留物	
0/ F1	1.2	100.2	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	3.4	104.8
0/ F3	1.2	97.6	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	4.6	103.4
1/ F14	4.9	86.9	— ¹⁾	0.6	0.2	5.0	97.6
1/ F15	4.6	86.9	— ¹⁾	0.9	0.2	5.0	97.6
3/ F2	8.7	71.4	1.2	4.7	0.0	5.5	91.5
3/ F4	7.1	78.2	1.2	3.6	0.1	5.8	96.0
7/ F8	8.7	65.5	1.4	21.3	0.4	6.7	104.0
7/ F11	10.1	67.1	1.6	14.4	0.4	7.5	101.1
10 / F12	8.7	59.0	2.2	12.5	0.5	8.1	91.2
10 / F13	6.3	53.1	2.7	14.2 ²⁾	0.5 ²⁾	6.4	83.2
15 / F17	4.8	52.3	2.4	25.4	0.4	8.4	93.7
15 / F18	7.8	44.9	2.1	13.9	1.9	6.6	77.3
20 / F5	7.6	50.3	1.5	23.0	0.3	8.7	91.4
20 / F6	7.6	46.9	2.2	19.3	1.8	8.4	86.2
24 / F7	6.9	48.9	4.5	22.4 ²⁾	5.8 ²⁾	6.6	95.1
24 / F9	5.5	41.6	3.5	26.1	3.8	4.5	84.9
30 / F10	6.7	42.9	3.5	27.1	3.2	8.6	92.0
30 / F16	4.1	45.2	2.9	18.6	1.8	5.7	78.3
平均	5.4	44.1	3.2	22.9	2.5	7.2	85.2
総平均回収率							92.7
標準偏差							±8.3
— ¹⁾ : 採取せず。全採取時点における全試料フラスコの洗浄液はすべて施用放射能の0.1%未満であった。							
²⁾ : 洗浄中に損失したので、その日に他のサンプルから得られた値の平均を用いて外挿した値。							

表4に示すように、池水中の放射能は施用放射能の<10%であり（処理7日後の1点を除く）、放射能の大部分は底質中に認められた。処理30日後の試料において $^{14}\text{CO}_2$ は施用放射能の22.9%、エチレングリコール捕集剤は施用放射能の2.5%であった。施用放射能の総回収率は92.7±8.3%であった。総回収率が低い原因は、主要代謝物である $^{14}\text{CO}_2$ が、酸素置換中に損失した可能性が考えられる。

0.5 N水酸化カリウムおよび0.03 M EDTAで抽出後の底質の抽出残留物には施用放射能の3.4~8.7%であったが、経時的に増加する傾向がみられた。

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。

4) [¹⁴C] グリホサートの減衰

水と水酸化カリウム抽出液の放射性成分の特徴を表5に示す。

表5 水および水酸化カリウム中の [¹⁴C] グリホサートのHPLC分析結果

試料採取時点 (日)	フラスコ No.	施用放射能 (%)					分析放射能
		グリホサート	AMPA	未知物質 A	未知物質 B	その他 未知物質	
0	F1	94.4	3.1	0.3	2.4	1.1	101.4
	F3	91.6	3.4	0.4	2.6	1.0	98.8
	平均	93.0	3.3	0.4	2.5	1.1	
1	F14	82.1	6.6	0.5	2.0	0.6	91.8
	F15	80.6	7.7	0.9	2.2	0.1	91.5
	平均	81.4	7.2	0.7	2.1	0.4	
3	F2	60.7	15.0	1.2	2.6	0.5	80.1
	F4	67.6	14.0	0.9	2.6	0.3	85.3
	平均	64.2	14.5	1.0	2.6	0.4	
7	F8	46.1	23.9	1.5	2.1	0.7	74.2
	F11	54.4	19.4	1.2	2.2	ND	77.2
	平均	50.3	21.7	1.4	2.2	—	
10	F12	40.3	22.9	1.1	2.4	0.6	67.7
	F13	33.0	22.4	1.2	1.8	1.0	59.4
	平均	36.7	22.7	1.2	2.1	0.8	
15	F17	33.3	19.5	1.2	2.3	0.8	57.1
	F18	24.5	24.0	1.7	2.5	ND	52.7
	平均	28.9	21.8	1.5	2.4	—	
20	F5	28.0	24.5	2.0	2.1	0.1	57.3
	F6	23.9	25.0	1.7	2.6	1.4	54.5
	平均	26.0	24.8	1.9	2.4	0.7	
24	F7	27.8	23.7	1.4	2.4	0.5	55.8
	F9	21.8	20.7	1.7	2.8	ND	47.1
	平均	24.8	22.2	1.6	2.6	—	
30	F10	21.8	23.0	1.3	2.6	0.9	49.6
	F16	22.6	22.3	1.6	1.7	1.0	49.3
	平均	22.2	22.7	1.5	2.2	1.0	

未知物質A：保持時間約4分
 未知物質B：保持時間約8分
 その他未知物質：個々には施用放射能の1%を超えなかった
 ND：バックグラウンドの2倍より大きくは検出されず

表5より、処理30日後に施用放射能の22%が [¹⁴C] グリホサートとして残存し、抽出液中の主要分解物は [¹⁴C] アミノメチルホスホン酸 (AMPA) (22.7%) であった。2個の未知代謝物 (A, B) が検出されたが、その検出量は施用放射能の0.3~2.8%であった。その他にいくつかの未知物質が検出されたが、個々の未知物質としては施用放射能の1.0%を超えなかった。 [¹⁴C] グリホサートの想定代謝経路を図1に、 [¹⁴C] グリホサートの分解を図2にグラフで表す。

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。

図1 グリホサートの想定代謝経路

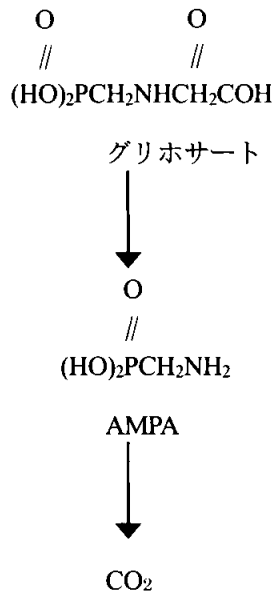
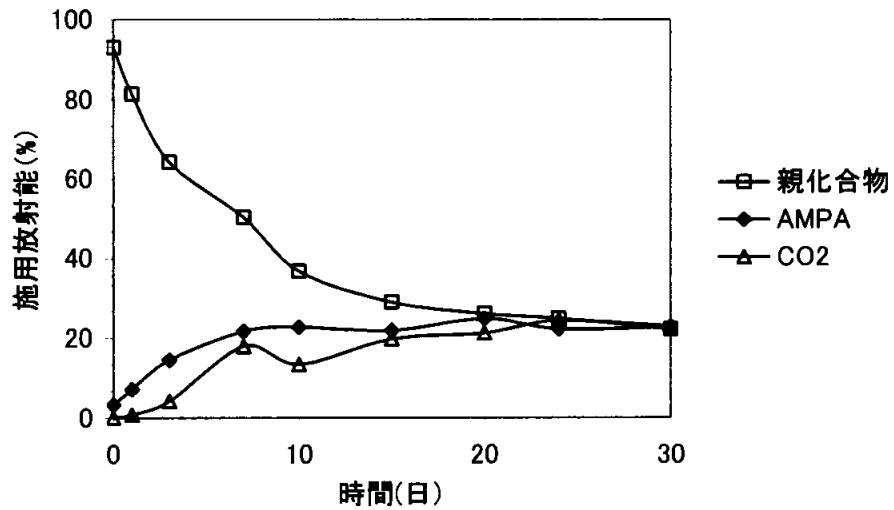


図2 グリホサートの減衰 (好氣的湛水中の分解)



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。

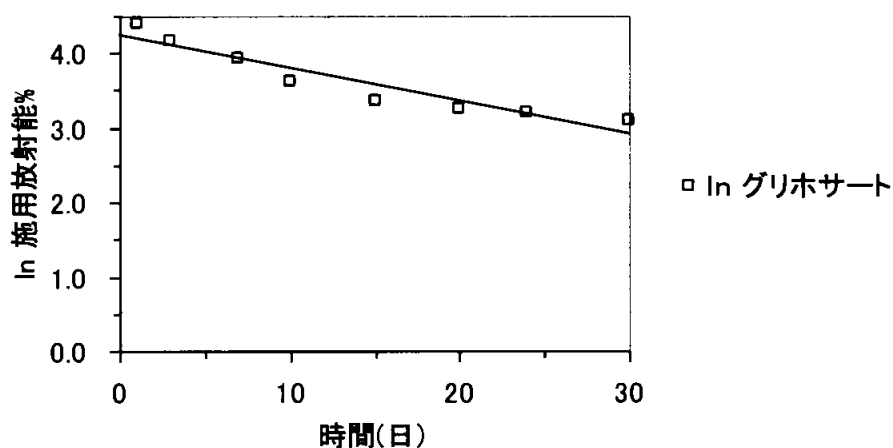
5) 半減期

本試験条件下でのグリホサートの半減期は14.4日であった。半減期の計算を表6に示す。図3に時間に対する親化合物の施用放射能に対するパーセントの自然対数をプロットしたグラフを示す。

表6 グリホサートの好氣的湛水代謝における半減期の計算

試料採取時点 (日)	親化合物 (%)	ln 親化合物%
0	93.0	4.533
1	81.4	4.399
3	64.2	4.162
7	50.3	3.918
10	36.7	3.603
15	28.9	3.364
20	26.0	3.258
24	24.8	3.211
30	22.2	3.100
相関係数 (R)		-0.948
切片		4.315
傾き (-k)		-0.048 / 日
半減期		14.4日

図3 グリホサートの減衰 (グリホサート%の自然対数)



まとめ：グリホサートは好氣的湛水条件下で迅速に分解し、その推定半減期は14.4日であった。主要な分解生成物はアミノメチルホスホン酸 (AMPA) およびCO₂であった。いくつかの未同定代謝物も生成したが、これらはいずれもグリホサートの初期濃度の2.8%を越えなかったため、重要ではないと判断した。想定代謝経路は、まず最初にグリホサートからAMPAへの転換、次いでさらにAMPAからCO₂への代謝であった。

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

2. 好氣的土壤中動態試験 (スイス土壤)

(資料No. 11-6)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成 : 1993年

供試標識化合物 : 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート
化学名 (IUPAC)	N-(phosphonomethyl)-glycine
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \quad \quad \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
比放射能	304 μCi/mg (11.2 MBq/mg)
放射化学的純度	96.6 or 96.3%# (TLCで確認)

: 原文19頁と原文34頁で値が異なる。

供試土壤 : スイス土壤 “Les Evouettes II”

土壤履歴 ; 土壤は1988年10月にRCCより入手した。スイスのLes Evouettes/VSで土壤表面から20 cmを採取後、RCCで、室温 (冬期) で約1ヶ月間保管し、保管中定期的に散水した。下表にその特性等をまとめる。

供試土壤の特性等

pH	6.1
有機炭素 (g/100 g乾土)	1.40
有機物質 (有機炭素 x 1.72)	2.41
陽イオン交換容量 (meq/100 g乾土)	15.5
粒径, wt % : a)BBA分類	砂 (>0.02 mm)
	シルト (0.02 - 0.002 mm)
	粘土 (<0.002 mm)
	11.3
b)USDA分類	砂 (>0.05 mm)
	シルト (0.05 - 0.002 mm)
	粘土 (<0.002 mm)
	11.3
土性 (ISSA 分類)	シルト質壤土
圃場容水量 (FC) % ; 乾土あたり	40.2
最大容水量 (MWC)%	55.3
(MWC ; g/100 g乾土 : 40%MWC)	22.1 (55%FC)
かさ密度 (40%MWC; g/ cm ³)	0.913
微生物バイオマス (mgC/100 g土壤) : 開始時	58.5
	インキュベーション完了時
	22.0

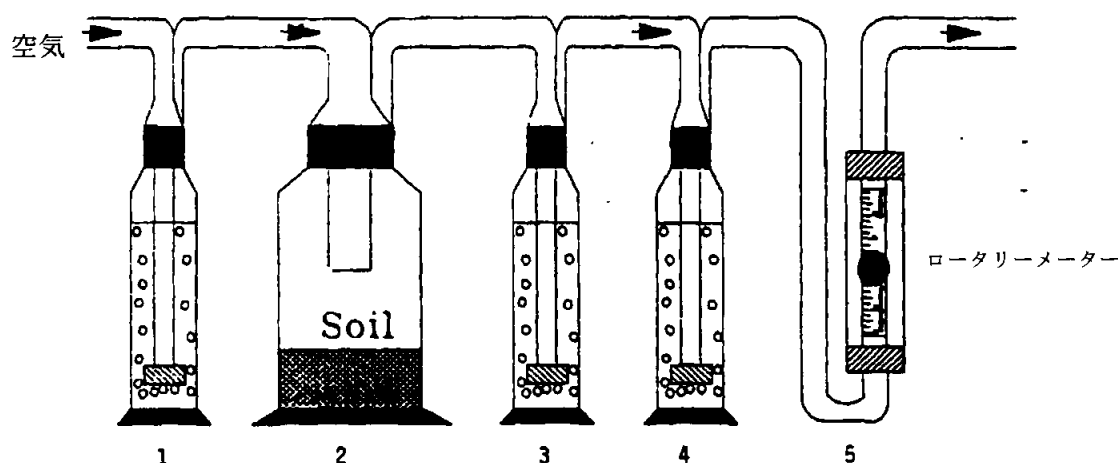
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

