

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業
食品に残留する農薬管理における方法論の国際整合に関する研究
研究分担報告書

農薬の残留基準値設定に資する方法論の国際整合と実際の評価に関する研究

研究代表/分担者 渡邊敬浩

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

食品における農薬残留物のリスク管理措置として、適正農業規範(GAP)に規定された農薬使用基準の遵守の推進及び、使用基準遵守の指標である最大残留基準値(Maximum Residue Limit;MRL)の設定がある。我が国におけるこれまでの MRL 設定には、国際的な方法論や原則から乖離する事例があった。しかし、食品の安全性の確保だけではなく、輸出入に関する係争を回避するためにも、国際的に合意されている原則や方法論への整合が一層強く求められている。

JMPR 報告書の翻訳と解説：本研究では、これまでに FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議(JMPR)の FAO パネルが開発し活用している文書をもとに、MRL 設定方法の基本と考え方をまとめた文書(MRL 設定ガイド)を開発してきた。本ガイドは、JMPR による最新の評価等を踏まえ、更新を検討する必要がある。本年度研究においては、MRL 設定ガイドの更新検討も念頭に、本ガイドに沿った実践を行う評価者の能力向上に資する文書の開発を目的とし、選定した剤(2,4-D)に関する JMPR 評価書の翻訳と解説を行った。

データ要件ガイドラインに含めるべき事項の抽出：本研究班の分担課題「農薬残留基準値の国際標準に整合した設定方法の国内導入に関する研究」(山田友紀子博士担当)により、農薬製造事業者等を対象に MRL 設定に必要なデータへの要件を明確に示した指針(MRL 設定のためのデータ要件ガイドライン：データ要件ガイドライン)の厚生労働省による策定が支援されている。関連する OECD ガイドラインにより示された必ず従うべき主要な原理・原則を、データ要件ガイドラインには含めなければならない。その上で、わが国の状況に適した MRL 設定に必要なデータの種類や取得に関する指針を示さなければならない。本研究では、農薬製造事業者等がデータ要件ガイドラインに従いデータを取得する際の参考とされることを期待し、関連する OECD ガイドラインの翻訳を進める。また、データ要件ガイドラインに含めなければならない、必ず従うべき主要な原理・原則を特定して示す。

A. 研究目的

A-1. JMPR 報告書の翻訳と解説

農薬は、現在の食料生産に欠くことのできない資材であり、病虫害並びに雑草の防除、生長調整等を目的に、主として作物に投与される。この投与の結果として、農薬(有効成分)やその代謝・分解物が、取引される農産品に残留する可能性がある。農薬は、目的を達成するために必要な最小の量と頻度を考慮して投与されることが原則である。収穫される農産品等における農薬の有効成分やその代謝・分解物の残留は、前述の農薬投与の原則を踏まえ、生産に必要な取組を規定した適正農業規範(GAP)に沿った農薬使用の結果である。もちろん、健康影響が懸念されるような残留につながるようなことがあってはならず、そのためには、GAPにおいて農薬の使用基準が適正に設定され、それを遵守した使用によって、農業が確実に実行されなければならない。

農薬の最大残留基準値(以下、Maximum Residue Limit;MRL)は、GAPに沿って農薬が使用されたことを確認するための指標である。健康に影響のない残留にしかつながらない農薬の使用は、GAPの前提である。そのため、MRLを指標として、GAPに沿って生産された農産品であることを確認することが、農産品を原材料とする食品の消費に伴う健康リスクの適正管理につな

がる。

食品流通のグローバル化が進む現在、MRLの設定は一国だけの課題ではない。食品の輸出入国の双方に不利益が生じず、両者が納得する公正な貿易が行われるためにも、国際的な調和の下で各国が取り組むべき課題である。そのため、食品の安全性の確保に加えて、輸出入時の係争回避に大きく効果する公正さや透明性の確保の点からも、国際的に合意されている原則や方法論への整合が一層強く求められている。

本研究では、これまでにFAO/WHO合同残留農薬専門家会議(JMPR)のFAOパネルが開発し、先進諸国も含め活用されている文書の詳細を解析し、MRL設定方法の基本と考え方をまとめた文書(MRL設定ガイド)を開発してきた。本ガイドは、一度開発した後はそのまま無期限に使い続けることができる、そのような性質の文書ではない。JMPRによる最新の評価等すなわち、MRL設定に関する最新の科学的動向を踏まえて適宜見直し、更新を検討する必要がある。本研究では、MRL設定ガイドの更新検討も念頭に、本ガイドに沿った評価を実践する行政担当者の能力向上に資する文書の開発を目的とした。

適正に行われた評価の過程を具体的にかつ正確にトレースすることは、評価に必要な解析や結果の解釈への理解を深め、応用を考えることもできるよ

うになるため、MRL 設定ガイドに沿った評価の実践において有効である。そこで、全世界から選ばれた経験豊かな有識者により作成される JMPR 評価書から、示唆に富んだ農薬の評価書を選定し、その翻訳と解析並びに解説を通じて、評価者の能力向上に資する文書の開発を検討した。本年度の研究では、2017 年の JMPR において一部のデータ解析に関連してコンサーンフォーム(評価結果に対する要望書)が提出され、それへの JMPR の回答が一般課題として取り上げられたこと及び、国内における現在あるいは今後の MRL 設定の参考とすべきとも考えられたことから 2,4-D の評価を取り上げ、定期的なレビュープログラムのもとで実施された 1998 年の評価、適用拡大等のために行われた 2001 年と 2017 年の評価を対象に検討した。

A-2. データ要件ガイドラインに含めるべき事項の抽出

国際統合した MRL を設定するためには、本研究班の支援のもとで厚生労働省が策定し令和元年 7 月に開催された薬事・食品衛生審議会(食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会)において公開した「食品中の農薬の残留基準値設定の基本原則について(案)」(以下、新基本原則とする。新基本原則検討の詳細は、山田博士による分担研究課題報告

書を参照のこと)や、本研究班において開発した MRL 設定ガイドに示した基本的な考え方や原理・原則の十分な理解が不可欠である。しかしそれだけでは、実際に MRL を設定することは困難である。実際の MRL 設定に必要なデータの要件を明確に示し、それに従って取得・提出されたデータを、最大限に活用した科学的な評価が不可欠である。

MRL 設定に必要なデータは、対象の農薬と食品との組み合わせに応じて異なる可能性がある。この可能性を踏まえて OECD は、動植物による代謝、試料の凍結保存、作物残留試験、そして分析法といった農薬残留物の濃度に影響する各種要因を取り上げ、重要な要件等を規定したガイドライン・ガイダンス文書(OECD ガイドライン等)を策定している。厚生労働省が示した新基本原則も、すでにこれらの OECD ガイドライン等に記載されている原理・原則に基づいている。また、本研究班の分担課題「農薬残留基準値の国際標準に整合した設定方法の国内導入に関する研究」は、農薬製造事業者等に対しデータの要件を明確に示す指針「MRL 設定のためのデータ要件ガイドライン」(データ要件ガイドライン)の厚生労働省による策定を支援している。

本研究では、データ要件ガイドラインに従い農薬製造事業者等によりデータが取得される際の参考となることを

期待し、関連 OECD ガイドライン等の翻訳を進める。また、前述のデータ要件ガイドラインに含めなければならない、必ず従うべき主要な原理・原則を特定して示す。本年度は、OECD ガイドライン等のうち、OECD Guidelines for the testing of Chemicals, Section 5, Test No 506 「Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities」を研究対象とした。

B. 研究方法

B-1. JMPR 報告書の翻訳と解説

本研究では、JMPRにおけるFAOパネルの専門家と同様に、作物残留試験データを含む各種データを解析・評価し、MRL案を導出する役割を担う我が国の政府担当者(評価者)が、その際に必要となる知見や知識の収集及び、考察や判断に係る能力の養成において使用することができる文書の開発を目的とした。そのために、2018年にJMPRにより発行された報告書(Report)並びに評価書(Evaluation)や2019年に開催された第51回CCPR(Codex残留農薬部会)における議論等を精査した結果及び、国内における現在あるいは今後のMRL設定に役立てられることへの期待を踏まえて2,4-Dの評価を検討対象とすることを決定した。

JMPRによる2,4-Dの評価は、1970年に初めて行われ、その後、1986年、1987年、1996年、1997年、1998年、2001年、2017

年に行われた。このうち1998年の評価は、定期的再評価プログラムにより行われ、過去のデータも評価に含まれている。そのため、本研究では1998年、2001年及び、2017年に報告された3つの評価書を検討対象とした。これら3つの評価書を正確に翻訳するとともに、適宜JMPRのFAOパネルが作成し、MRL案の導出に使用しているマニュアル[FAO Plant production and protection paper 225; Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed(以下、FAOマニュアル)]に記述されている原理・原則に関する留意点等を踏まえて、一部解説を加えた。