方 法：

試験系の調製；使用前に2 mmの篩を通した土壌を、予備試料2個を含む計24個のフラスコにそれぞれ100 gの乾土相当を量り取り調製。水分含有量は圃場容水量（FC）の55%に相当する、最大容水量の40%に調整した。

実験装置；オープンガスフローシステム付き全ガラス製代謝装置を使用した。装置の概略図をスキーム1に示した。

スキーム1 土壌代謝装置



- 1 フリー空気を加湿するための水洗瓶
- 2 代謝フラスコ
- 3 $^{14}\text{C}-\text{CO}_2$ 用のNaOH捕集剤
- 4 揮発性化合物用のエチレングリコール捕集剤
- 5 フローメーター

施用液の調製；被験物質は比放射能 $200 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ の水溶液で施用した。保存原液（ $1.22 \text{ mg } ^{14}\text{C}-\text{グリホサート}$ ） 1.87 mL と非標識化合物 5.5 mg とを混合し、水で 25 mL とした（比放射能： $14.8 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ 、 $55.16 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ ）。

土壌処理；2 mmの篩を通した土壌に $^{14}\text{C}-\text{グリホサート}$ を $0.2419 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 乾土の濃度（目標値： $0.24 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 乾土、土壌密度 $1.5 \text{ g}/\text{cm}^3$ および浸透深度 5 cm ；放射比活性： $55.16 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ ）で処理した。その後土壌水分含量を最大容水量の40%（圃場容水量（FC）の55%に相当）に調整した。

施用濃度の根拠；薬剤処理は最大施用慣行量 $1.8 \text{ kg}/\text{ha}$ に基づいた。

インキュベーション；

フラスコを代謝装置にセットし、温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗所でインキュベートした。

温度は毎週確認した。土壌試料の水分含量は毎週確認し、必要ならば調整した。

採取時期；各試料採取時点（0日後を除く）で2連採取。

①捕集剤；

水酸化ナトリウム；3、7、14、21、28日後、その後試験終了まで2週間毎
エチレングリコール；3、7、14、21、28、42日後

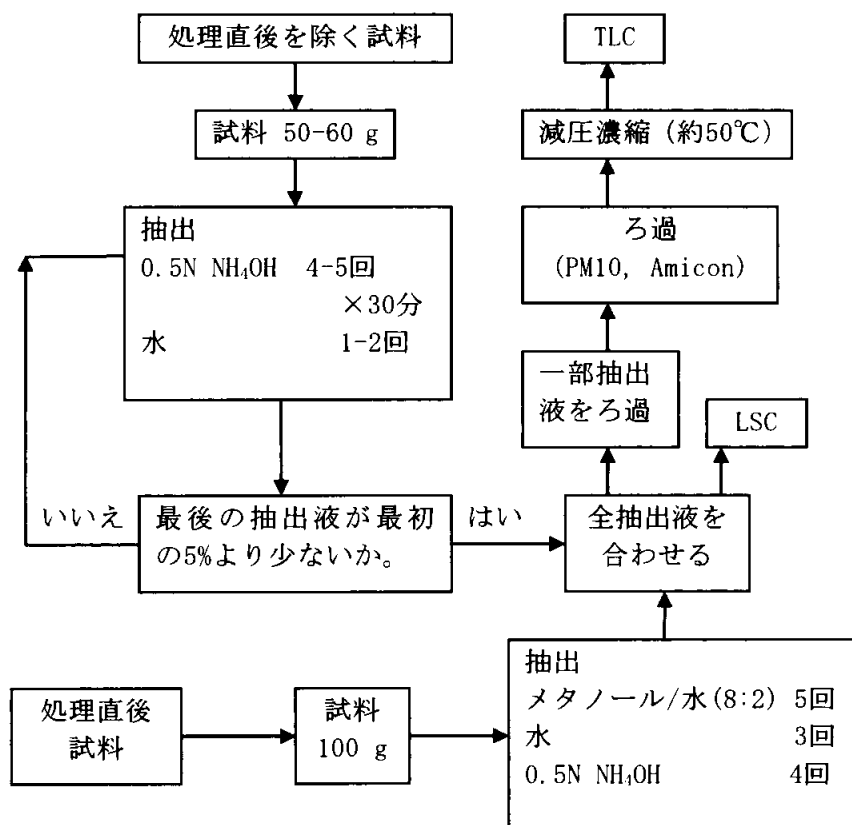
②土壌試料；処理後0（施用直後）、3、7、14、28、56、84、112、168、252、364
日後

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。

分析法：

土壌中の放射能の抽出および単離；抽出方法の概略をスキーム2に示す。

スキーム2 分析経路



放射能の抽出：

土壌試料；処理直後の試料を除き、土壌を0.5 N水酸化アンモニウム、水で順次抽出し、全抽出液を混合して、LSC測定した。抽出溶媒量は約2 mL/g土壌であった。3日後の試料のうち1点は、メタノール/0.5 N水酸化アンモニウム(8:2、v/v)で抽出した後、上記により抽出した。0日後の試料は、メタノール/水(8:2、v/v)、水および0.5 N水酸化アンモニウムで順次抽出した。抽出残渣は酸化燃焼処理した。

放射能の単離：混合抽出液の一部をろ過し、濃縮後TLC分析した。残りの抽出液は約-20°Cに保存した。

放射能の測定；

土壌試料：酸化燃焼後、LSC測定。

液体試料：直接LSC測定。水酸化ナトリウム捕集液は飽和水酸化バリウムで¹⁴C-CO₂であることを確認した。

抽出物の同定；¹⁴C-グリホサートおよびその主代謝物(AMPA)は、参照化合物と3種類のTLC固定相(シリカゲル、セルロース、RP-18)を用いて同定した。さらにHPLCおよび高電圧電気泳動を用いて確認した。

計算方法；

グリホサートの消失速度：¹⁴C-グリホサートの分解による消失動態を時間の平方根を用いて一次反応モデルに適用し、解明した。

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。

$$\frac{-dC}{dt} = k_1 \times C \quad (1)$$

注釈： $C = t = 0$ の場合 C_0 (2)

$C = t > 0$ の場合 C (3)

ここで： $C =$ 各インキュベーション時間 t (日) における被験物質の濃度 (mg/kg)

$C_0 =$ 0日後の抽出で得られた被験物質の濃度 (mg/kg)

$k_1 =$ 一次反応定数；1/日

積分結果は：

$$\ln(C) = \ln(C_0) - k_1 \cdot t \quad (4)$$

時間の平方根を用いて、常用対数に変換した結果：

$$\log(C) = \log(C_0) - k_1 \cdot t^{0.5} \quad (5)$$

数式(5)はインキュベーション時間に対する C の値を計算するため、通常逆変換して用いる：

$$C = 10^{(\log(C_0) - k_1 \cdot t^{0.5})}$$

DT-50およびDT-90を求める数式を以下に示す：

$$DT-50 = \frac{(\log(2))^2}{(k_1)} \quad (6)$$

$$DT-90 = \frac{(\log(10))^2}{(k_1)}$$

結果：

1) ^{14}C 標識被験物質の放射化学的純度および安定性

保存原液中の ^{14}C -グリホサートの放射化学的純度はTLCで求め、96.3%であった（原文19頁と原文34頁で値が異なる）。さらに施用液中の ^{14}C -グリホサートの純度は、土壌に施用前で96.5%、施用後で97.0%であり、施用操作中において被験物質は安定であった。

2) 放射能の分布および物質収支

土壌の抽出可能物、抽出不能物および ^{14}C - CO_2 を含む試料の放射能分布と物質収支を表1、2および図1に示す。

表1および図1は施用放射能の%での値を、表2は親化合物相当量の濃度 (ppm) としての値を示す。

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1 ¹⁴C-グリホサート処理” Les Evouettes” 土壌の施用放射能の物質収支

採取日(日)		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364
施用放射能		%										
土壌	抽出可能物	92.2	83.1	79.7	75.3	63.9	53.8	55.7	50.4	42.8	39.9	36.3
	抽出不能物	6.4	9.9	10.0	12.5	13.7	14.1	12.8	13.9	16.9	13.2	19.8
捕集液	揮発性化合物	n. d.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	¹⁴ C-CO ₂	n. d.	5.8	10.7	15.5	22.1	28.8	32.3	32.7	36.8	38.7	41.6
計		98.6	98.8	100.5	103.2	99.7	96.7	100.8	96.9	96.4	91.8	97.7
総平均回収率(%) =		98.3±3.0										
n. d. : 測定せず 2点の平均値												

表2 ¹⁴C-グリホサート処理” Les Evouettes” 土壌の施用放射能の物質収支

採取日(日)		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364	
濃度		mg equiv. /kg											
土壌	抽出可能物	A	2.231	1.941	1.844	1.864	1.575	1.293	1.362	1.212	1.038	0.969	0.883
		B	2.231	2.079	2.014	1.778	1.518	1.308	1.331	1.226	1.033	0.959	0.872
		平均	2.231	2.010	1.929	1.821	1.547	1.301	1.347	1.219	1.036	0.964	0.878
	抽出不能物	A	0.154	0.254	0.240	0.333	0.354	0.323	0.328	0.340	0.380	0.324	0.389
		B	0.154	0.226	0.246	0.273	0.307	0.360	0.293	0.330	0.437	0.316	0.569
		平均	0.154	0.240	0.243	0.303	0.331	0.342	0.311	0.335	0.409	0.320	0.479
捕集液	揮発性化合物	A	n. d.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
		B	n. d.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
		平均	n. d.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	¹⁴ C-CO ₂	A	n. d.	0.143	0.255	0.367	0.533	0.706	0.779	0.824	0.884	0.947	1.007
		B	n. d.	0.138	0.263	0.381	0.536	0.687	0.786	0.758	0.894	0.926	1.006
		平均	n. d.	0.141	0.259	0.374	0.535	0.697	0.783	0.791	0.889	0.937	1.007
計	A	2.385	2.337	2.339	2.563	2.462	2.322	2.469	2.376	2.302	2.240	2.279	
	B	2.385	2.443	2.523	2.431	2.361	2.355	2.410	2.314	2.363	2.201	2.447	
	平均	2.385	2.390	2.431	2.497	2.412	2.339	2.440	2.345	2.333	2.221	2.363	
総平均回収率(%) =	A	2.370±0.095											
	B	2.385±0.084											
	平均	2.378±0.072											
初期値 : 0.2419 mg/100 g、2.419 ppm n. d. : 測定せず 濃度の平均値は2点の結果を用いて申請者が計算													

図1 ^{14}C -グリホサート処理” Les Evouettes” 土壌の施用放射能の総収支 (申請者作成)

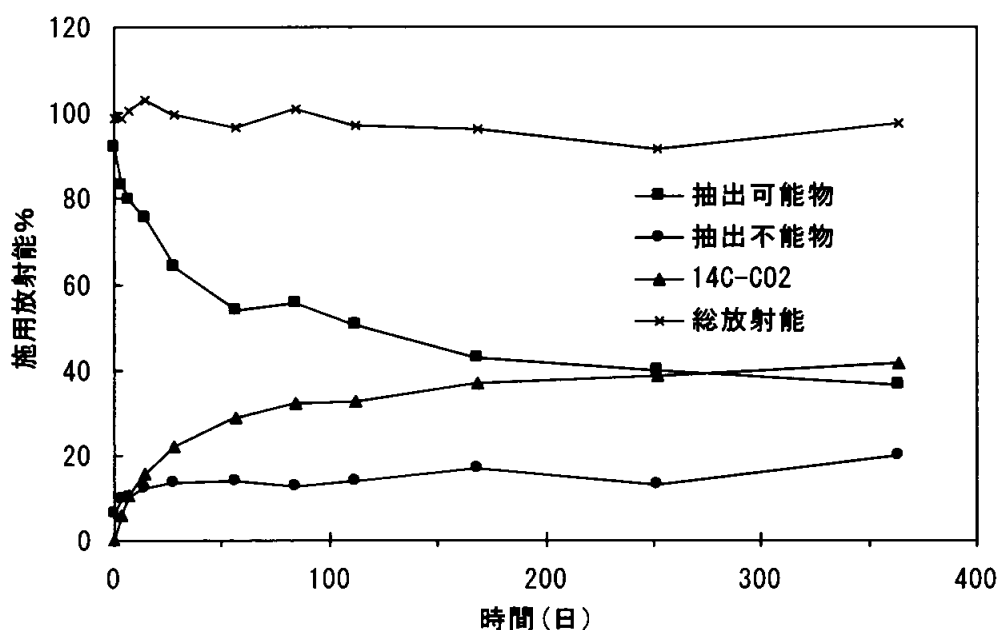


表1、2に示すように、施用放射能の回収率は非常に高く、平均すると施用放射能の $98.3 \pm 3.0\%$ ($2.370 \sim 2.385$ ppm) であった。

2-1) 抽出可能放射能

施用直後 (0日後) に抽出された放射能は、施用放射能の92.2% (2.231 ppm) であった。これは処理直後に親化合物の一部が土壌へ特異的に吸着されたことを示す。経時的に、抽出可能放射能量は、処理56日後までは、急速に減少した (0日後の92.2% から56日後の53.8%)。その後 ^{14}C の抽出率は緩やかに減少した (56日後の53.8% から364日後の36.3%)。抽出可能放射能の緩やかな損失は ^{14}C -グリホサートの無機化 (^{14}C -CO₂の形成) の速度と対応した。放射能の抽出溶媒は、0日後の試料でメタノール/水 (8+2, v/v) 混液を用いたが、十分に抽出できなかったため、水と0.5 N 水酸化アンモニウムに代えたところ、充分抽出できた。

2-2) 抽出不能放射能

抽出不能放射能は処理直後 (0日後) に認められた。抽出不能放射能の初期値は施用放射能の6.4%であり、 0.154 ppm親化合物相当量であった。14日後で初期施用放射能の12.5%となり、わずかな増加後、この低レベルがほぼ一定で残存した。364日後の抽出不能放射能は 0.479 ± 0.127 ppm (平均値) で、施用放射能の $19.8 \pm 5.2\%$ であった。

pHの高い抽出溶媒により、フルボ酸とフミン酸に関連する結合残留物が同時に抽出されたために抽出不能放射能が低かった。

2-3) 揮発性化合物

放射性の揮発性化合物は施用放射能の0.1%を越えなかった。

一方、Les Evouettes土壌中におけるグリホサートの無機化は顕著であり、364日後には施用放射能の41.6%に達した。

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

3) 放射能の特徴

3-1) 代謝物のパターン

表3および図2に土壤試料より得られた代謝物のパターンを総施用放射能に対する割合で示す。表4および図3には対応するppm（土壤単位あたりの親化合物相当量）値で表す。

表3 Les Evouettes[®] 抽出物中のグリホサートおよび代謝物の分布（施用放射能%）

画分	Rf 値*			成分名	採取日(日)												
	SS11 セルロース	SS16 RP-18	SS19 シリカゲル		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364		
	施用放射能%																
P	0.12- 0.34	0.87- 0.93	0.46- 0.65	親化合物	A	78.3	65.6	49.5	48.9	36.7	24.3	19.4	16.3	9.4	8.3	7.4	
					B	78.3	69.0	58.6	38.7	36.1	25.4	19.6	21.8	10.8	8.4	6.0	
					平均	78.3	67.3	54.0	43.8	36.4	24.8	19.5	19.1	10.1	8.3	6.7	
M1	0.32- 0.48	0.45- 0.85	0.26- 0.47	AMPA (B)	A	4.0	6.2	14.9	12.2	19.7	21.1	28.3	28.3	16.6	17.7	21.2	
					B	4.0	6.4	11.5	13.5	21.9	22.7	30.4	26.9	21.7	18.8	21.4	
					平均	4.0	6.3	13.2	12.8	20.8	21.9	29.3	27.6	19.2	18.3	21.3	
M2	0.00- 0.02	0.00- 0.02	0.00- 0.02	未知	A	9.9	8.5	11.9	9.1	8.7	8.1	3.7	5.4	0.0	0.0	0.0	
					B	9.9	10.5	13.2	21.2	4.8	6.1	5.0	2.0	0.0	0.0	0.0	
					平均	9.9	9.5	12.6	15.2	6.8	7.1	4.4	3.7	0.0	0.0	0.0	
M3	0.69	0.01	0.4	未知	A	0.0	0.0	0.0	6.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
					B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
					平均	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
M4	0.96	0.01	0.95	未知	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	
					B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
					平均	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	
M5	0.01- 0.15	0.01- 0.13	0.01- 0.3	未知	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	14.0	7.8	
					B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.2	12.5	8.7	
					平均	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	13.3	8.3	
計					A	92.2	80.2	76.2	77.0	65.1	53.4	56.3	50.0	42.9	40.0	36.5	
					B	92.2	85.9	83.2	73.5	62.8	54.1	55.0	50.7	42.7	39.6	36.1	
					平均	92.2	83.1	79.7	75.3	64.0	53.8	55.7	50.4	42.8	39.8	36.3	

* : Rf 値の大きな変動
 施用放射能の平均値は P および M1 は報告書に記載の数値、その他は 2 点の結果を用いて申請者が計算。

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

表4 Les Evouettes” 抽出物中のグリホサートおよび代謝物の分布 (mg/kg乾土 (ppm))

画分	Rf 値*			成分名	採取日(日)												
	SS11 セキボース	SS16 RP-18	SS19 シカゲル		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364		
	濃度 mg euiv./kg																
P	0.12- 0.34	0.87- 0.93	0.46- 0.65	親化合物	A	1.894	1.586	1.197	1.183	0.887	0.588	0.468	0.395	0.226	0.201	0.179	
					B	1.894	1.669	1.418	0.937	0.873	0.613	0.475	0.527	0.261	0.202	0.146	
					平均	1.894	1.627	1.307	1.060	0.880	0.601	0.472	0.461	0.244	0.201	0.162	
M1	0.32- 0.48	0.45- 0.85	0.26- 0.47	AMPA (B)	A	0.096	0.149	0.360	0.294	0.477	0.509	0.685	0.686	0.402	0.429	0.514	
					B	0.096	0.156	0.278	0.327	0.530	0.548	0.735	0.650	0.525	0.456	0.517	
					平均	0.096	0.153	0.319	0.311	0.504	0.529	0.710	0.668	0.463	0.442	0.515	
M2	0.00- 0.02	0.00- 0.02	0.00- 0.02	未知	A	0.238	0.206	0.288	0.220	0.211	0.195	0.090	0.131	0.000	0.000	0.000	
					B	0.238	0.254	0.318	0.514	0.115	0.146	0.121	0.049	0.000	0.000	0.000	
					平均	0.238	0.230	0.303	0.367	0.163	0.171	0.106	0.090	0.000	0.000	0.000	
M3	0.69	0.01	0.4	未知	A	0.000	0.000	0.000	0.166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
					B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
					平均	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
M4	0.96	0.01	0.95	未知	A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.118	0.000	0.000	0.000	0.000	
					B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
					平均	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000	
M5	0.01- 0.15	0.01- 0.13	0.01- 0.3	未知	A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.410	0.339	0.190	
					B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.247	0.301	0.209	
					平均	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.329	0.320	0.200	
計					A	2.229	1.941	1.844	1.864	1.575	1.293	1.362	1.212	1.038	0.969	0.883	
					B	2.229	2.079	2.014	1.778	1.518	1.308	1.331	1.226	1.033	0.959	0.872	
					平均	2.229	2.010	1.929	1.821	1.547	1.301	1.347	1.219	1.036	0.964	0.878	

図2 ” Les Evouettes” 土壤中の¹⁴Cグリホサートの分解および分解生成物の形成(平均値) (申請者作成)

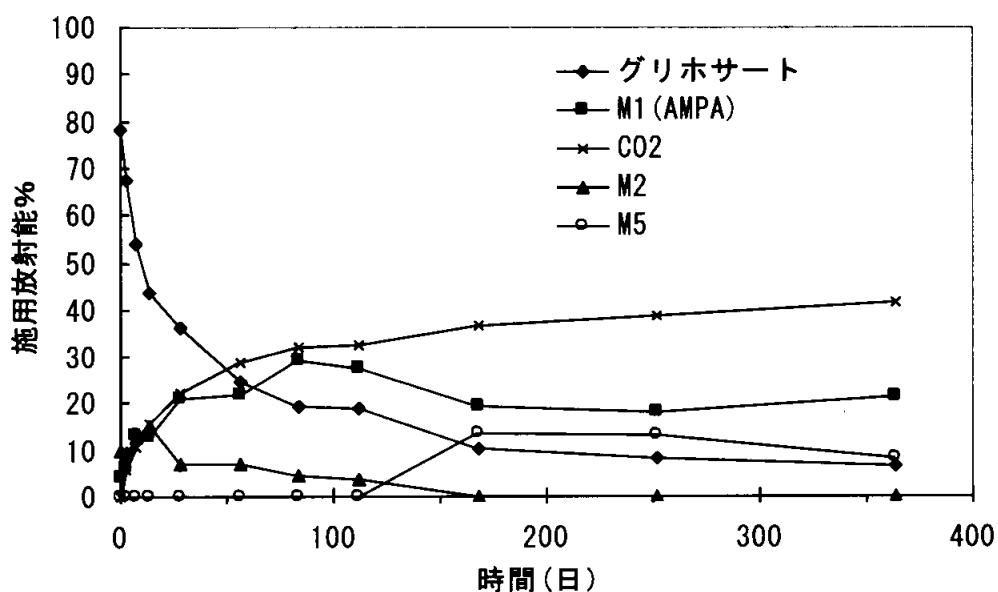


図3 "Les Evouettes" 土壤中の¹⁴Cグリホサートの分解および分解生成物の形成(平均値)
(申請者作成)

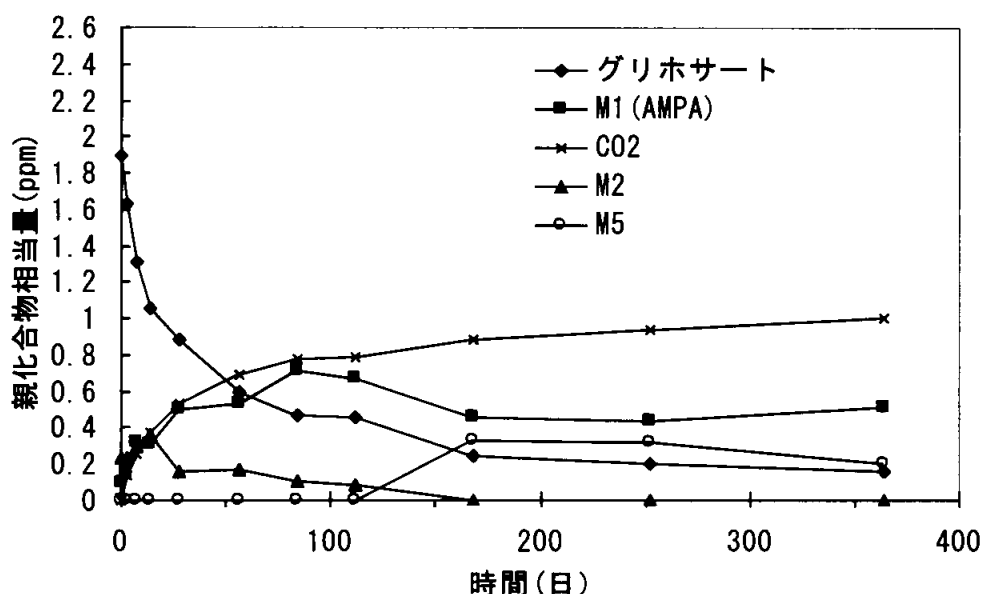


表3、4および図2、3に示されるように、グリホサートは¹⁴C-グリホサート施用0日後に既に主要代謝画分 (M1) に分解し、M1は84日後に最大土壤濃度に達した。さらに他の2つの放射性画分 (M2およびM5) が土壤抽出物のTLC分離後に認められた。M2およびM5は、グリホサートがフルボ酸もしくはフミン酸と結合した放射性物質であると推測された。

申請者注) M2およびM5はグリホサートを含む抽出液の濃縮操作によって生成し、TLC上で検出される。EDTAを添加することによってグリホサートに変換することが確認されており、分析操作によるアーティファクトであることが推測された。

親化合物 (グリホサート) は、0日後は施用放射能の78.3% (1.894 ppm) であったが、364日後には平均6.7% (0.162 ppm) に徐々に減少した。

M1は、0日後に施用放射能の4.0% (0.096 ppm) であったが、84日後に最大土壤濃度の29.3% (0.710 ppm) に達した。試験終了時での土壤中におけるM1の平均含有量は21.3% (0.515 ppm) であった。

M2の濃度は0日後の9.9% (0.238 ppm) から14日後の15.2% (0.367 ppm) そして112日後の3.7% (0.090 ppm) と変動した (平均値)。M5の量は168日後の13.6% (0.329 ppm) から364日後の8.3% (0.200 ppm) まで変化した (平均値)。

代謝物画分M3およびM4は、それぞれ14日後と84日後のみに検出された。

以上の結果と生成されたCO₂の結果を表5および6にまとめる。

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

表5 ^{14}C -グリホサート処理した” Les Evouettes” 土壌のインキュベーション後の放射能分布

成分名		採取日(日)										
		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364
		施用放射能%										
グリホサート	A	78.3	65.6	49.5	48.9	36.7	24.3	19.4	16.3	9.4	8.3	7.4
	B		69.0	58.6	38.7	36.1	25.4	19.6	21.8	10.8	8.4	6.0
	平均	78.3	67.3	54.0	43.8	36.4	24.8	19.5	19.1	10.1	8.3	6.7
	SD(%)		2.6	8.5	11.6	0.8	2.1	0.7	14.3	7.2	0.5	10.3
AMPA	A	4.0	6.2	14.9	12.2	19.7	21.1	28.3	28.3	16.6	17.7	21.2
	B		6.4	11.5	13.5	21.9	22.7	30.4	26.9	21.7	18.8	21.4
	平均	4.0	6.3	13.2	12.8	20.8	21.9	29.3	27.6	19.2	18.3	21.3
	SD(%)		2.1	12.8	5.3	5.2	3.7	3.5	2.7	13.3	3.0	0.4
CO_2	A	n. d.	5.9	10.5	15.2	22.0	29.2	32.2	34.0	36.6	39.1	41.6
	B		5.7	10.9	15.8	22.2	28.4	32.5	31.3	36.9	38.3	41.6
	平均		5.8	10.7	15.5	22.1	28.8	32.3	32.7	36.8	38.7	41.6
	SD(%)		1.5	1.6	1.9	0.3	1.4	0.4	4.2	0.5	1.1	0.0
未知物質	A	9.9	8.5	11.9	15.9	8.7	8.1	8.6	5.4	17.0	14.0	7.8
	B		10.5	13.2	21.2	4.8	6.1	5.0	2.0	10.2	12.5	8.7
	平均	9.9	9.5	12.5	18.6	6.7	7.1	6.8	3.7	13.6	13.2	8.2
	SD(%)		10.4	5.1	14.2	29.3	14.3	26.5	45.5	24.8	5.9	4.9
結合残留物	A	6.4	10.5	9.9	13.8	14.6	13.4	13.6	14.1	15.7	13.4	16.1
	B		9.3	10.2	11.3	12.7	14.9	12.1	13.6	18.0	13.0	23.5
	平均	6.4	9.9	10.0	12.5	13.7	14.1	12.8	13.9	16.9	13.2	19.8
	SD(%)		5.7	1.1	9.9	7.1	5.4	5.8	1.5	7.0	1.4	18.7
計		98.6	98.8	100.5	103.2	99.7	96.7	100.8	96.9	96.4	91.8	97.7