B-2. データ要件ガイドラインに含めるべき事項の抽出

本研究において翻訳と検討の対象とするOECDガイドライン等をまず選定した。選定したガイドライン等を特に科学的観点から誤りのないように忠実に翻訳した。そのうえで、翻訳したガイドラインにより取り扱われているMRL設定に不可欠なデータ取得の要件に関する原理・原則や主要な点を特定した。

C.D. 結果及び考察

C.D-1. JMPR報告書の翻訳と解説

C.D-1-1. 2018年に開催された第50回CCPRに提出されたコンサーンフォー

ム

2017年のJMPRにおいて、遺伝子組み換えワタ(AAD-12)への適用拡大を目的として提出された2,4-Dに関する各種データが評価された。提出されたデータ中に、筆られていない綿種(cotton undelinted seed)における2,4-Dの凍結保存安定性のデータが含まれていた。そのデータからは、上記マトリクス中で2,4-D残留物が安定な期間は約1ヶ月であることが示唆されていた。しかし、最大残留濃度の推定に使用するデータを取得するために行われる作物残留試験試料の分析は、上記の1ヶ月を超える保存期間後に行われていた。このことを原因として、2017年のJMPRは「綿実における2,4-Dと2,4-DCP両方の保存安定性に疑義が生じたため、データを評価することができない」と結論とした。

Codex委員会における手続きに従い、JMPRの評価結果に対してアメリカがコンサーンフォームを提出し、綿種における残留物の安定性の欠如に関連する2017年JMPRによる結論に対する説明を要求した。要求内容の詳細を含むJMPRの回答を、2018 JMPR 報告書から以下抜粋する。(2018 JMPR 報告書 p21-22)

3.5 2,4-D(020)

背景

2017年のJMPRは、遺伝子組み換えワ

タ(AAD-12)に対する2,4-Dの使用に起因する残留物を評価した。AAD-12中では、*aryloxyalkanoate dioxygenase-12*が発現しており、これが2,4-Dへの耐性と2,4-Dの代謝における関連した増加を与える。JMPRは、綿種を対象とした最大残留濃度を勧告していない。

1998年のJMPRにより確立された残留の定義は、MRLsへの適合判定及び食事リスク評価のいずれを目的とする場合でも2,4-Dである。

第50回CCPR会合において、アメリカからコンサーンフォームが提出された。アメリカは、凍結条件下でダイズ種子における2,4-Dの安定性が示唆されているにもかかわらず、凍結条件における綿種における残留物の安定性の欠如に関連して2017JMPRが下した結論に対する説明を要求した。

JMPRによるコメント

2017年のJMPRは、凍結保存安定性試験に関する1998年のJMPRによる評価と結論を認識していた。1998年のJMPRは、トウモロコシと米糠と同様にダイズ種子(高オイルマトリクス)の試験をレビューし、ダイズ種子マトリクス中で2,4-Dは最低でも365日間は安定であると結論した。

マイナス20℃で保存したAAD-12の綿種及び関連マトリクス中での2,4-Dの保存安定性の新しい試験が、2017年JMPR

によりレビューされた。添加濃度を0.10 mgとして保存した期間中、糞とりされていない綿種中の2,4-Dは1ヶ月間安定であり、それ以降、残存パーセンテージは70%より低値となった。2017年のJMPRは、綿種における安定性試験の結果は、提出された作物残留試験データの解釈との関連性がより高いと考えた。作物残留試験における試料の凍結保存期間は、84～118日間の範囲にあり、安定性が示された期間よりも大幅に長い。

そのため、2017年のJMPRは、綿実における2,4-Dの保存安定性が疑わしいことから、最大残留量を推定するために、残留濃度データは不適切であると結論した。

上記のJMPRの回答からは、以下を読み取ることができる。と考える。

アメリカの主張の中には、ダイズ種子中における2,4-Dの安定性への言及がある。ダイズ種子中の2,4-Dの安定性は、1998年のJMPRによって結論されており、その正当性に疑問を呈す必要はない。アメリカの主張に含まれているにもかかわらず、2018年のJMPRの回答において、このダイズマトリクス中での安定性には言及がなく、注目すべき点である。と考える。遺伝子組み換えワタ(AAD-12)における残留物の特性(濃度レベル等)を作物残留試験データから明らかにすることが本評価の目的であり、

同一マトリクス(AAD-12の糞取りされていない種)中での2,4-Dの安定性が示されていることがデータ解析の前提である。そのことを暗に強調、再確認させる回答である。

2019年に開催された第51回CCPRでは、上記の2018JMPRによる回答を踏まえ以下の対応が記録されている(REP19/PR, Para 56)。「JMPR事務局は、2018年のCCPRにおいてアメリカから提出されたコンサーンフォームへの対応として、2018年のJMPRにより、綿種における2,4-D及び2,4-DCP残留物の保存安定性が信頼されなかったことを確認した。CCPRは、2019年のJMPRによる評価のために、新しい保存安定性データが提出されるだろうことに、言及した」

しかし、今回のケースでは、通常の凍結保存条件下では遺伝子組み換えに起因する2,4-Dの分解を十分に抑制することの困難が予想されるため、AAD-12中での2,4-Dのより長期間の安定性が示される可能性は低いと考える。そのため、安定性が確認されたより短期間(1ヶ月以内)のうちに、作物残留試験において採取された試料を分析し、データを取得しなおす以外に問題解決の手段はないものと考えられる。

C.D-1-2 JMPRにより作成された2,4-D 評価書の翻訳・解析・解説

JMPRにより作成された、1)AAD-12への適用拡大に伴う2017年の評価書、2)柑橘類を対象としたポストハーベスト使用に伴う2001年の評価書、3)定期的再評価プログラムにより作成された1998年の評価書を翻訳した文書を、本報告書の別添に示す(別添1～別添3)。本翻訳には、原文と合わせて使用されることが意図されている。そのように使用することで、原文による表現への理解への深まりも期待される。この意図に沿って、図表等はブランクとした。また、翻訳に当たり発見された誤記や間違いを赤字により示した(JMPRの評価書は入念に作り込まれているが、完全ではない場合もある)。さらに、記載事項の一部には、理解の助けとなる情報や疑問点を同じく赤字で示した。

2,4-Dの残留に関する情報が最も豊富であるため、別添3とした1998年の評価書(定期的再評価プログラムにより作成された評価書)を最初に読むのが適当である。環境動態に関する評価が厚い点が本評価書の特徴として感じられた。特に2,4-Dの特徴として環境動態の評価が重要視されたというわけではなく、評価のために提出されたデータセットの充実度合いに依ったものかと想像する。

農薬の物理的・化学的な特性から、各種試験の結果までをまとめ評価した「Evaluation」から、リスク管理上必要

となるMRL案等を勧告した「aprisal」へと読み進め、どのようなデータが求められそして整理され、何を原理・原則としてそれらデータが解析・評価され、さらには判断がされているのかについて、理解が深められることを期待する。疑問に感じた点については、是非FAOマニュアルの記載と併せて、納得されるまで考察して欲しい。理解の助けとなることを期待し翻訳中にも示した訳注を以下に抜粋する。

その他、現在のCodexの枠組みにおける2,4-Dを対象としたMRLs(CXLs)の設定状況を確認するために、Codexデータベースから抜粋した情報を表1として示す。

—訳注—

*1 訳注)ここでいうフルバリデートとはOECD ガイドライン等で示されているILVのことを指す。単純にフルバリデートという用語を使用すると、他の分析法への要求とは異なり混同することがあるため、あくまで残留農薬分析法に求められるフルバリデートとして区別し認識することは重要である。

*2 訳注)本 evaluation の冒頭、説明に書かれている内容と矛盾する。

*3 訳注)冒頭の説明に書かれている内容と矛盾する。この部分の文章には乱れがあるようにも感じられる。正確には冒頭部分の説明にあるとおり、GAP と作物残

留試験のそれぞれに関する情報を受領したということが事実だろうと推測される。冒頭の説明部分と、本翻訳の該当部分の原文は以下の通り。

冒頭部分：The 2001 Meeting received information on GAP and supervised residue trials for the postharvest use of 2,4-D on lemons and oranges.