SD : 標準偏差

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 ^{14}C -グリホサート処理した”Les Evouettes” 土壌のインキュベーション後の放射能分布

成分名		採取日(日)										
		0	3	7	14	28	56	84	112	168	252	364
		濃度 mg equiv./kg										
グリホサート	A	1.894	1.586	1.197	1.183	0.887	0.588	0.468	0.395	0.226	0.201	0.179
	B	1.669	1.418	0.937	0.873	0.613	0.475	0.527	0.261	0.202	0.146	
	平均	1.894	1.627	1.307	1.060	0.880	0.601	0.472	0.461	0.244	0.201	0.162
	SD(%)		2.6	8.5	11.6	0.8	2.1	0.7	14.3	7.2	0.5	10.3
AMPA	A	0.096	0.149	0.360	0.294	0.477	0.509	0.685	0.686	0.402	0.429	0.514
	B		0.156	0.278	0.327	0.530	0.548	0.735	0.650	0.525	0.456	0.517
	平均	0.096	0.153	0.319	0.311	0.504	0.529	0.710	0.668	0.463	0.442	0.515
	SD(%)		2.1	12.8	5.3	5.2	3.7	3.5	2.7	13.3	3.0	0.4
CO_2	A	n. d.	0.143	0.255	0.367	0.533	0.706	0.779	0.824	0.884	0.947	1.007
	B		0.138	0.263	0.381	0.536	0.687	0.786	0.758	0.894	0.926	1.006
	平均		0.140	0.259	0.374	0.535	0.696	0.782	0.791	0.889	0.936	1.006
	SD(%)		1.5	1.6	1.9	0.3	1.4	0.4	4.2	0.5	1.1	0.0
未知物質	A	0.238	0.206	0.288	0.386	0.211	0.195	0.208	0.131	0.410	0.339	0.190
	B		0.254	0.318	0.514	0.115	0.146	0.121	0.049	0.247	0.301	0.209
	平均	0.238	0.230	0.303	0.450	0.163	0.171	0.165	0.090	0.329	0.320	0.200
	SD(%)		10.4	5.1	14.2	29.3	14.3	26.5	45.5	24.8	5.9	4.9
結合残留物	A	0.154	0.254	0.240	0.333	0.354	0.323	0.328	0.340	0.380	0.324	0.389
	B		0.226	0.246	0.273	0.307	0.360	0.293	0.330	0.437	0.316	0.569
	平均	0.154	0.240	0.243	0.303	0.330	0.341	0.311	0.335	0.408	0.320	0.479
	SD(%)		5.7	1.1	9.9	7.1	5.4	5.8	1.5	7.0	1.4	18.7
計		2.383	2.390	2.431	2.497	2.412	2.338	2.439	2.345	2.333	2.220	2.363

SD: 標準偏差

4) 放射能画分の特徴づけ

親化合物: 放射性画分は、3種類のTLC固定相を使用してグリホサート参照化合物を用いたクロマトグラフィーにより特徴づけた。

さらにHPLCにより確認し、グリホサートの分析結果は比較的良好一致した。

インキュベーション日数	グリホサート濃度 (ppm, 平均値)	
	HPLC	TLC (3種の固相) *
0	2.229	1.894
3	1.541	1.627
7	1.929	1.307
14	1.290	1.060
28	0.908	0.880
56	0.602	0.601
84	0.541	0.472
112	0.651	0.461
168	0.446	0.244
252	0.267	0.201
364	0.313	0.162

*3種の固定相: シリカゲル、セルロース、RP-18

M1 (AMPA): TLCにより参照化合物(アミノメチルホスホン酸)とのクロマトグラフィーおよび高電圧電気泳動で確認した。

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。

5) ^{14}C -グリホサートの消失速度

グリホサートの結果 (表6、平均値) を $\sqrt{\text{時間}}$ に対してプロットして直線回帰分析を行った。求められたパラメーターを表7、分解曲線を図4に示す。

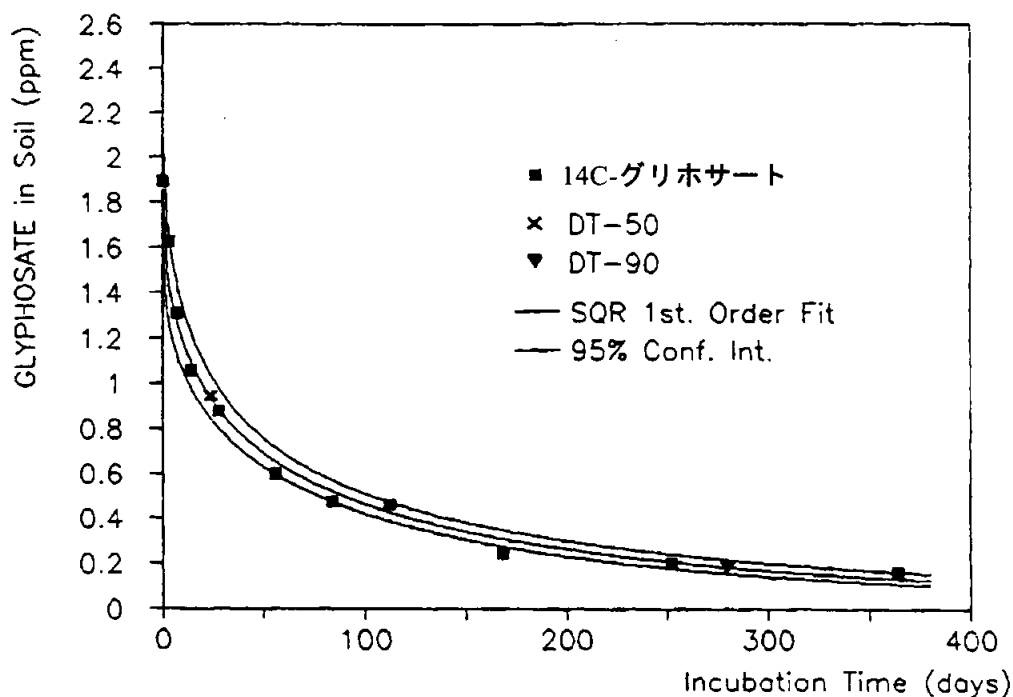
表7 "Les Evouettes" 土壌におけるグリホサートの分解に関する動態パラメーター

時間0におけるグリホサートの濃度 (C_0)	1.892 ppm
一次速度定数 (k_1)	0.05977 /日
相関係数* (R)	0.9815
DT-50	25.4 日
DT-90	279.8 日

* : 95%で有意な値

Les Evouettes土壌におけるグリホサートの半減期は25.4日で相関係数は0.98であった。親化合物が初期濃度の10%になったのは施用後279.8日後であった (DT-90、図4参照)。2連の土壌試料より得られた結果は類似していた。

図4 Les Evouettes II 土壌における ^{14}C -グリホサートの分解速度 (平方根での一次反応式)



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。

結論：

Les Evouettes 土壤に¹⁴C-グリホサートを施用直後に、施用放射能の6.4%が急速かつ不可逆的に土壤に結合した。土壤中の主要代謝生成物はアミノメチルホスホン酸 (AMPA) であった。

グリホサートの無機化は顕著であり、364日後に施用放射能の41.6%が無機化した。DT-50およびDT-90値は、それぞれ25.4日および279.8日であり、相関係数は0.98であった。抽出不能放射能は施用放射能の6.4%から19.8%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。

3. 好氣的土壤中動態試験 (US土壤)

(資料No. 11-7)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1991年

供試標識化合物： 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート	[¹⁴ C] アミノメチルホスホン酸
化学名 (IUPAC)	<i>N</i> -(phosphonomethyl)-glycine	aminomethylphosphonic acid
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}-\overset{*}{\text{C}}\text{H}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$	$\text{H}_2\text{N}-\overset{*}{\text{C}}\text{H}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$
比放射能	3.98 mCi/mmol	23.8 mCi/mmol
放射化学的純度	98.8% (HPLCで確認)	95-97%

供試土壤：Kickapoo砂壤土、Dupo微砂質壤土

土壤履歴；Kickapoo砂壤土はケンタッキー州マジソン郡、Dupo微砂質壤土はミズーリ州のセントチャールズ郡から入手した。下表に各土壤の特性等をまとめる。

供試土壤の特性等

	Kickapoo砂壤土	Dupo微砂質壤土
pH	7.3	7.5
土性分類：	砂壤土	微砂質壤土
砂%	68	24
シルト%	22	68
粘土%	10	8
有機物質	2.8%	1.0%
陽イオン交換容量	9.0 meq/100 g	10.7 meq/100 g
圃場含水量 (1/3 Bar)	21.0%	18.0%
総コロニー形成単位 (CFU/g)		
好気性細菌	6.2×10^5	4.0×10^6
放線菌	5.8×10^5	3.2×10^6
真菌	1.1×10^3	4.2×10^4

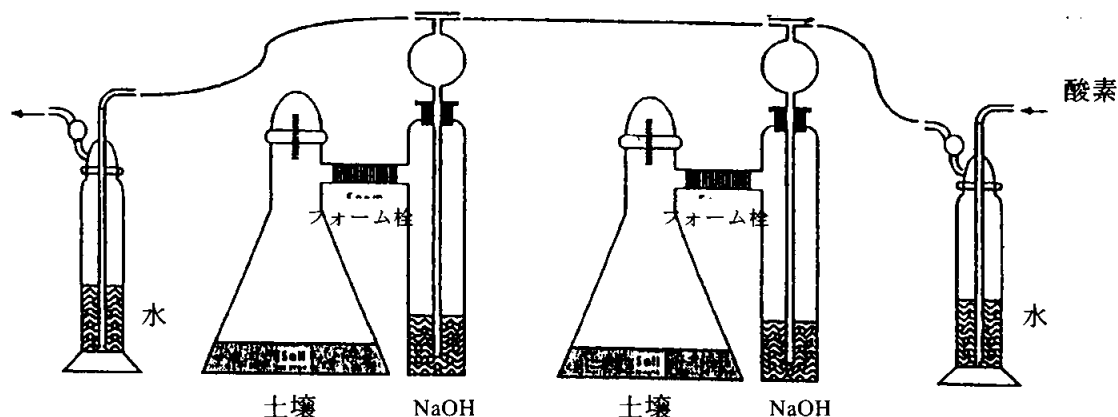
方法：

試験系の調製；土壤は風乾し、使用前に2 mmの篩を通した。滅菌500 mL容生物測定用フラスコに土壤 50 g (乾土重)を入れて、試験系を調製した。別に、土壤を入れたフラスコをオートクレーブで2度滅菌して、滅菌土壤フラスコを調製した。生物測定用フラスコのサイドアームに1 N NaOH 50 mLとサイドアームとフラスコの連結器内にポリウレタンフォーム栓を詰めた。試験系に加湿酸素を通気して、1 N NaOHへの¹⁴CO₂の吸着とポリウレタンフォーム栓への有機揮発性物質の捕集を行った。

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。

実験装置；生物測定用フラスコの仕様を図1に示した。

図1 生物測定用フラスコの仕様



被験物質の調製および土壌への施用； $[^{14}\text{C}]$ グリホサート溶液を滅菌水で $4.8 \mu\text{Ci}/2\text{mL}$ になるように調製した。この溶液（2 mL）を各フラスコの50 gの土壌（乾土重）に施用した。その後土壌水分含量を圃場容水量の75%になるように滅菌脱イオン水を加えた。土壌中の $[^{14}\text{C}]$ グリホサートの最終濃度は4.0 ppm/乾土重であった。

インキュベーション；フラスコはインキュベーター内暗所で $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で管理した。

土壌試料の水分含量；3, 7, 14日後とそれ以降は月毎に確認し、必要ならば脱イオン水で圃場容水量の75%に調整した。

採取時期；各試料採取時点で2連採取。

①土壌試料：

フラスコ；0, 1, 3, 7, 14日後および1, 2, 3, 4, 6, 9, 12ヶ月後
滅菌フラスコ；1, 3, 6ヶ月後

②捕集剤：

1 N 水酸化ナトリウム溶液（ $^{14}\text{CO}_2$ 用）
；0, 1, 3, 7, 14日後および1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12ヶ月後

ポリウレタンフォーム栓（有機揮発性物質用）

；0, 1, 3, 7, 14日後および1, 2, 3, 4, 6, 9, 12ヶ月後

抽出；各土壌試料の一部を遠沈管に量りとり、0.5 N水酸化カリウム溶液で抽出した。表1に抽出のチャートを示す。各採取時点での試料を○で示した方法を用いて、順次抽出した、抽出液は遠心分離後分取し、全抽出液を合わせた。土壌抽出液は精製およびHPLCによる分析まで約 4°C で保存した。抽出液は精製までに最大14ヶ月間保存した。