該当部分：The 2001 JMPR received information on trials conducted in Uruguay and the USA on citrus fruit by GAP and on supervised trials of post-harvest use of 2,4-D on lemons and oranges.

*4 訳注)ウルグアイにおける使用基準がアメリカにおける使用基準また柑橘類に含まれる複数の農産品(オレンジ、グレープフルーツ、マンダリン、レモン)を含み、オレンジとレモンを対象とした残留物濃度の中央値の差異が5倍以内であったことから、判断されたものと推測される。(FAO マニュアル p91 “basic principles in estimation of residue levels for commodity groups”)

*5 訳注) 時々見受けられる結果の解釈ではあるが、マトリクスとアナライト濃度の違いを無視した回収(率)の取扱は、分析科学上不適切である。

*6 訳注)原文のままだが、分析結果の解析の点から言えば、一般には異なる濃度に対して得られた回収(率)を一群と見なすことは不適であり、そもそも、想定される母集団のない回収(率)に対して平均

や標準偏差を求めることも不適である。

*7 訳注)植物の形態上特定可能な茎の種類1つ。わき芽

*8 訳注)投与濃度の違いから、4グループであると分かる。この試験で用いられた頭数は、4グループ x 3頭+コントロール1頭の計13頭に下記追加2グループ(6頭)を加えた計19頭。

*9 訳注)LODは一般的には、検出限界の略記である。しかしここでは、Limits of Determination (定量限界)の略として使用されている。

*10 訳注)矛盾があるように感じられ、文意を理解することができない。原文は以下の通り。Although the US GAP for barley, oats and millet is the same as for wheat the Meeting agreed that extrapolation from wheat to barley, oats and millet could be recommended because the residue could be considerably higher from the use after blossom at the dough stage.

推測するならば、「Although the US GAP for barley, oats and millet is the same as for wheat the Meeting agreed that extrapolation from wheat to barley, oats and millet could **not** be recommended because the residue could be considerably higher from the use after blossom at the dough stage.」であり、「大麦、オーツ麦、きびを対象としたアメリカのGAPは、小麦を対象としたGAPと同一だが、開花後の使用により dough stage における残留

濃度がかなり高くなる可能性があるため、JMPRは小麦から大麦、オーツ麦、キビへの外挿を勧告することができないことについて合意した。」であろう。

C.D-2. JMPR報告書の翻訳と解説

C.D-2-1. 翻訳すべきOECDガイドライン等の選定

本研究では、以下のOECDガイドライン等を選定し翻訳等を進めることとした。

・ Series on Pesticides No. 39/Series on Testing and Assessment No. 72 「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods」

・ Series on Testing and Assessment No. 96 「Guidance Document on Magnitude of Pesticide Residues in Processed Commodities」

・ TG 508 「Magnitude of Pesticide Residues in Processed Commodities」

・ TG 506 「Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities」

これらのうち、本年度の成果としてTG 506 「Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities」の翻訳版を別添4に示す。

C.D-2-2. 翻訳したOECDガイドラインに含まれる原理・原則及び主要な点

自然科学の世界では、ある現象が観察されている時点のデータ取得を試みる場合が一般的であろう。しかし、デー

タの取得に試料の採取と分析が必要な場合には、現象観察と同時にデータを取得することができない。さらに、試料採取後直ちに分析できる場合ばかりでもない。農薬残留物のデータに関していえば、例えば、作物残留試験において採取された生の農産品試料は、ある期間保存された後に分析に供されるのがより一般的である。そのような場合には、試料採取時の残留物の特性(残留物の種類、濃度等)が、保存期間中に許容される一定の程度を超えて変化していないことの確認と保証が必要である。すなわち特定期間保存される試料における残留物の安定性が保証されていない場合は、目的とするデータを取得することはできない。仮に、安定性が十分でないことが確認されたならば、適切でないデータの排除を判断しなければならない。

先述の通り、取得データの質に顕著な影響を与える可能性があるため、試料の凍結保存安定性の確認と保証は、データの適正の判断に非常に重要である。この凍結保存された試料における残留物の安定性(凍結保存安定性)を取り扱ったOECDテストガイドライン「Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities」に含まれる、原理・原則と主要な点を以下に箇条書きする。

凍結保存安定性試験の前提

・残留の定義(リスク評価と規制用の定義の両方)に含まれるすべての成分の残留物が、採取/収穫された時から分析までの間、正確に定量可能なまま残っていることを確実にする。

・試料は、採取後分析に供するまでの間、適切な条件で保管する。例えば圃場で試料を採取した後ドライアイスですぐに冷却し、試験所までの輸送期間は可能な限り短くするといった努力がされるべきである。

・試料が保存される場合、残留物の安定性に関する保存条件の影響が調査されなければならない。

・凍結保存安定性が確認された期間内に、該当する試験で採取・保管される試料の分析を確実にする。

凍結保存安定性試験の主要な要件

・試験の適用範囲

凍結保存安定性試験の対象となる試料は以下の試験において採取される。ただし、限定はされない。

- ・作物残留試験
- ・転作試験
- ・家畜飼養試験
- ・加工試験

・試験の免除要件

試料が凍結保存され30日以内に常に分析されるのであれば、凍結保存安定性試験を省略することができる。ただし、残留物の揮発性や不安定な特性を

示さないことを物理化学的特徴に関するデータにより保証しなければならない。

・試料

✓インカード試料、添加試料のいずれを使用することも可能である。ただしインカード試料における濃度が本試験の目的に照らして十分でない場合には、添加試料の使用が優先される場合がある。

✓添加試料は、農薬投与されていないコントロール試料に、残留の定義に含まれる各成分の既知量を添加する。残留の定義に1つ以上の成分が含まれている場合には、各成分の安定性を検証できるような試験設計が必要である。

✓インカード試料を用いる場合、収穫後可能な限り短い期間中に1回目の分析を行わなければならない。これは、保存0時間の残留物のデータ取得の必要性を満たすためであり、添加試料についても同じである。

✓保存試料の形態(ホモジネート、粗切り、有姿、抽出物等)は、安定性を証明する必要のある試料の形態に依存する。例えば、作物残留試験で採取された試料が有姿で保存されるのであれば、保存試料もまた、有姿とするのが基本である。ただし、安定性がより低くなることが予想されワーストケースでの保証と理解することができるため、ホモジネート試料の使用を許容することがで

きる。

・被験物質

✓残留物の安定性に、農薬の剤型は顕著な影響を及ぼさないと期待されるが、試験結果の妥当性に関する論理的根拠が提供されるべきである。

✓残留の定義に1つ以上の成分が含まれる場合、それらの混合溶液を用いた添加試料の調製は推奨されない

・添加濃度

✓分析法の定量下限値の10倍に相当する濃度になるよう、添加量を決める。

✓添加方法は、添加用溶液の調製に関する留意点を含め、妥当性確認時に使用した添加試料の調製方法と同じとする。

・保存条件

✓作物残留試験といった各試験で採取される試料の実際の保存条件をシミュレートする。

- ・可能な限り同じ保存容器を使用する。

- ・保存時の温度は-18℃若しくはそれ以下の温度にすべきである。

- ・暗所に保存すべきである。

- ・安定性の低いことが明らかな農薬残留物については、より低温にすることを含む追加の保存条件を検討することができる。

✓保存条件を定期的にモニターする。保存期間中の条件に顕著な変化があった場合には、その詳細を報告する。

・サンプリングの頻度と期間

✓予期される保存期間をカバーし十分なタイムポイントでのサンプリングを可能にするため、凍結保存安定性試験の開始時には、その目的での小分け試料を十分多数に保管する。

✓サンプリングのタイムポイントには、0時点すなわち保存開始時を含める。

✓サンプリングのタイミングとタイムポイントは、対応する各試験の保存期間を考慮し変わりうる。

- ・例えば、0時点と12ヶ月あるいは24ヶ月後にタイムポイントが設定される場合があるが、このような設定は減衰率の推定を不可能にするため、データ提供者のリスクになる。

- ・残留物が安定であると考えられる場合には、典型例として0、1、3、6、12ヶ月をタイムポイントとすることが推奨される。ただし、保存期間がより長期に及ぶ場合には、それに応じてタイムポイントについても延長する。

- ・残留物の安定性が低いと考えられる場合には、0、2、4、8、16週をタイムポイントとすることが考えられる。

・農産品間の外挿

✓特定のカテゴリーに含まれる農産品間の外挿の原則が勧告される。農産品のカテゴリーは以下の5つであり、対応するカテゴリーに含まれる農産品の試験が以下に従い行われる。