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 土壌の抽出チャート

採取時点	0.5 N KOH抽出		1.0 N KOH抽出	0.5 N KOH抽出		1.0 N KOH抽出
	3×10 mL 20分間	3×20 mL 20分間	1×20 mL 20分間	3×10 mL 20分間	3×20 mL 20分間	1×20 mL 20分間
	Kickapoo砂壌土			Dupo微砂質壤土		
0日A	○		○	○		○
0日B	○		○	○		
1日A	○		○	○		
1日B	○			○		○
3日A	○		○	○		
3日B	○		○	○		○
7日A	○		○	○		
7日B	○		○	○		
14日A		○	○		○	○
14日B		○	○		○	○
1ヶ月A		○	○		○	○
1ヶ月B		○	○		○	○
2ヶ月A		○	○		○	○
2ヶ月B		○	○		○	○
3ヶ月A		○	○		○	○
3ヶ月B		○	○		○	○
4ヶ月A		○	○		○	○
4ヶ月B		○	○		○	○
6ヶ月A		○	○		○	○
6ヶ月B		○	○		○	○
9ヶ月A		○	○		○	○
9ヶ月B		○	○		○	○
12ヶ月A		○	○		○	○
12ヶ月B		○	○		○	○
	滅菌Kickapoo砂壌土			滅菌Dupo微砂質壤土		
1ヶ月A		○	○		○	○
1ヶ月B		○	○		○	○
3ヶ月A		○	○		○	
3ヶ月B		○	○		○	
6ヶ月A		○	○		○	
6ヶ月B		○	○		○	

抽出液の精製法；土壌抽出液をアンモニウム型に置換したAG-50W-X8樹脂/Bio-Radプレパックカラムで精製した。放射性化合物は、0.1 N 水酸化アンモニウム 5 mLで溶出し、全溶出液を分取した。溶出試料を濃縮後、HPLCで分析した。

放射能の測定；

土壌試料：酸化燃焼後、LSC測定。

液体試料、抽出後のフォーム栓：直接LSC測定。

抽出物の同定； ^{14}C グリホサートおよびその主要分解物である ^{14}C アミノメチルホスホン酸 (AMPA) は、HPLCを用いて、標準品との比較により確認した。

計算方法；グリホサートの代謝速度定数 (k) および半減期は以下の線形擬似一次反応式を用いて算出した。

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

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (y = mx + b)$$

ここで k = 速度定数

C = 化合物の濃度

t = 時間

C_0 = 化合物の初期濃度 ($t=0$)

$$\text{グリホサートの半減期; } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = 0.693$$

しかし、本試験で得られたデータは線形擬似一次反応モデルに適合せず、非線形一次反応動態モデル（次式）を用いて、速度定数および施用放射能の50%に減衰するのに要する時間 (DT_{50}) を計算した。

$$C = C_0(1 + \beta t)^{-1/\alpha}$$

$$DT_{50} = [0.5^{-1/\alpha} - 1] / \beta$$

ここで C = 時間 t における濃度

C_0 = 初期濃度

α, β = 速度定数

結果：

- 1) [^{14}C] グリホサートの放射化学的純度および安定性
[^{14}C] グリホサートの放射化学的純度は、施用前にHPLC分析で求め、98.8%であった。
[^{14}C] グリホサートおよび[^{14}C] AMPAの放射化学的純度を最終採取時点後に測定した結果、安定であった。
- 2) 処理土壌試料の維持管理
インキュベーターの平均温度は $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であった。試験中の温度は $24.5 \sim 25.5^\circ\text{C}$ であった。
- 3) [^{14}C] グリホサートの抽出および物質収支
抽出効率、放射能の分布および全体の物質収支をKickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土について表 2 に示す。

表 2 に示すように、抽出後の土壌に残存する放射能は、Kickapoo砂壤土で施用放射能の3.2-11.9%、Dupo微砂質壤土で2.7-7.8%であった。施用放射能の総回収率はKickapoo砂壤土で $86.5 \pm 5.3\%$ 、Dupo微砂質壤土で $91.4 \pm 5.6\%$ であった。Kickapoo砂壤土0日後の試料の総回収率が低いのは、試料操作中と保存期間中のグリホサートの微生物分解が考えられる。

滅菌試料では、抽出後のKickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土中に施用放射能の9.5%以下しか残存していなかった。施用放射能の総回収率はKickapoo砂壤土で $100.0 \pm 1.5\%$ 、Dupo微砂質壤土で $102.0 \pm 5.3\%$ であった。

12ヶ月後の試料の放射性 CO_2 は、Kickapoo砂壤土で施用放射能の70.8%（平均）、Dupo微砂質壤土で78.3%（平均）であった。滅菌試料では、6ヶ月後の試料の放射性 CO_2 はKickapoo砂壤土で施用放射能の42.5%、Dupo微砂質壤土で38.2%であった。 CO_2 以外の放射性揮発性物質は全試料で施用放射能の0.1%未満であった。

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 2 放射能分布と物質収支

試料採取 時点	施用放射能 (%)				総回 収率 ⁴ (%)	施用放射能 (%)				総回 収率 ⁴ (%)
	揮発性捕集剤		土壌 抽出 液	抽出 残渣 土壌		揮発性捕集剤		土壌 抽出 液	抽出 残渣 土壌	
	フオ ーム 栓	NaOH				フオ ーム 栓	NaOH			
	Kickapoo砂壤土					Dupo微砂質壤土				
0日	NA ²	NA	68.1	3.2	71.3	NA ²	NA	81.3	2.7	84.0
	NA	NA	70.6	3.7	74.3	NA	NA	97.9	5.4	103.2
1日	ND ³	23.5	54.2	4.9	82.6	ND ³	16.9	75.5	7.0	99.5
	ND	24.6	62.5	7.7	94.8	ND	16.3	67.9	3.0	87.1
3日	ND	33.6	47.8	7.8	89.3	ND	32.2	65.2	7.0	104.4
	ND	38.3	45.7	5.7	89.6	ND	32.8	48.1	3.9	84.8
7日	ND	38.8	40.1	7.1	86.0	—	36.9	45.5	5.0	87.4
	—	44.4	39.0	6.0	89.4	—	38.4	38.6	4.4	81.4
14日	ND	47.2	30.3	9.5	87.0	ND	46.5	39.9	7.8	94.1
	ND	47.3	38.6	6.5	92.4	ND	47.2	39.6	6.8	93.6
1ヶ月	ND	61.0	22.9	7.5	91.5	—	58.7	28.2	5.7	92.6
	ND	54.1	28.2	7.9	90.2	ND	57.4	25.8	5.2	88.4
2ヶ月	ND	59.8	19.2	8.5	87.6	—	65.2	21.4	7.0	93.5
	ND	59.1	17.9	6.1	83.1	—	63.8	18.7	4.7	87.2
3ヶ月	ND	68.7	14.4	7.8	91.0	ND	71.7	11.4	6.2	89.3
	—	67.5	12.8	9.4	89.6	—	72.1	15.7	5.9	93.6
4ヶ月	—	64.0	11.5	8.1	83.6	—	76.4	8.8	4.7	89.8
	—	67.1	11.6	8.6	87.4	—	75.4	11.9	5.4	92.8
6ヶ月	—	66.8	9.5	11.9	88.2	—	79.7	6.9	5.0	91.7
	—	72.5	9.1	5.6	87.3	—	80.4	7.2	5.2	92.9
9ヶ月	—	69.6	6.6	6.1	82.3	—	81.9	5.4	5.3	92.6
	—	74.0	6.6	6.9	87.5	—	83.8	5.4	4.9	94.1
12ヶ月	—	71.0	6.7	7.8	85.4	—	78.0	4.4	3.7	86.1
	—	70.5	6.3	7.0	83.9	—	78.6	4.9	4.7	88.3
	平均 標準偏差				86.5 ± 5.3	平均 標準偏差				91.4 ±5.6
	滅菌Kickapoo砂壤土					滅菌Dupo微砂質壤土				
1ヶ月	—	3.4	88.9	6.6	98.9	—	2.4	86.3	3.3	92.0
	—	2.1	91.5	4.7	98.2	—	3.9	98.4	3.9	106.2
3ヶ月	—	7.1	85.0	7.1	99.2	—	11.7	80.6	8.3	100.6
	—	13.2	79.2	9.5	102.0	—	4.2	90.9	9.5	104.6
6ヶ月	—	33.5	61.3	5.4	100.1	—	44.6	49.8	8.3	102.8
	—	51.4	40.8	9.4	101.6	—	31.8	65.2	8.8	105.8
	平均 標準偏差				100.0 ± 1.5	平均 標準偏差				102.0 ±5.3

1: 各フラスコに施用した10,568,000 dpmを基にした。

2: NA=適用しない

3: ND=検出されず (バックグラウンドの2倍未満)

4: —=検出されたが、総放射能の0.1%未満

4) カラム精製操作およびHPLCカラムからの回収率

カラム精製操作およびHPLCカラムからの回収率を表 3 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 3 カラム精製操作およびHPLCカラムからの回収率

試料採取 時点	Kickapoo砂壤土		Dupo微砂質壤土	
	精製操作による 回収率(%)	HPLCカラムから の回収率(%)	精製操作による 回収率(%)	HPLCカラムから の回収率(%)
0日	108.5	91.4	102.2	94.6
	109.2	90.9	110.8	94.2
1日	110.7	91.9	93.8	94.0
	92.5	92.9	124.1	97.4
3日	111.0	95.1	87.7	103.9
	98.5	89.9	104.5	93.6
7日	118.7	97.0	97.6	96.4
	89.2	89.4	93.1	97.7
14日	110.6	96.0	113.2	98.2
	95.3	99.4	101.8	88.4
1ヶ月	116.4	93.8	100.8	97.0
	94.0	88.6	128.6	96.3
2ヶ月	102.5	86.3	88.8	92.7
	125.2	87.9	112.8	89.5
3ヶ月	109.1	85.2	128.0	90.8
	100.8	84.5	102.2	90.4
4ヶ月	136.7	74.6	90.9	93.8
	91.9	82.6	118.0	98.3
6ヶ月	114.4	85.2	97.6	72.8
	100.2	82.1	101.1	93.9
9ヶ月	114.4	94.4	110.7	74.6
	94.4	69.9	95.1	85.8
12ヶ月	102.6	73.9	143.8	72.3
	86.2	88.8	99.5	73.1
採取時点	滅菌Kickapoo砂壤土		滅菌Dupo微砂質壤土	
1ヶ月	106.7	112.6	108.5	105.6
	96.2	99.0	94.3	99.7
3ヶ月	116.9	110.6	89.2	99.7
	99.5	99.1	114.0	111.8
6ヶ月	124.6	114.0	114.6	113.6
	100.1	96.7	92.6	99.6

5) Kickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土における ^{14}C グリホサートの分解

Kickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土試料の抽出液で認められた ^{14}C グリホサート残留物の定量的特徴づけを表 4、5に示す。表 3に示すカラム精製操作またはHPLCカラムでの回収率が90~110%の範囲を外れた試料は回収率で補正して求めた。

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 Kickapoo砂壌土試料の抽出液中のHPLC分布

試料採取時点	施用放射能(%)						分析した施用放射能 ⁵ (%)
	グリホサート	AMPA	未知物質A ¹	未知物質B ²	未知物質C ³	その他未知物質 ⁴	
0日	50.6	12.9	1.8	2.0	ND ⁶	ND	68.1
	44.5	19.0	2.5	2.6	ND	0.8	70.6
平均	47.6	16.0	2.2	2.3	—	—	
1日	32.8	21.6	2.7	2.5	ND	ND	59.9
	32.0	25.0	2.5	2.3	ND	0.7	62.5
平均	32.4	23.3	2.6	2.4	—	—	
3日	18.9	31.1	2.8	0.7	ND ⁶	ND	53.1
	15.9	20.0	2.1	2.4	ND	0.4	41.1
平均	17.4	25.6	2.5	1.6	—	—	
7日	10.6	28.5	3.5	3.6	0.5	ND	47.6
	7.7	18.0	2.4	2.4	ND	ND	31.1
平均	9.2	23.3	3.0	3.0	—	—	
14日	5.4	23.9	2.2	1.2	ND ⁶	0.4	33.5
	6.4	28.6	1.8	1.3	ND	ND	38.6
平均	5.9	26.3	2.0	1.3	—	—	
1ヶ月	2.8	17.3	2.3	2.4	0.6	1.3 ⁷	26.7
	2.8	17.0	2.7	2.2	ND	ND	25.0
平均	2.8	17.2	2.5	2.3	—	—	
2ヶ月	1.6	9.9	2.9	1.8	0.3	ND ⁶	16.6
	2.1	12.1	3.0	2.0	ND	0.5	19.7
平均	1.9	11.0	3.0	1.9	—	—	
3ヶ月	2.0	7.7	1.7	0.8	0.2	0.2	12.3
	1.1	5.5	2.0	1.3	0.3	0.1	10.8
平均	1.6	6.6	1.9	1.1	0.3	0.2	
4ヶ月	2.1	5.4	2.6	1.0	0.4	0.1	11.7
	1.3	4.1	2.4	1.4	ND ⁶	0.3	9.6
平均	1.7	4.8	2.5	1.3	—	0.2	
6ヶ月	1.9	3.7	2.3	0.9	0.3	ND	9.3
	0.8	3.5	1.9	1.0	0.3	ND	7.5
平均	1.4	3.6	2.1	1.0	0.3	—	
9ヶ月	0.9	2.8	2.0	1.2	0.4	0.2	7.6
	0.5	0.1	1.4	0.7	0.1	0.1	4.6
平均	0.7	1.5	1.7	1.0	0.3	0.2	
12ヶ月	0.5	1.7	1.7	0.9	0.2	ND ⁶	5.0
	0.6	2.1	1.3	0.5	0.2	0.2	4.8
平均	0.5	1.9	1.5	0.7	0.2	—	
採取時点	滅菌Kickapoo砂壌土						
1ヶ月	93.2	3.5	1.0	1.2	ND ⁶	ND	100.1
	85.9	2.8	1.5	1.1	ND	ND	91.5
平均	89.6	3.2	1.3	1.2	—	—	
3ヶ月	100.8	6.3	1.8	1.1	ND	ND	109.9
	66.9	8.2	2.0	1.5	ND	ND	79.2
平均	83.9	7.3	1.9	1.3	—	—	
6ヶ月	67.9	13.9	2.8	2.4	ND ⁶	ND	87.1
	24.6	11.9	2.4	1.8	ND	ND	40.8
平均	46.3	12.9	2.6	2.1	—	—	