- ・高水分含量：3種の多様な農産品で

安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

・高油含量：2つの多様な農産品で安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

・高タンパク質含量：乾燥した豆において安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

・高デンプン質含量：2つの多様な農産品で安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

・高酸性度：2つの多様な農産品で安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

✓試験された全ての農産品において残留物の安定性が示された場合には、5つの農産品のカテゴリーのそれぞれから1つの農産品を選んで行われた試験を許容することができる。

✓1つのカテゴリーにおいてのみ農薬が使用されると考えられる場合がある。その場合には、そのカテゴリーに含まれる1つ以上の代表的な農産品を用いた試験が必要とされる。多くの農薬は一部のカテゴリーの農産品にしか適用

されない。2つ以上のカテゴリーで農薬の使用が考えられているが、5つのカテゴリーの全てで安定性試験が行われていない場合もある。そのような場合、代表農産品に必要とされる数は、カテゴリーと各カテゴリーに属する作物のいくつに農薬が使用されるかの組み合わせに依存するだろう。データの申請者は凍結保存安定性試験において使用する代表農産品をよく見極める必要がある。

・動物性農産品

例えば、家畜飼養試験あるいは皮膚投与試験のような動物性農産品が関与する試験の場合には、家畜に応じて以下を選択すべきである。

- ・筋肉組織-例えば牛並びに/あるいは家禽
- ・肝臓-例えば牛並びに/あるいは家禽
- ・乳
- ・卵

・分析法

✓妥当性確認された分析法を用いなければならない。

✓複数の化合物に共通の部分の分析対象とする分析法は、通常、使用すべきではない。

・分析

✓全てのタイムポイントで、サンプリングした保存試料の2点併行分析を行う。2点の分析結果に20%以上の差があった

場合には、追加の保存試料の分析を検討しなければならない。

✓保存試料の分析時には、用時調製した添加試料を分析し、操作回収率を確認する。

これらの原理・原則並びに主要な点は、データを取得する農薬等製造事業者らによりよく理解されるべきであり、厚生労働省が策定するデータ要件ガイドラインにおいても示されるべきである。また、より詳細なデータ報告様式等の作成において、OECDガイドラインのパラグラフ36以降の記載(データ報告の留意事項並びに、報告すべき事項)を活用することもできる。

本報告書並びに別添の翻訳において使用されている用語の整合は、十分に確認されていない。そのため、データ要件ガイドラインの策定時の参考にする場合には、留意が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1)渡邊敬浩, 松田りえ子, 検査について考えることができること-1つのサンプルの結果から検査が成立する場合に関する統計学的考察-, 食品衛生研究, 69(10), 17-24, 2019

2)大原万里英, 高畑正浩, 渡邊敬浩:FAO/WHO 合同食品規格計画第 51 回残留農薬部会(CCPR), 食品衛生研究, 70(2), 33-47(2020)

2. 学会発表

1)MRL 導出に対するデータ数の影響 - OECD MRL calculator を用いたシミュレーション-, 第 42 回残留農薬分析研究会
2)どのような結果が得られた時に1つのサンプルの結果から合理的にロットの適合を判断できるのか, AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 22 回年次大会

謝辞

本研究の実施に当たり、ご指導と多くの貴重なご助言をいただいた山田友紀子博士にこの場をかりて心から厚くお礼申し上げます。

2, 4-D (020)**説明**

除草剤である 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid)は、広葉雑草の管理を目的として多種類の食品と試料において使用される、多種類の塩、アミン、エステルの剤型が現在登録されている。合成オーキシシン除草剤であるため、2,4-D は植物ホルモンに対する反応の攪乱を引き起こす。現在多くの国で登録されている。

2,4-D は、1970 年の JMPR において初めて評価された。その後、1986 年、1987 年、1996 年、1997 年、1998 年、2001 年に続いて評価された。1998 年の JMPR での評価は、定期的再評価プログラムに基づくものである。2,4-D の規格は、1994 年に開かれた FAO/WHO 合同規格会合により確立している。現在の ADI は、2,4-D とその塩並びにエステル類の和を 2,4-D として求め、その和に対して 0-0.01 mg/kg bw に設定されており、ARfD 設定の必要はない。1998 年の JMPR により確立された現在の残留の定義は、MRLs への適合を評価する規制用並びに植物性並びに動物性農産品からの食事摂取量推定用ともに 2,4-D である。2,4-D の投与に伴う残留物は脂肪溶解性ではない。

GM ワタ作物への投与に起因する残留物について検討するために、2017 年の JMPR で評価することが計画された。2,4-D に関していくつかの CXL が設定されているが、綿実については設定されていない。

代謝並びに環境動態

JMPR はこれまでに、植物並びに家畜代謝試験のいくつか、転作物試験のいくつか、また環境動態について検討してきている。今次 JMPR 会合は、2,4-D の代謝を昂進し 2,4-D 耐性とさせる aryloxyalkanoate dioxygenase-12(ADD-12)タンパク質を発現する GM ワタ(以後、ADD-12 ワタとする)に関する情報を受領した。

下記の表には、試験により同定された各残留物の構造、化学名称、共通あるいはコード名を示している。

表 1 AAD-12 ワタにおける 2,4-D 代謝試験から得られた代謝物の同定

AAD-12 Cotton (Rotondaro, S.L. et al, 2015; Study No. 140024)

ワタ植物体は、aryloxyalkanoate dioxygenase (AAD-12)タンパク質を発現するように遺伝子組み換えされた。AAD-12 タンパク質は、 α -ketoglutarate 依存性の酸化還元酵素により仲介され、急速に 2,4-D の効果を失わせる。その結果、組み替え植物体は、2,4-D の様なある種のフェノキシオーキシン類に対して抵抗性を獲得する。AAD-12 タンパク質は、2,4-D が対応する非活性フェノール(2,4-DCP)に分解することを促進する。

[¹⁴C]-2,4-D コリン(ベンゼン環が放射性標識された 2,4-dichlorophenoxy acetic acid choline)が、米国における最大季節投与率(3.3 kg ai/ha; 出芽前、BBCH61 と BBCH65 の時期に 12 日間の間隔で、それぞれ 1.1 kg ai/ha で 3 回投与)で AAD-12 ワタの栽培区画に投与された。 [¹⁴C]-2,4-D コリンの剤型は液剤(GF-2654)である。ワタは、成熟するまで屋外で栽培された。栽培区画は典型的な農業の取組を模して管理された。ただし、商業栽培では最大収量を得るために全ての丸莢を成熟させるのに対し、試験では下部の丸莢が成熟した時点で収穫した点を除く。

成熟した綿種と付属する部分(トラッシュ ; 例えば、葉や開いた丸莢)のサンプルは、3 回目となり最終の投与をした 56 日後(DAT)に収集された(出芽時の投与後 138 日目)。

サンプル中の放射活性残留物を定量するために、粉碎処理したサンプルの等量(10 x 約 0.05 g)を酸化燃焼法により分析した。

これらサンプルの一部は、油分を除くためのヘキサン(綿種のみ)、中性メタノール/水、塩基性メタノール、アルカリ環流、酸環流(綿種のみ)により順次抽出された。抽出物は、液体シンチレーションカウンターと、SPE カートリッジ処理後の HPLC により分析された。LC-MS あるいは LC-MS/MS が同定/確認の目的で使用された。抽出後の残留固形分は、ペクチン、リグニン、酸性デタージェント繊維、そしてセルロースのような非抽出性残留物の定量に供された。

処理されたサンプルにおける TRR レベルは、以下に示すように、酸の状態の 2,4-D として mg/kg 表記された。

表 2 綿種並びにトラッシュにおける総放射活性残留物 (TRR)

綿種並びにトラッシュにおける TRR レベルは、酸の状態の 2,4-D に換算して(mg eq/kg)そ

れぞれ 1.18 mg/kg と 39.8 mg/kg であった。DAT が短く設定されているため、予測される残留物レベルの最大量に近い値であると考えることができる。

綿種並びにトラッシュについて、抽出画分間での残留物の分布を、総サンプル残留物に対するパーセンテージと酸の状態の 2,4-D に換算した濃度の両方で以下に示す。

表 3 [¹⁴C]-2,4-D コリン投与後の AAD-12 ワタにおける親化合物並びに代謝物の分布

^a –実施していない

^b ヘキササンによる徹底抽出(綿種のみ)、メタノール/水 (90/10)、メタノール/1 N NaOH (90/10)、2 N NaOH、2N HCl(綿種)を含む

^c 徹底した抽出の後に残った残留物

^d $\text{accountability} = (\text{総抽出物} + \text{総非抽出物}) / (\text{燃焼分析により得られた TRRs}) \times 100$

中性溶媒により抽出後に残ったペレットは、続けてメタノール/1N NaOH (90/10, v/v)により抽出した。綿種並びにトラッシュから約 8%の TRR がこの操作によりさらに抽出された。

それぞれの塩基性メタノール抽出画分の等量を調整し HPLC により分析した。綿種及びトラッシュからの SPE 回収は良好(90-100%)であった。しかし、投与した放射活性の 75-90%しか、SPE 溶出液 EL1 には回収されなかった。綿種については、EL1 を濃縮し HPLC により分析した。濃縮溶液の回収率は、負荷/洗浄溶液並びに EL1 については良好であったが、EL2 については低値であった。3つのフェーズ全ての HPLC により分析された総量は、以下に報告している。総じて、抽出液調製手順の回収を原因として TRR の 2%以下がカウントされなかった。綿種抽出残留物の 7.5%のうちの 5.8%が、トラッシュの残留物 8.2%のうちの 7.9%が分析された。

塩基性メタノール抽出後に残留したペレットの複製物は続けて 2N NaOH により抽出された。この抽出操作により、綿種からは 32%、トラッシュからは 12%の TRR がさらに抽出された。

各塩酸抽出物の等量が調製され、HPLC により分析された。綿種とそれに付随する部分からの SPE 回収は良好(90-100%)であった。しかし、放射活性の約 25%が負荷/洗浄液に回収され、60-65%が SPE 溶出液 EL1 に、6-11%が EL2 に回収された(トラッシュについては、メタノール/1M NaOH[90/10, v/v]、綿種についてはメタノール/10M NaOH[90/10, v/v]に続けてメタノール/2 M NaOH[50/50, v/v])。3つの SPE フェーズの全ては良好な回収率で濃縮され、

HPLCにより分析された。トラッシュの負荷/洗浄液(TRRの3%)には、保持しない極性物質のみが含まれており(示していない)、それに対してEL1とEL2(TRRの1%未満、示していない)には、2-22 minに溶出する非再溶解性の化合物の一群が含まれていた。2,4-Dと2,4-DCPはそれぞれTRRの1.5%未満で観察された。これらトラッシュからの3つのSPEフェーズの総量を以下に示す。

綿種からの3つのSPEフェーズの濃縮はより困難であった。綿種の負荷/洗浄液は濃縮され、形成された沈殿物は、一部はメタノールに溶解し、一部は塩酸に溶解した。最終的には、負荷/洗浄液中の綿種TRRの約5%(元々負荷/洗浄液に含まれていた8.1%のうちの)がHPLCにより分析され、放射活性の大部分は溶媒先端に近いところに溶出した。綿種について得られたEL1はTRRの約20%を含んでおり、pH7-8に調整後、回収率が約80%のエバポレーター(40°C)を用いて濃縮された。そのため、TRRの約4%が回収されず、HPLCにより分析されなかった。綿種から得られたEL1のもう一方の等量分は、凝集物を得るために、ロータリエバポレータを用いて濃縮された(データは以下に報告してある)。この場合、濃縮による回収率は85%を超えていた。しかし、15%(TRRの3%分)が凝集物に集めることのできない揮発性物質であった。rotovapを用いて濃縮された、綿実から得られたEL1フェーズ凝集物のHPLCプロファイルは、Turbovapによって濃縮した場合に類似していた。また、コンデンサーサンプルのpHは9を超えるように調整され、約70%の回収率で濃縮後、HPLCにより分析された。その結果、主に2,4-DCPであることが示された。綿種からのEL2には、TRRの約3%が含まれていた。濃縮する過程で沈殿物が生じた。TRRの1%を含む上精をHPLCにより分析した結果、もっぱら保持されない極性成分であることが示された。

抽出されずに残った残留物の量は、綿種についてはTRRの30%、それにトラッシュについてはTRRの5%未満だった。

抽出されずに残った残留物はさらに評価され、その結果も上に示している。綿種においては、抽出されない残留物の大部分(TRRの約15%)はリグニンに関連しており、加えてより少ない量がセルロースに関連していた。トラッシュにおいては、ペクチンにTRRの2%が含まれており、その他の結合性フラクションのそれぞれがTRRの1%未満にあたる量を含んでいた。

綿種並びにトラッシュ両方のメタノール/水抽出物には複数成分の残留物が含まれており、主要な残留物は2,4-Dと2,4-DCPのコンジュゲートであると同定された。極性物質はほぼ含まれていなかった。TRRの5%未満となる低濃度の代謝物も観察された。酸分解の結果、低レベルピークの多く(コンジュゲートとして放射性標識されていた)は、主として2,4-DCPに変換された。加水分解後に2,4-Dのレベルは上昇せず、このことは2,4-Dのコンジュゲー

トではないことを示唆している。4-CP のレベルはわずかに上昇した。しかし、そのレベルは綿種について TRR の 1%未満、トラッシュについて TRR の 3%未満にとどまった。加水分解により、主要ではない非極性残留物の放出も観察された。トラッシュにおいては、27分に成分が検出されたが、HPLC のグラジエント条件を変更した結果、低レベルの多成分に含まれるものであることが示された。あるいは、非極性物質の残留は再現されるものではなかった。いずれの場合でも、非極性物質は残留プロファイルに該当するものではない。

表 4 AAD-12 ワタの綿種並びトラッシュからメタノール/水により抽出された物質の特徴づけ

*LC-MS による同定

**多成分あるいは再現されない

以下に示す通り、綿種とトラッシュの両方について、塩基性メタノール抽出物に含まれる残留物は多成分であり、中性有機溶媒画分に観察されたことから、主要な残留物は 2,4-D と 2,4-DCP のグルコースコンジュゲートであると暫定的に同定された。負荷画分がほぼ保持されない極性物質だったとしても(TRR の 1%未満、示していない)、極性成分はほぼない。SPE のメタノール/水溶出物(EL1)の加水分解(トラッシュについては等量分の 1 つだけが加水分解された)により、TRR の 3%を下回るレベルは残ったものの、多くの低レベルピークは主に 2,4-DCP に変換された。2,4-D のレベルは顕著には増加せず、このことは、2,4-D のコンジュゲートではなさそうであることを示唆していた。4-CP のレベルは、わずかに増加したが、TRR の 1%未満のままであった。主要でない、非極性残留物もまた、加水分解により放出された。

表 5 AAD-12 ワタの綿種並びトラッシュからメタノール/NaOH により抽出された物質の特徴づけ

HPLC により分析した 2N NaOH 抽出物の総量(3 つの SPE フェーズの全て)を以下に報告する。総じて、抽出物を調製する操作における回収率のために、トラッシュからの場合には TRR の 2%未満が、綿種からの場合には約 9%がカウントされなかった。綿種を対象とした 2N NaOH 抽出物中の放射活性の全てを回収するために、多くの労力がさかれた。以下に示すとおり、綿種とトラッシュともに、2N NaOH 抽出物における残留物は多成分であり、中性並びに塩基性の有機溶媒抽出物中に観察され、極性の放射性活性であったことから、主要

な残留物は 2,4-D 及び 2,4-DCP のグルコースコンジュゲートであると特徴づけられた。

SPE のメタノール/水溶出液(EL1)は酸加水分解された。トラッシュについては、この操作の回収率がほぼ 100%であった。綿種については、いくつかの試みにより、操作の回収率がほぼ 80%となった。しかし、形成された沈殿物を除くために遠心分離を行わないと、RAM トレースにはシグナルが観察されなかった。遠心分離することで、予期される放射活性の回収に多くの努力を払ったにもかかわらず、最終的に TRR の 4%未満が HPLC により分析できただけであった。明らかに、加水分解の産物は、沈殿物あるいは溶媒中で溶けない他のものに強固に関連していた。加水分解後に分析された綿種の低レベルな結果の中には、2,4-D、2,4-DCP、2,6-D のみがそれぞれ TRR の 2%未満で含まれていた。トラッシュの分析は、加水分解前にはサンプルに対して同様のプロファイルを示した。非溶解性の放射活性の大きな“こぶ”は 2-22 分に溶出された。

表 6 AAD-12 ワタの綿種並びトラッシュから 2N NaOH により抽出された物質の特徴づけ

^a 2.83-21.67 分に、非溶解性の放射活性の大きな“こぶ”が溶出した。

トラッシュに対しては、TRR の 90%を超過する部分が抽出され HPLC により分析された。以下に示すように、トラッシュでは、主要な残留物が 2,4-D と 2,4-DCP のコンジュゲートであり、両方とも TRR の約 35%を占めていた。コンジュゲートから 2,4-DCP を放出させることにおいて、酸加水分解は効果的であった。2,4-DCP コンジュゲートはグルコースコンジュゲートであることが知られているあるいは疑われている。