注釈：HPLC分析は精製操作後実施した

- 1) 未知物質A：保持時間約4分
- 2) 未知物質B：保持時間約7-10分
- 3) 未知物質C：保持時間約13-16分
- 4) その他未知物質：施用放射能の1%を超えなかった
- 5) 精製操作の回収率とHPLCカラムからの回収率が<90%または110%>の場合はそれらの回収率で補正
- 6) ND：バックグラウンドの2倍より大きくは検出されず
- 7) 保持時間約33分に施用放射能の1.3%の未知物質を含む

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 Dupo微砂質壤土試料の抽出液中のHPLC分布

試料 採取 時点	施用放射能(%)						分析した 施用放射能 ⁵ (%)
	グリホ サート	AMPA	未知物質 A ¹	未知物質 B ²	未知物質 C ³	その他 未知物質 ⁴	
0日	64.3	14.3	1.4	0.9	ND ⁶	ND	81.3
	82.2	18.7	0.9	0.9	ND	4.6 ⁷	108.5
平均	73.3	16.5	1.2	0.9	—	—	
1日	49.7	22.0	2.0	0.9	ND	ND	75.5
	61.5	19.1	2.4	1.0	ND	ND	84.3
平均	55.6	20.6	2.2	1.0	—	—	
3日	27.3	26.3	1.7	0.9	ND ⁶	1.0	57.2
	23.9	21.7	1.3	1.2	ND	ND	48.1
平均	25.6	24.0	1.5	1.1	—	—	
7日	13.9	28.0	1.7	1.3	ND	ND	45.5
	11.7	23.4	1.6	1.3	ND	ND	38.6
平均	12.8	25.7	1.7	1.3	—	—	
14日	7.0	34.6	1.4	0.6	ND ⁶	ND	45.2
	5.6	22.7	2.8	3.1	ND	ND	35.0
平均	6.3	28.7	2.1	1.9	—	—	
1ヶ月	2.7	22.3	1.8	0.8	ND	ND	28.2
	3.3	26.3	2.2	1.3	ND	ND	33.2
平均	3.0	24.3	2.0	1.1	—	—	
2ヶ月	1.5	14.7	1.6	0.9	ND ⁶	ND	19.0
	1.5	14.9	1.4	0.7	ND	ND	18.9
平均	1.5	14.8	1.5	0.8	—	—	
3ヶ月	1.7	10.0	1.7	1.0	ND	ND	14.6
	1.4	11.4	1.7	0.9	ND	ND	15.7
平均	1.6	10.7	1.7	1.0	—	—	
4ヶ月	1.1	5.1	1.6	1.0	0.1	ND ⁶	8.8
	1.3	8.8	1.8	0.9	0.2	0.6	14.0
平均	1.2	7.0	1.7	1.0	0.2	—	
6ヶ月	0.7	2.8	0.8	0.4	0.2	0.1	5.0
	0.7	4.3	1.3	0.7	0.1	0.1	7.2
平均	0.7	3.6	1.1	0.6	0.2	0.1	
9ヶ月	0.8	2.1	1.0	0.4	0.1	ND ⁶	4.5
	0.6	2.2	1.1	0.6	0.1	ND	4.6
平均	0.7	2.2	1.1	0.5	0.1	—	
12ヶ月	0.4	1.6	1.7	0.8	0.2	0.4	4.6
	0.7	1.5	0.9	0.3	0.2	ND	3.6
平均	0.6	1.6	1.3	0.6	0.2	—	
採取時点	滅菌Dupo微砂質壤土						
1ヶ月	78.1	5.2	1.1	0.7	ND ⁶	ND	86.3
	89.6	7.0	0.5	1.2	ND	ND	98.4
平均	83.9	6.1	0.8	1.0	—	—	
3ヶ月	63.4	7.0	0.6	0.7	ND	ND	71.9
	101.1	9.0	1.3	1.3	ND	ND	115.9
平均	82.3	8.0	1.0	1.0	—	—	
6ヶ月	40.2	20.7	1.6	1.3	ND ⁶	ND	64.8
	49.0	13.8	1.4	0.8	ND	ND	65.2
平均	44.6	17.3	1.5	1.1	—	—	

注釈：HPLC分析は精製操作後実施した

- 1) 未知物質A：保持時間約4-5分
- 2) 未知物質B：保持時間約7-10分
- 3) 未知物質C：保持時間約13-16分
- 4) その他未知物質：施用放射能の1%を超えなかった
- 5) 精製操作の回収率とHPLCカラムからの回収率が<90%または110%>の場合はそれらの回収率で補正
- 6) ND：バックグラウンドの2倍より大きくは検出されず
- 7) 保持時間約36分に施用放射能の2.0%の未知物質と保持時間約39分に施用放射能の1.5%の未知物質を含む

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、5より、グリホサートの分解は迅速であった。12ヶ月後の試料中に $[^{14}\text{C}]$ グリホサートとして、Kickapoo砂壌土で施用放射能の0.5% (報告書表XI, XIIIから申請者訂正) (平均)、Dupo微砂質壌土で0.6% (報告書表XII, XIVから申請者訂正) (平均) 残存していた。Kickapoo砂壌土およびDupo微砂質壌土の土壤間で質的に顕著な差は認められなかった。

土壤抽出液中の主要分解物である $[^{14}\text{C}]$ アミノメチルホスホン酸 (AMPA) は、12ヶ月後の試料でKickapoo砂壌土は施用放射能の1.9%、Dupo微砂質壌土は1.6%であった。数種類の未知物質が土壤抽出液中に検出された。滅菌試料の土壤抽出液中には未知物質は検出されなかった。未知物質はいずれの試料においても施用放射能の3.6%を超えなかった。

0日後試料においてKickapoo砂壌土で施用放射能の47.6% (平均)、Dupo微砂質壌土で73.3% (平均) がグリホサートとして検出され、低かった。これは最初の試料処理・抽出操作と保存期間中のグリホサートの微生物分解の結果と考えられる。

滅菌土壤フラスコでは、グリホサートの分解は顕著に遅かった。6ヶ月後の試料について、Kickapoo砂壌土で $[^{14}\text{C}]$ グリホサートは施用放射能の46.3%、 $[^{14}\text{C}]$ AMPAは12.9%、Dupo微砂質壌土で $[^{14}\text{C}]$ グリホサートは施用放射能の44.6%、 $[^{14}\text{C}]$ AMPAは17.3%であった。

$[^{14}\text{C}]$ グリホサートの想定代謝経路を図 2 に、グリホサートの CO_2 およびAMPAへの分解を図 3 と 4 にグラフで表す。

図 2 グリホサートの想定代謝経路

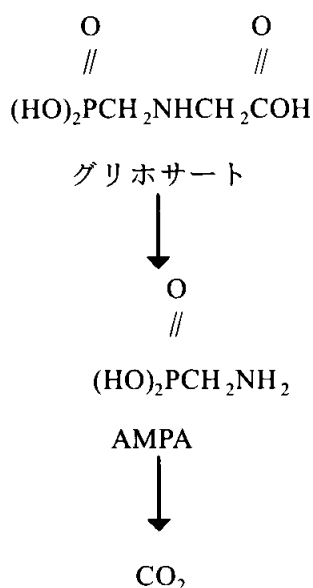


図 3 好氣的条件下のKickapoo砂壤土における $[^{14}\text{C}]$ グリホサートの分解 (申請者作成)

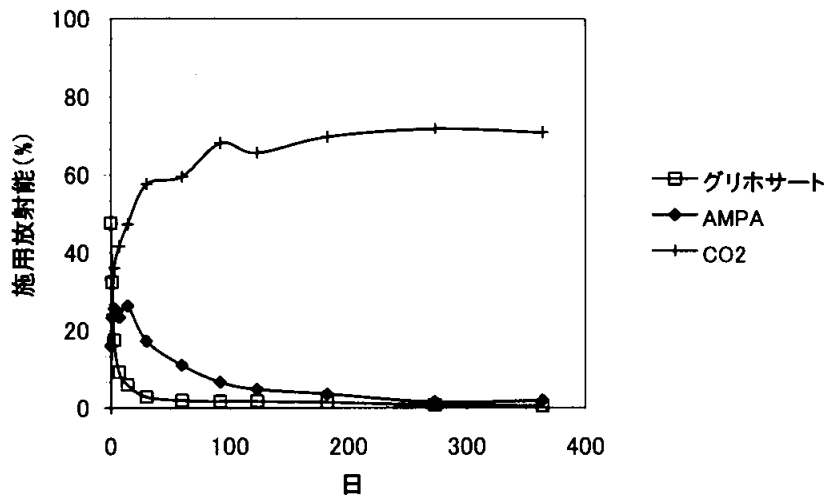
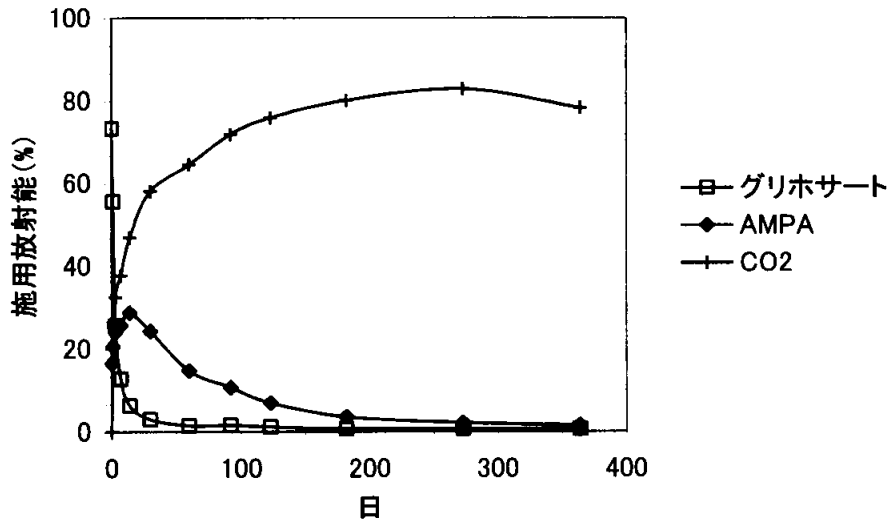


図 4 好氣的条件下のDupo微砂質壤土における $[^{14}\text{C}]$ グリホサートの分解 (申請者作成)



6) 半減期

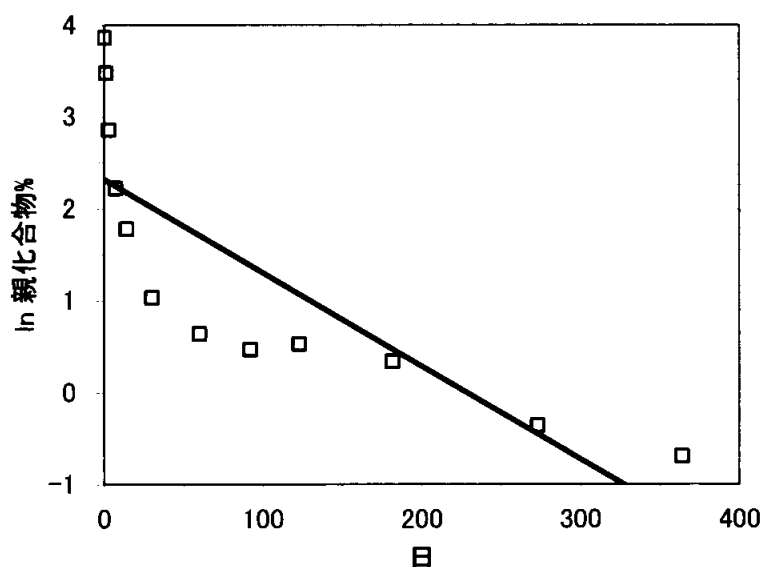
本試験条件下でのグリホサートの半減期は線形一次反応式を用いてKickapoo砂壤土で69日、Dupo微砂質壤土で61日であった。半減期の計算を表6に示す。図 5 と 6 に経過日数対グリホサートの施用放射能に対する割合の自然対数をグラフで示す。

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 6 Kickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土における¹⁴C グリホサートの代謝的半減期の計算