綿種に対しては、TRR のほぼ 70%が抽出され約 50%が HPLC により分析された。綿種における主要な残留物は、2,4-DCP のコンジュゲートであり、TRR の約 22%を占めていた。コンジュゲートから 2,4-DCP を放出させることにおいて、酸加水分解は効果的であった。2,4-DCP コンジュゲートはグルコースコンジュゲートであることが知られているあるいは疑われている。

表 7 AAD-12 ワタの綿種並びトラッシュ抽出物から得られた全体的な特徴

[‡] 多成分あるいは再現されない

分析法も類似の抽出法(メタノール/1.0 N NaHO, 90/10, v/v)を使用しており、抽出に対する

効果が、この溶媒における 2,4-D 並びに 2,4-DCP の安定性と同様に示されている。この抽出用溶媒を用いたラジオバリデーションにより、コンベンショナルな作物、AAD-1 トウモロコシ、AAD-12 ダイズに関しては、この抽出溶媒が効果的であることが示されている。さらに、この試験に用いられたのと同様に、分析法には類似の酸加水分解が含まれている。条件は 1.7 N HCl による 90°C での 1 時間の加熱である。

中性有機溶媒並びに加水分解された抽出物の両方におけるいくつかの成分が同定されている。質量分析(HPLC の保持時間並びに参照標準に比較する場合の既知の分子質量)の選択性は、幾つかの低いレベルの成分の同定を可能にし、その中には定量の目的で使用された放射活性を検出する HPLC 法により観察されなかったものが含まれていた。

綿実とトラッシュの両方において、単一グルコース(主要代謝物)、アセチル化グルコース、グルコースサルフェートを要素とする 2,4-DCP コンジュゲートが質量分析により確認された。質量分析により、上記に加えて主要でない代謝物が確認されたが、それらには 4-OH-2,5-D(コリンの挿入とヒドロキシル化)、4-CPAA(コリンの喪失)、及び 4-CP(4-CPAA におけるフェニル基からの酢酸の喪失)が含まれていた。酸加水分解後のレベルの減少、例えば 16、17、17.7 分に溶出したピークの減少から、その他のコンジュゲートの存在が疑われた。これら未知のコンジュゲートの大部分は、加水分解後に 2,4-DCP が顕著に増加したため 2,4-DCP のコンジュゲートであるが、4-CP のわずかな増加は 4-CP のコンジュゲートもまた元の抽出物中に低いレベルで存在していたかも知れないことを示唆している。

コンジュゲートに比べて遊離の DCP が低いレベルであったことは、コンジュゲート形成が急速に起こり、代謝の主要ルートであることを示唆している。放射活性がさらに植物の天然構成成分に取り込まれていったことは、投与された 2,4-D が広範に代謝されることを示している。AAD-12 ダイズでは、ヒドロキシル化も続けて起こるコリンの挿入も観察されていない。しかし、代謝の概観は、コンベンショナルな植物(非遺伝子組み換えの)における 2,4-D の代謝経路に一致している。

代謝経路

代謝の主要ルートは、側鎖の酢酸が脱離しフェノールを形成することを通じて進行する。フェノールは速やかにグルコースとコンジュゲートし、さらなるコンジュゲーションが続く。代謝は、放射性標識された炭素がリグニンやセルロースといった植物の天然成分に自然に取り込まれることを通じて進行する。主要でない代謝経路には、コリンの脱離とヒドロキシル化を伴うコリンの挿入が含まれ、それぞれ 4-CPAA と 4-OH-2,5-D が形成される。その他に、2,4-DCP と 4-CPAA の主要でない分解が起こり、コリンの脱離によって 4-CP が形成されるかも知れない。

図 1 AAD-12 ワタにおける 2,4-D の提案代謝経路

残留分析

分析法

糞とりされていない種子と AAD-12 ワタの副産物であるジンにおける 2,4-D 並びにその代謝物(2,4-DCP)を対象とした分析法 (Vespestad, D. 2014a, study No. 120430; Vespestad, D. 2014b, study No. 120431)

分析法“ワタマトリクス中の 2,4-D と 2,4-DCP を対象とした LC-MS/MS による分析手順”は、上記の 2 つのトライアル試験のスコープに沿って、2,4-D とその代謝物である 2,4-DCP の残留に関して、添加試料を用いてバリデーションされた。糞とりされていない種子と副産物であるコットンジンにおける 2,4-D と 2,4-DCP を対象としたバリデートされた LOQ は 0.01 mg/kg である。

手順：2,4-D と 2,4-DCP の残留物はメタノール:1.0M NaOH (90:10, v/v)溶液を用いて振とうすることにより、サンプルマトリクスから抽出された。Study No. 120430 のために、各サンプルの等量分が採取され、5 mL のヘキサンと混合された。両試験について、遠心分離後、混合液の水層から等量分が採取され、0.1 mg/L の混合アイソトープを含む溶液が内部標準として添加された。サンプルは、混合され、ほぼ乾燥するまで濃縮された。続いて、500 mL の 2M HCl が加えられ、酸性になったサンプルは 90±5°C で最低でも 60 分間加熱された。冷却後、酸加水分解されたサンプルに 500 mL のメタノールが加えられた。サンプルはボルテックスと転がすことにより混合され、バイアルにフィルター濾過された。サンプルは、オンラインで逆相ポリマー固層抽出(SPE)カートリッジにかけられ、LC-MS/MS によりエレクトロスプレー法によりイオン化しネガティブイオンを検出することにより質量分析された。表 8 から 11 にかけて、バリデーション試験により得られた回収データを要約する。

表 8 バリデーション試験により得られた 2,4-D 回収の要約 (Study No. 120430)

^aRSD=相対標準偏差

^bNA=該当しない

表 9 バリデーション試験により得られた 2,4-DCP 回収の要約 (Study No. 120430)

^aRSD=相対標準偏差

^bNA=該当しない

表 10 バリデーション試験により得られた 2,4-D 回収の要約 (Study No. 120431)

^aRSD=相対標準偏差

^bNA=該当しない

表 11 バリデーション試験により得られた 2,4-DCP 回収の要約 (Study No. 120431)

^aRSD=相対標準偏差

^bNA=該当しない

保存されたサンプルにおける農薬残留物の安定性

遺伝子組み換えワタとその加工画分における 2,4-D 並びに 2,4-DCP の凍結保存安定性が、添加濃度 0.10 mg/kg、-20°C(名目上)、3 から 8 ヶ月の保存期間の条件で試験された。保存の 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月後に、遺伝子組み換えワタとその加工画分における残留レベルが分析された。さらに霏取りされていない種子については、6 ヶ月と 8 ヶ月、副産物のジンについては 6 ヶ月保存した場合の安定性も決定された(Gesell, J.T., Smith, K. A. 2014; Report No. 130518)。サンプルは 2 つの残留試験で採用されたものと同一の分析法を用いて分析された (Study No. 120430 and 120431, “ワタマトリクス中の 2,4-D と 2,4-DCP を対象とした LC-MS/MS による分析手順”)。

試験結果は、-20°C で保存した場合、2,4-D 並びに 2,4-DCP の残留物は、副産物のコットンジンでは最低 6 ヶ月、ワタの殻、焙煎していない種、焙煎した種、粗油、そして精製油では最低 3 ヶ月安定であることを示している。加えて、試験結果は、霏取りされていない綿実では、保存期間中に 2,4-D 並びに 2,4-DCP の残留物が目に見える分解を経験したことを示している(表 12 並びに表 13)。

表 12 2,4-D に関する凍結保存安定性サンプルの結果の要約

--	--	--	--

--	--	--	--

表 13 2,4-DCP に関する凍結保存安定性サンプルの結果の要約

使用基準

2,4-D は天然に存在する植物ホルモンのオーキシソ類をまねたフェノキシ酢酸類に属する除草剤の一つであり、細胞分裂や伸張といった生理過程に影響を与える植物のオーキシソバランスに負荷をかける。その結果として、成長や植物の感受性が異常になる。2,4-D は、いくつかの作物について広葉雑草の選択的な管理のために出芽後に使用され、また牧草地や放牧地でも使用される。現在では、2,4-D の使用は、多くの国でいくつかの作物を対象に登録されている。