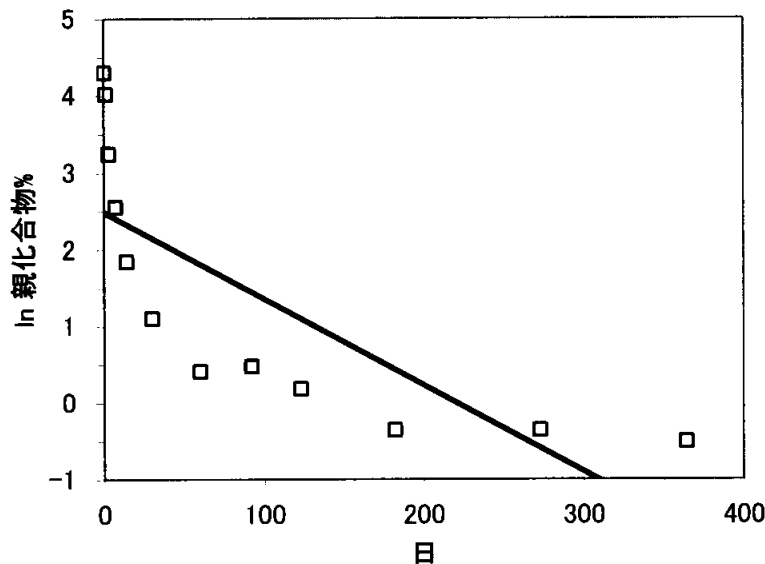
試料採取 時点(日)	Kickapoo砂壤土		Dupo微砂質壤土	
	グリホサート 平均値(%)	ln グリホサート (%)	グリホサート 平均値(%)	ln グリホサート (%)
0	47.6	3.863	73.3	4.295
1	32.4	3.478	55.6	4.018
3	17.4	2.856	25.6	3.243
7	9.2	2.219	12.8	2.549
14	5.9	1.775	6.3	1.841
30	2.8	1.030	3.0	1.097
60	1.9	0.642	1.5	0.405
92	1.6	0.470	1.6	0.470
123	1.7	0.531	1.2	0.182
182	1.4	0.336	0.7	-0.357
273	0.7	-0.357	0.7	-0.357
364	0.5	-0.693	0.6	-0.511
相関係数(R) 切片 傾き(-k) t1/2(半減 期)	-0.819 2.315 -0.0101 69日		-0.775 2.484 -0.0113 61日	

図 5 Kickapoo砂壤土への時間に対して施用放射能に対する割合の自然対数
(申請者作成)



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

図 6 Dupo微砂質壤土への時間に対して施用放射能に対する割合の自然対数
(申請者作成)



本試験におけるグリホサートの消失は、図 5 および 6 に示すように直線から外れており、線形一次反応動態モデルに適合しなかった。従って非線形一次反応動態モデル ($C=C_0(1+\beta t)^{-\alpha}$) を使用した。得られたパラメーター値とその95%信頼区間を表 7 にまとめる。

表 7 Kickapoo砂壤土およびDupo微砂質壤土の非線形一次反応動態モデルに関するパラメーター

土壌	パラメーター	値	95%信頼区間
Kickapoo砂壤土	C_0	47.96	1.82
	β	0.548	0.21
	α	0.989	0.21
Dupo微砂質壤土	C_0	74.67	4.50
	β	0.206	0.19
	α	1.956	1.35

グリホサートのDT₅₀値はKickapoo砂壤土で1.85日、Dupo微砂質壤土で2.06日であった。また得られた適合曲線を図 7 と 8 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。

図 7 Kickapoo砂壤土の好氣的代謝試験におけるグリホサートの消失

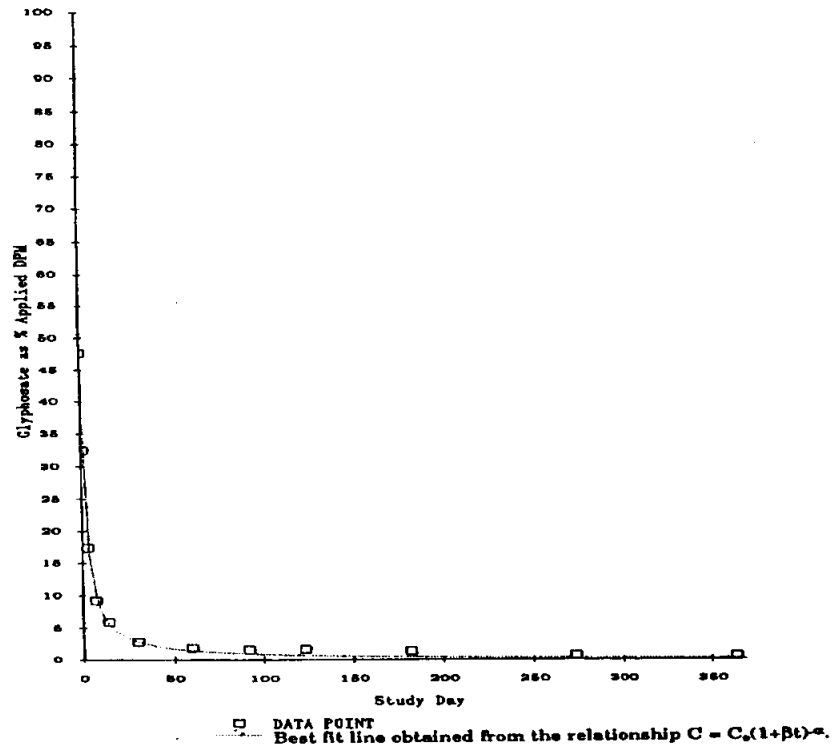
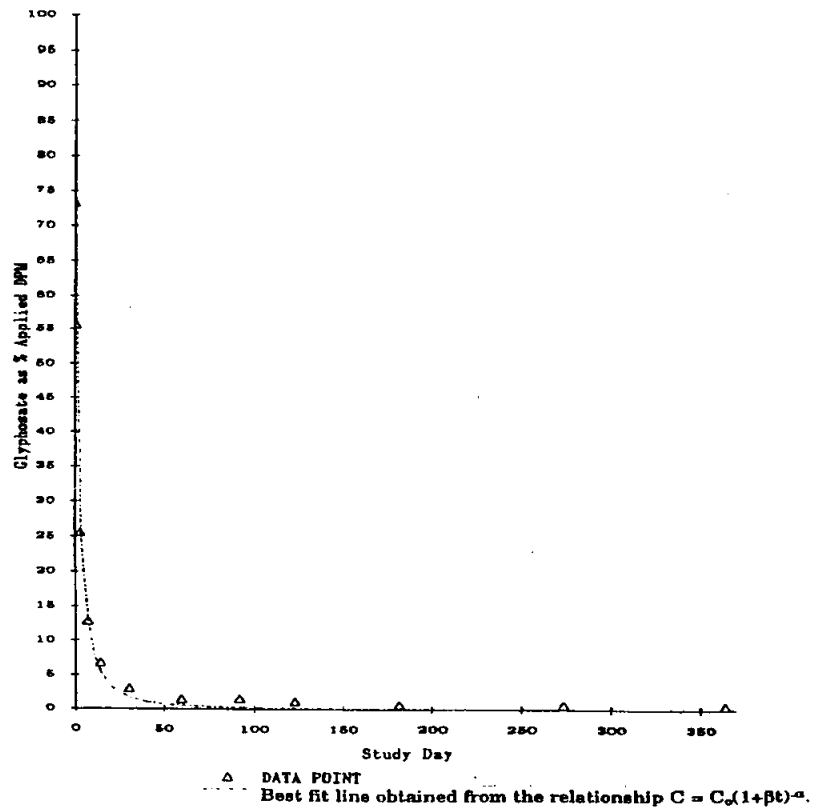


図 8 Dupo微砂質壤土の好氣的代謝試験におけるグリホサートの消失



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。

結論：

グリホサートは好氣的条件下の土壤中で迅速に分解した。非線形一次反応動態モデルを用いた推定DT₅₀値はKickapoo砂壤土で1.85日、Dupo微砂質壤土で2.06日であった。両土壤における主要な分解生成物はCO₂とアミノメチルホスホン酸（AMPA）であった。他にいくつかの未同定のマイナーな分解物が認められたが、いずれもグリホサートの初期濃度の3.6%を越えず、重要ではないと考えられる。想定代謝経路は、最初にグリホサートからAMPAへの転換、次いでAMPAからCO₂への代謝であった。

4. 土壌表面光分解試験（太陽光照射）

（資料 No. 11-8）

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

供試標識化合物： 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート
化学名 (IUPAC)	N-(phosphonomethyl)-glycine
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{*}{\text{N}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$
比放射能	8.08 mCi/mmol
放射化学的純度	98.9%

供試土壌：PTRLによって準備された砂壤土を使用した。土壌特性を以下の表にまとめた。

粒径組成 (%)			有機物含有量 (%)	pH (H ₂ O)	陽イオン交換容量 (mEq/100g)
砂	シルト	粘土			
74	16	10	1.6	7.6	6

方法：EPAカトドライン、Subdivision N, 161-3に準拠

土壌プレート作製：2 mm目の篩にかけた3.1 gの土壌を50 mmシャーレに量り取り、蒸留水を3 ml加えスラリー状にした。表面を均一にし、風乾して土壌プレートを作製した。

試験溶液の調製：標識体とその約4.5倍量の非標識体を一緒に蒸留水に溶解し、約4300ppmの保存溶液とした。

光源：カリフォルニア州リッチモンド、緯度37.45N、経度122.26Wの太陽光とした。光強度と積算太陽光エネルギーを測定し、10分間隔で記録した。光強度の平均値は92.0 W/m²であった。（測定波長250-700nm）

処理の方法：土壌プレート（面積約20 cm²）一枚あたり保存溶液を200 μl処理した。

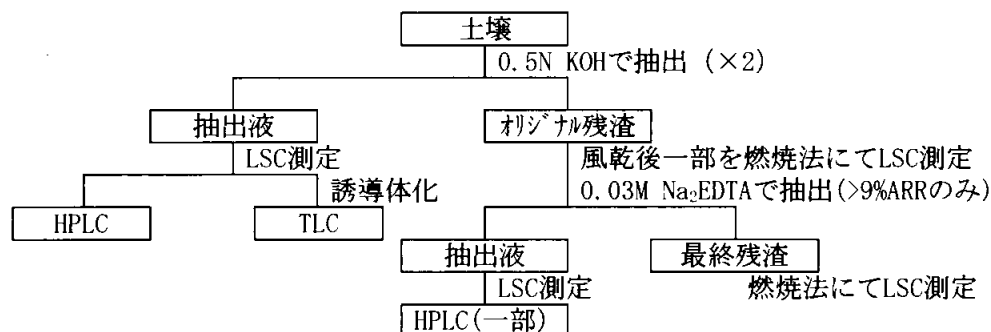
処理量の設定根拠：米国における処理量4.0 lb/acre (4.48 kg ae/ha) をカバーするために同量を設定した。

採取時期：土壌サンプルは、処理直後、3、7、11、20及び31日後に採取した（2連）。各トラップ溶液も同時に採取し、新しいものに交換した。

試験系：循環ジャケット付ステンレス鋼製試験槽内に上記土壌プレート入りシャーレを設置し、一定温度の冷却液を循環させることで土壌表面温度を一定にした（平均温度：22～23℃）。試験槽の上部には石英プレート（照射区）あるいは暗色物で覆ったガラスプレート（暗所区）を設置した。また、試験槽の入口より加湿空気を引き込み（含水量の75%を維持）、出口にはエチレングリコール（1本）と10%水酸化ナトリウム水溶液（2本）のトラップを設置した。

分析法：各トラップ溶液は、採取後容量を測定し、3連で放射能を測定した。水酸化ナトリウム (NaOH) トラップ中の放射能は塩化バリウムとの沈殿法により¹⁴CO₂の確認を行なった。土壌サンプルは以下の分析フローに従って抽出し、HPLC及びTLC分析に供した。

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。



分析機器；液体シンチレーションカウンター(LSC)：液体試料はシンチレーターと混合して放射能を測定した。

燃焼装置：抽出残渣中の放射能は燃焼装置にて燃焼後、トラップした¹⁴CO₂をLSCで測定した。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：イオン交換カラム (SAX) を用い、メタノールとリン酸緩衝液の混液 (pH 2.2) を移動相とし、ダイオードアレイ検出器 (195 nm) にてモニターした。UV検出器とラジオ検出器で参照物質とのクロマトグラフィーを行い定性・定量した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)：シリカゲルを被覆したプレート (Merck 5715, Silica Gel 60 F₂₅₄) に誘導体化した試料と標準品を塗布し、展開溶媒としてブタノール/酢酸/水/ピリジン (150/30/60/100, 容積比) を使用した。オートラジオグラフィに供して代謝物を同定した。

分解速度計算法；擬似一次速度式を仮定し、StatView version 1.0コンピュータプログラムを用いてグリホサートの分解速度を算出した。

結果：各試料中の分析結果を表1に示した。

表1 [¹⁴C]標識体処理における各サンプルの分析結果 (原報告書Table I 及びIII)

試験区	代謝物	採取時期 (処理後の日数)					
		0	3	7	11	20	31
照射区	NaOHトラップ (CO ₂)	-	1.3	1.7	1.9	2.3	4.0
	エチレングリコールトラップ	-	0.1	0.2	0.2	0.3	0.5
	抽出液	104.8	95.6	96.7	96.1	86.6	91.1
	グリホサート	103.2	87.0	87.3	85.9	76.0	78.1
	AMPA	1.6	8.4	9.4	10.2	10.7	13.0
	未知分解物	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3	0.6
	オリジナル残渣	2.8	9.7	10.2	6.3	12.0	13.2
	EDTA抽出液	-	4.9	4.8	-	7.9	7.8
	最終残渣	2.8	4.8	5.4	6.3	4.1	5.4
	合計	107.6	106.5	108.6	104.6	101.3	108.7
暗所区	NaOHトラップ (CO ₂)	-	4.1	4.8	5.1	5.8	6.6
	エチレングリコールトラップ	-	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
	抽出液	97.9	96.5	90.4	93.4	84.0	86.3
	グリホサート	96.3	90.0	83.1	84.5	75.5	76.5
	AMPA	1.5	6.5	7.3	8.8	8.6	9.8
	未知分解物	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	オリジナル残渣	3.0	9.4	8.0	6.3	11.1	11.9
	EDTA抽出液	-	2.4	1.9	-	5.8	5.8
	最終残渣	3.0	7.0	6.2	6.3	5.3	6.1
合計	100.8	110.1	103.2	104.8	101.0	104.8	