使用される 2,4-D の剤型の多くには、酸に比べて水に溶解しやすい 2,4-D のアミン塩あるいは、容易に有機溶媒に溶解するエステル誘導体が含まれている。AAD-12 ワタを対象とする使用に関連し、米国では 2,4-D を含む 2 つの剤型が存在する。2 つの剤型は 2,4-D を 2,4-D コリンとして含んでおり、これは第四級アンモニウム塩である。

表 14 は、アメリカにおける AAD-12 ワタを対象とした 2,4-D コリン塩の使用に関する GAP の要約を示している。GAP テーブル中の 2,4-D に対する投与率は、作物残留試験の要約での示し方と同様に、2,4-D 酸(酸等量あるいは酸等量換算)に基づき示されている。使用方法の全ては、圃場における地表面へのブロードキャストスプレーである。

表 14 ワタを対象に 2,4-D の登録された使用方法

作物残留試験の結果

AAD-12 ワタ

アメリカにおいて、2,4-D を用いて AAD-12 ワタを対象に実施された作物残留試験におけるクリティカル GAP を表 15 に要約する。この要約表に示されている通り、クリティカル GAP の基本は、各回 1060 g eq/ha の投与率で 2,4-D を 3 回投与することである。1 回目の投与は発芽前に行われる。発芽後に行われる 2 回の投与のうち、最初の投与は作物の生育状況が BBCH65(中期開花)に至るタイミングの 12 日前に行われる。発芽後 2 回目となり最終の投与は BBCH65 の時期に行われる。

表 15 AAD-12 を発現しているワタを対象としたアメリカにおける 2,4-D 投与のためのクリティカル GAP

総数 16 件の作物残留試験がアメリカにおいて行われた。これらの作物残留試験では 2012 年の間にワタが商業的に栽培され、AAD-12 ワタに対して 2,4-D が投与された (Study ID 120430, Vespestad, 2014a)。AAD-12 ワタには、AAD-12 タンパク質を発現する Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (aad-12) 遺伝子が導入されており、除草剤である 2,4-D への抵抗性の増加を目的とした遺伝子組み換えである。作物残留試験が実施された地域(サイト)において、作物は典型的な商業生産の取組に従って栽培された。これらの作物残留試験における 2,4-D の投与/使用基準は、表 15 に掲載したクリティカル GAP に適合している。

作物試験ごとに 2 つの区画(プロット)が使用された。一つは未処理区である。もう一つの区画では、2,4-D コリン塩の SL 剤 (剤型番号 GF-2654) が 3 回投与された。投与率の目的とする値は、各投与につき 1 ヘクタール当たり 1120 g の酸等量(ae)であり、クリティカル GAP における投与率である 1060 g ae/ha の± 25% の範囲に含まれている。SL 剤は、全てのサイトにおいて、発芽前、3 回目の投与の 12 日前、BBCH65 の生育段階(中期開花)に投与された。気圧の正常に保たれた地上でブロードキャストスプレー器を使い、トラクターに乗せての噴霧あるいはバックパックスプレーヤーによる手による噴霧により投与された。

実綿は商業的な収穫に適した作物成熟の最も早い時期に各プロットで収集され、収穫後約 24 時間以内に、毬取りされていない種子と副産物のコットンジンを中心に綿繰りされた。独立して集められた 2 つの実綿サンプルの複製が各サンプリングの間隔ごとに 2,4-D を投与したプロットから得られた。未処理区からは 1 つのサンプルが得られた。それぞれのサンプルは、それを集めたプロットの独立した少なくとも 12 箇所から集められた。毬取りしていない綿種の生鮮農産物(RAC)サンプルは全ての作物残留試験において集められ、副産物であるコットンジンは Oklahoma と Texas で行われた選択された 5 つの作物残留試験において集められた (120430 OK-2, TX-2, TX-3, TX-4, and TX-5)。副産物であるコットンジンの全ては、コットンストリッパー収穫機を用いて集められた(USA EPA のガイドラインは、ストリッパーコットンの副産物のコットンジンについて、3 件の作物残留試験のデータを要求している。しかし、ピッカーコットンのデータは要求していない)。減衰試験では、毬取りされていない綿種と副産物のコットンジンのサンプルとが、5 つのタイミングで集められた。商業的な収穫に適した成熟期に最初に達すると期待される時期の 7 日前、作物が商業的な収穫に適した成熟度になる最も早い時期、そしてその時期の 7 日後、14 日後、21 日後である。減衰試験 120430 AR-1 では毬取りされていない綿種のみが集められた。

糞取りされていない綿種と副産物のコットンジンのサンプルは、通常、集められた後4時間以内に凍結保存された。サンプルは作物残留試験を実施した圃場で凍結され、凍結状態を維持して試験室に送付され、試験室においてホモジナイズされ、2,4-Dと2,4-DCPを分析するまでの間凍結保存された(最大保存期間は、糞取りされていない綿種サンプルについて145日、副産物のコットンジンについて161日である)。2,4-Dと2,4-DCPを用いた凍結保存安定性試験の結果は、同時回収率により補正した場合、副産物のコットンジン中に、少なくとも92%の両化合物が6ヶ月間/184日間残っていることを示しており、残留試験における保存期間を十分にカバーしていた。

2,4-Dと2,4-DCPを対象としたLC-MS/MS法が残留試験のスコープに沿って添加試料の分析により妥当性確認された。分析されたマトリクスタイプでのLOQとLODは2,4-Dと2,4-DCPともにそれぞれ0.01 mg/kgと0.003 mg/kgであった。糞取りされていない綿種並びに副産物のコットンジンに対する個々の同時回収率は、検証された全ての濃度を通じて、2,4-Dに対して87-108%、2,4-DCPに対して78-114%であった。

アメリカで実施された16件の作物残留試験ごとに、糞取りされていない綿種並びに副産物のコットンジンについて得られた2,4-Dと2,4-DCPの残留データの要約を、それぞれ表16と18に示す。各処理区から得られた2つの複製サンプルのそれぞれから得られた残留濃度の値、並びにそれら2つの複製サンプルから得られた値の平均値を示した。試験サンプルから得られた残留濃度は、回収率補正されていない濃度として報告されている。分析された残留物は、農薬が投与された作物の綿種と副産物のコットンの両方から検出されたが、総じて副産物のコットンジンで最高値を示した。減衰試験のデータは、糞取りされていない種子並びに副産物のコットンジンにおける2,4-DCPの残留濃度が、総じて最終投与からより日数がたつほど減少することを示していた。減衰試験では、商業的な収穫に適した最も早い作物の成熟段階で集められたサンプルが(2番目のサンプリングの間隔)作物残留試験においてGAPに沿った農薬投与の結果としての残留濃度を代表させるためのサンプルとして選ばれた。これは、このサンプルの採取間隔が他の作物残留試験において目標とされた間隔(すなわち商業的な収穫に適した最も早い作物の生育段階を目標としている)に整合するためであり、一般に最も高い濃度の残留につながるためである。

アメリカで実施されたクリティカルGAPに適合した16の作物残留試験の結果に加え、ブラジルにおいて2014-2015年にかけて5つの作物残留試験が実施されており、その結果も表16に示した要約に含まれている(Study ID numbers 141060/141060.01)。2018年に至るまで、遺伝子組み換え綿に対する2,4-D使用のブラジルにおける登録は予期されていないが、本評価書には含まれた。

ブラジルで実施された 5 件の作物残留試験 (Study ID numbers141060/141060.01) において目標とされた使用基準は以下の通りである。都合 4 回の投与。各投与での 2,4-D の名目上の投与率は 1368 g ae/ha。植え付け前 (植え付けの約 15 日前)に 1 回投与。出芽前に 1 回投与。出芽後に 2 回投与。そのため、ブラジルで行われた作物残留試験における栽培期の総投与率は、5472 g ae/ha (4 x 1368 g ae/ha)であり、うち 2736 g ae/ha (2 x 1368 g ae/ha)は作物が出芽してから投与された。比較すると、アメリカにおける栽培期の総投与率は、3180 g ae/ha (3 x 1060 g ae/ha)であり、うち 2052 g ae/ha (2 x 1060g ae/ha)は作物が出芽してから投与された。

ブラジルで行われた作物残留試験に使用された剤型は 455 SL であった。気圧の正常に保たれた地上でブロードキャストスプレー器を使い、バックパックスプレーヤーによる手による噴霧により投与された。作物残留試験が実施された各サイトには、単一の非処理区と処理区が設けられた。