数値は2連の平均値 (申請者による計算値) であり、処理放射能に対する比率 (%) を示す。

- : 測定せず、0.0 : <0.05、合計 = NaOHトラップ + 抽出液 + オリジナル残渣

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。

NaOHトラップ中から処理31日後までに4~7%の二酸化炭素が確認された。エレンゲリコールトラップから放射能が検出されたが、1%未満であった。抽出液の分析の結果、両試験区ともにグリサートは経時的に減少し、主要代謝物としてAMPAが最大で10~13%検出された。その他の代謝物は1%未満であった。オリジナル残渣は時間の経過にともない増加傾向が見られたが、20%を超えることはなかった。9%を超えるオリジナル残渣をEDTA抽出し、照射区の代表抽出液を分析に供したところ、グリサート及びAMPAが検出された。このことから土壤残渣中の放射能はグリサート及びAMPAであることが示唆された。物質収支は100~110%の範囲であり良好であった。

照射区及び暗所区のグリサートの消失速度を比較するため、各2連の値を用いた減衰曲線及び半減期をそれぞれ図1及び2に示した。

図1 グリサートの照射区における減衰曲線 (原報告書Figure 9)

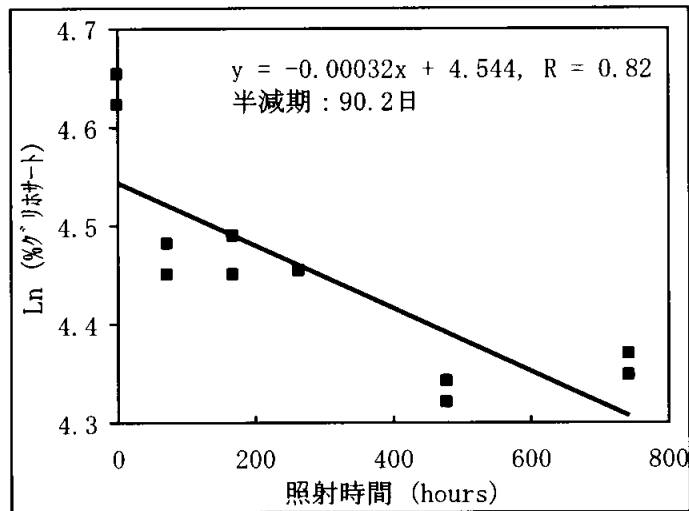
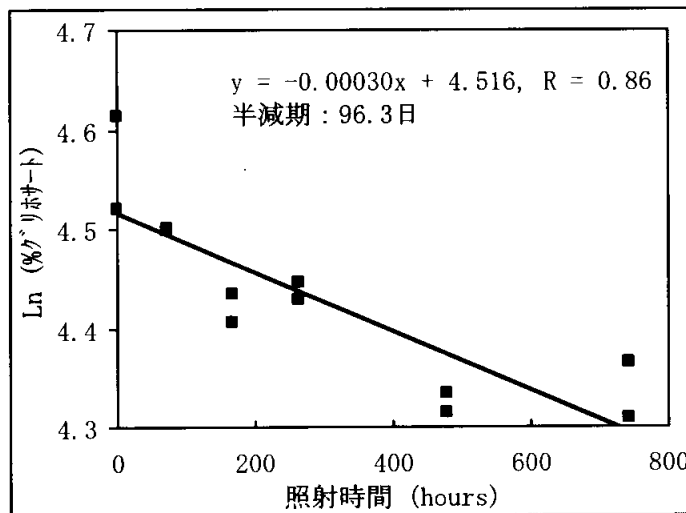


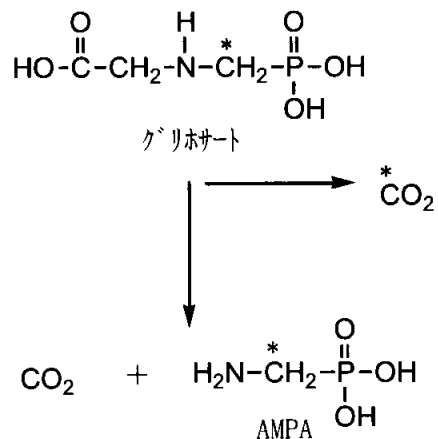
図2 グリサートの暗所区における減衰曲線 (原報告書Figure 9)



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

グリホサートの半減期は、照射区で90.2日、暗所区で96.3日であり（東京春季太陽光換算：照射区 83.9日、暗所区 89.6日）、光照射による消失速度への影響は小さいことが示唆された。また、代謝物の生成パターンを比較しても光照射による分解の寄与は小さく、土壤微生物による分解が主要であることが示唆された。

以下に土壤表面における推定分解経路を示す。



* : [14C]標識

4. 水中動態に関する試験

1. 加水分解動態試験

(資料 No. 11-9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

供試標識化合物： 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート
化学名 (IUPAC)	N-(phosphonomethyl)-glycine
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \quad \quad \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
比放射能	304 μCi/mg (11.2 MBq/mg)
放射化学的純度	97.4%

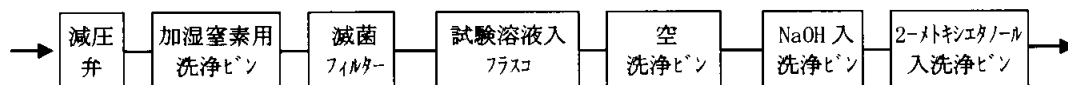
供試水溶液： pH 5；0.71g のフル酸水素カリウムに 350mL の水を加え、0.01M の水酸化ナトリウム 170mL で pH 5 に調整した。

pH 7；市販の pH 7 リン酸緩衝液 75mL に水 425mL を加え、リン酸水素一カリウムで pH 7 に調整した。

pH 9；市販の pH 9 酢酸緩衝液 100mL に水 400mL を加えた。

各緩衝液は 120°C で 30 分間滅菌処理した。

試験方法： 658 mg/L のアピオン溶液を水で 5 倍に希釈し、128 mg/L のストック溶液を調製した。ストック溶液 0.25mL を 3 つ首丸底フラスコ中の各滅菌緩衝液 100mL に添加し、0.32 mg/L の試験溶液とした (被験物質の水溶解度は 25 °C で 12 g/L)。各試験溶液の入ったフラスコをガス洗浄ビンに接続し (間に滅菌フィルター)、窒素流を毎秒 1~2 泡になるように調節した。また、揮発性成分をトラップする目的で、2N 水酸化ナトリウム、及び 2-メキセタノール各 50mL を入れたガス洗浄ビンとも接続した。試験溶液は 25°C、暗所でインキュベートした。これらの構成図を以下に示した。



各フラスコから約 4mL の試験水を 0、5、9、15、20、26 及び 30 日後に採取し、分析に供した。トラップ用溶液も同時期に採取し、新しい溶液と交換した。

分析用の試験水は 0.1mL をシンチレーションカクテルと混合し、液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定後、TLC のコクロマトグラフィーによって、放射能の特徴付けを行った。以下に TLC 測定条件を示した。

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。

TLCプレート：0.5mm厚セルロースプレート、20cm x 20cm

展開溶媒：メタノール/水=5/1 (v/v) 及び

メタノール/水/トリクロロ酢酸/酢酸/15Nアンモニア水=55/35/3.5/2/2.5

検出法：放射性化合物；データ処理システム装備のスクリーンにて解析

非標識標準化合物；ニヒトリン試薬をスプレーし、10～20分間100～120℃で乾燥（目視可能）

結果：各 pH の ¹⁴C 分布を表 1 に示した。

表 1 各試験溶液における ¹⁴C 分布（原報告書 Table 1）

pH	処理後の日数						
	0	5	9	16	20	26	30
5	100.0 (0.32)	99.9 (0.32)	97.7 (0.31)	101.9 (0.33)	99.1 (0.32)	98.3 (0.31)	101.3 (0.32)
7	100.0 (0.32)	101.3 (0.32)	100.3 (0.32)	103.1 (0.33)	99.4 (0.32)	98.6 (0.32)	99.2 (0.32)
9	100.0 (0.32)	99.0 (0.32)	100.0 (0.32)	100.4 (0.32)	96.1 (0.31)	99.3 (0.32)	100.6 (0.32)

数値は処理放射能に対する割合(%)を示した。

申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 0.32 mg/L を基に申請者が濃度(mg/L)を算出した。

試験溶液から放出された揮発性成分の放射能は各 pH とも 0.1%未満であった。各 pH の 30 日後の試験水中放射能は pH 5 で 101.3%、pH 7 で 99.2%、pH 9 で 100.6%であり、親化合物の他に分解物は検出されなかった。

以上のことから、グリホサートは pH 5、7 及び 9 の緩衝液中で安定であることが確認された。

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。

2. 水中光分解動態試験

(1) 太陽光照射による滅菌緩衝液中の光分解

(資料 No. 11-10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

供試標識化合物： 下記の標識化合物を使用した。

標識化合物名	[¹⁴ C] グリホサート
化学名 (IUPAC)	N-(phosphonomethyl)-glycine
化学構造式および 標識部位 (*で表示)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \quad \quad \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
比放射能	8.08 mCi/mmol (1.77 MBq/mg)
放射化学的純度	100.0%

供試水溶液：pH 7；0.1M リン酸二水素カリウム 22.4mL を 0.1M リン酸水素二ナトリウム 25.8mL に加え、水で 1L に定容した。

申請者注) pH 5 及び 9 についても試験を行っているが、バイルックス試験管を用いた光照射試験であり、石英試験管と比べ、被験物質に十分な光が照射されなかったと判断し、本抄録から削除した。

光 源：太陽光 (北緯 37.45N、西経 122.26W、カリフォルニア州リッチモンド市)

光 強 度：71.7 W/m² (測定波長範囲 250~800nm)

申請者注) 約 1 ヶ月間の積算光強度のデータから 1 日あたりの光強度を算出した。

試験方法：試験濃度は、0.9 mg/L (被験物質の水溶解度は 25 °C で 15.7 g/L) とした。照射区用として石英試験管に試験溶液を 10mL、暗所区用にはバイルックス試験管に試験溶液を 5mL 注入した。暗所区はアルミホイルで覆い遮光した。温度は水浴によって約 25°C を保った。揮発性有機物のトラップとしてエチレングリコール、炭酸ガストラップとして 10%水酸化ナトリウム水溶液を使用した。照射区及び暗所区ともに処理直後、5、11、17、26、31 日後に 2 連で試料を採取し、体積及び pH を測定後、一部を液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定、残りは HPLC 分析に供した。以下に HPLC 条件を示した。

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。

カラム：Whatman Analytical Partisil SAX, 25cm x 10 μ m (室温)

UV 検出：ダイオードアレイ検出器, 195nm

¹⁴C 検出：ラジオ検出器

移動相：pH 2.2 緩衝液（水 720mL にメタノール 30mL 及びリン酸二水素カリウム 0.51g を加え、硫酸で pH 2.2 に調整したもの）

流量：0.5mL/分

また、同定のために代表的なサンプルを用いて Dionex Omni Pac Pax 500 カラム（陰イオン交換及び逆相系ポリマーを組み合わせたもの）による HPLC 分析を行った。

結果：滅菌緩衝液中の ¹⁴C 分布を表 1 に示した。

表 1 滅菌緩衝液中の ¹⁴C 分布（原報告書 Table IIa）

		処理後の経過日数					
		0	5	11	17	26	31
照射区	グリサート	100.7 (0.91)	92.3 (0.83)	100.1 (0.90)	99.8 (0.90)	94.6 (0.85)	92.5 (0.83)
	二酸化炭素	—	0.2 (0.00)	0.2 (0.00)	0.3 (0.00)	0.3 (0.00)	0.4 (0.00)
	未知化合物	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)	0.1 (0.00)	0.3 (0.00)	0.5 (0.00)
	合計	100.7 (0.91)	92.5 (0.83)	100.4 (0.90)	100.2 (0.90)	95.3 (0.86)	93.4 (0.84)
暗所区	グリサート	99.3 (0.89)	90.8 (0.81)	97.3 (0.88)	101.2 (0.91)	91.0 (0.82)	93.6 (0.84)
	二酸化炭素	—	0.2 (0.00)	0.2 (0.00)	0.3 (0.00)	0.3 (0.00)	0.4 (0.00)
	未知化合物	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)	0.1 (0.00)	0.1 (0.00)
	合計	99.3 (0.89)	91.0 (0.81)	97.5 (0.88)	101.5 (0.91)	91.4 (0.82)	94.0 (0.85)

数値は処理放射能に対する割合(%)を2連の平均値として示した。

—：未実施

申請者注) () 内の数値は処理設定濃度である 0.9 mg/L を基に申請者が濃度(mg/L)を算出した。

pH 7 滅菌緩衝液中のグリサートは約 1 ヶ月間の太陽光照射下で暗所区と同程度の残存率を示した。照射区及び暗所区の半減期はそれぞれ 413 日 ($R^2=0.15$) 及び 555 日 ($R^2=0.09$) であったが、相関係数が小さく、ほとんど安定であることが確認された。一方で、二酸化炭素及び未知化合物の生成率は 0.5% 以下であったが、最終試料から微生物汚染が確認されたことから、微生物分解が原因であることが示唆された。

グリサートは 2 つの異なる HPLC カラムを用いた分析によって同定された。

申請者注) 本試験は試験機関の SOP および試験計画書の EPA の試験ガイドラインに従って実施された。観察された微生物分解はごく微量であって明暗条件間に差は認められなかったため本試験の結果の有効性に影響を及ぼすものではなかった。