サンプリングでは、非処理区と処理区のそれぞれから、1 つの綿実サンプルが集められ、綿種は機械的に分離され、少なくともサンプル当たり 1 kg の種子が調製された。副産物のコットンジンサンプルは集められなかった。減衰試験のためのサンプルは、ブラジルで実施された 5 件の作物残留試験のうち 3 件から集められた。サンプルは、サンプル採取から 84-118 日までの間に、アメリカでの試験に用いられたのと同じ LC-MS/MS 法を用いて分析された。

作物残留試験により得られた、糞取りしていない種及び副産物のコットンジンにおける 2,4-D と 2,4-DCP 残留物の和を表 17 と表 19 のそれぞれに示している。

表 16 と表 18 における 2,4-DCP の残留は、補正せず 2,4-DCP として示してある。

表 16 AAD-12 を発現しているワタから得られた糞取りしていない綿種における 2,4-D 残留試験結果の要約

*コンジュゲートを含む

^a 下線で示された 2,4-D の値は、クリティカル GAP に適合していると考えられ、MRL の計算において使用するために選択された

^b 減衰試験に関するデータのうち、斜体で示された 2,4-DCP の値は、成熟段階の最も早い段階で収穫されたサンプルに対する値である

^c 減衰試験における、通常の商業的な収穫における作物の成熟度に対するサンプリングの間隔

表 17 2,4-D として表した、禿取りしていない綿種における 2,4-D と 2,4-DCP 残留物の和—アメリカにおける作物残留試験の結果

^a 作物残留試験の ID と、No. 120430 の試験で得られた禿取りしていない綿種における 2,4-D と 2,4-DCP の残留データ

^b 2,4-DCP の値を 2,4-D の値に変換するために、2,4-DCP の値(コンジュゲートを含む)には 2,4-D と 2,4-DCP 分子量の比、すなわち 221/163 あるいは 1.3558 が乗せられた

^c 2,4-D 等量として示した 2,4-D と 2,4-DCP の和。 2,4-D が ND (検出されず。検出下限値 0.003 mg/kg 未満)あるいは 0.01 mg/kg 未満の場合には、0.01 mg/kg の値(LOQ に等しい)が 2,4-D 等量として 2,4-D と 2,4-DCP の和を求めるための保守的なアプローチとして用いられた

副産物のコットンジン

表 18 AAD-12 を発現しているワタから得られた副産物のコットンジンにおける 2,4-D 残留試験結果の要約

*コンジュゲートを含む

^a 下線で示された 2,4-D の値は、クリティカル GAP に適合していると考えられ、MRL の計算において使用するために選択された

^b 減衰試験に関するデータのうち、斜体で示された 2,4-DCP の値は、成熟段階の最も早い段階で収穫されたサンプルに対する値である

^c 減衰試験における、通常の商業的な収穫における作物の成熟度に対するサンプリングの間隔

^d トライアルサイトの平均値は、各トライアルサイトの処理区から独立採取された 2 つの複製サンプルの値の平均である。2,4-D と 2,4-DCP の和であり、2,4-D 等量として残留濃度データは示してある。全てのトライアルサイトの平均値中最大の値は、2,4-D 等量として表された 2,4-D と 2,4-DCP の和に対する HAFT であると考えられる。

表 19 2,4-D として表した、副産物のコットンジンにおける 2,4-D と 2,4-DCP 残留物の和—アメリカにおける作物残留試験の結果

^a 作物残留試験の ID と、No. 120430 の試験で得られた副産物のコットンジンにおける 2,4-D と 2,4-DCP の残留データ

^b 2,4-DCP の値を 2,4-D の値に変換するために、2,4-DCP の値(コンジュゲートを含む)には 2,4-D と 2,4-DCP 分子量の比、すなわち 221/163 あるいは 1.3558 が乗せられた

^c 2,4-D 等量として示した 2,4-D と 2,4-DCP の和。 2,4-D が ND (検出されず。検出下限値 0.003 mg/kg 未満)あるいは 0.01 mg/kg 未満の場合には、0.01 mg/kg の値(LOQ に等しい)が 2,4-D 等量として 2,4-D と 2,4-DCP の和を求めるための保守的なアプローチとして用いられた

^d トライアルサイトの平均値は、各トライアルサイトの処理区から独立採取された 2 つの複製サンプルの値の平均である。2,4-D と 2,4-DCP の和であり、2,4-D 等量として残留濃度データは示してある。全てのトライアルサイトの平均値中最大の値は、2,4-D 等量として表された 2,4-D と 2,4-DCP の和に対する HAFT であると考えられる。

保存及び加工における残留物の動態

コットン

アメリカの 2 つの圃場(Study ID no. 120431, Vespestad, 2014b)において実施された試験の中で、繊維を除いていない綿実から生産された加工農産品における 2,4-D とその代謝物である 2,4-DCP の濃度が評価された。この試験は、Georgia 州と Texas 州に位置する 2 つの圃場において、2012 の作物生育期に実施された。加工農産品の製造に使用される繊維を除いていない綿実(RAC)が、作物残留試験により得られた。

2 つの圃場の両方で AAD-12 ワタが作付けされ、農薬を投与しない処理区 1 つと、農薬を投与した処理区 2 つが準備された。処理区では、2,4-D コリン塩を含む SL 剤(剤型番号 GF-2654)が 3 回、過剰量で投与された。1 つめの圃場で目的とされた投与量は 3 回の投与ごとにそれぞれ 2240 g ae/ha (2x, 区画 T2)であり、2 つめの圃場では 4480 g ae/ha (4x, 区画 T3)であった。作物障害への懸念があったため、4 倍量以上での投与は行われなかった。両圃場の 2 つの処理区において 3 回の投与がされた際の作物の生育時期は、以下の通り。(1)出穂前、(2)出穂後、3 回目の投与の約 12 日前、(3)BBCH65 (五分咲き)。トラクターに備え付けられた地面に向けて噴出されるブロードキャストスプレーの基材を使って投与は行われた。

加工農産品を製造するために、2 つの圃場のそれぞれで、非処理と処理区から、繊維を除いていない綿実サンプルの 1 つのバルクが採取された。採取されたバルクサンプルはその場で凍結され、加工のための施設に輸送された。工業的な加工手順を模して、商業的な代表サンプルとなる以下の加工農産品を製造するために、バルクサンプルは加工された。わた殻、ミール(コールドプレス抽出によってできる非焼成プレスケーキミールの他、焼成ミールも同じように)、粗油、精製油。繊維を除いていない綿実のバルクサンプルのそれぞれからは、2 つの複製サンプルが採取された。これは、加工農産品における濃度と比較するために、これらサンプルにおける残留物の濃度を分析するためである。残留分析のために採取された繊維を除いていないサンプルまた、加工農産品のサンプルは同様に、加工のための施設で凍

結され、凍結したまま分析のために輸送された。

試験番号 120430 の作物残留試験で用いられたものと同一の LC-MS/MS 法を用いて、繊維を除いていないサンプル並びに加工農産品のサンプルにおける 2,4-D と 2,4-DCP の残留物が分析された。

加工開始直前に加工のための施設において採取された繊維を除いていない綿実並びに、加工農産品のサンプルは、採取から分析のために抽出するまでの間、最長で 91 日間、凍結保存された。繊維を除いていない綿実の、収穫から分析のために抽出するまでの総保存期間は 234 日(7.8 ヶ月)であった。しかし、加工用施設において採取された繊維を除いていない綿実 RAC における残留物の濃度と、加工農産品における残留物の濃度とが比較されるため、加工のための施設において採取され分析のために抽出するまでの期間を保存期間とすることがより適切だと考えられた。2,4-D と 2,4-DCP を対象とした保存安定性試験の結果は、2,4-D について平均 69%(補正值)、2,4-DCP について 76%(補正值)が、3 ヶ月/90 日間、繊維を除いていない綿実中に残っていたことを示していた(Gesell, 2014)。加工画分(ワタ殻、ミール、綿油)中に残っていた 2,4-D と 2,4-DCP の補正後の量の平均は、最低でもそれぞれ 88% と 84% であった。そのため、繊維を除いていない綿実から加工画分への移行の程度あるいは残留濃度を知るための目的に対しては、2,4-D と 2,4-DCP ともに、保存安定性は十分であると考えられた。

2 つの圃場において 2 倍また 4 倍の過剰量で投与した、綿実並びにその綿実から製造した加工農産品における残留物分析結果の概要は表 20 に示されている。試験により得られた繊維を除いていない綿実並びに加工農産品における残留濃度の平均値、また関連する加工係数(PFs)の概要は表 21 に示されている。

この検討により、綿実から製造された加工産品において、2,4-D の残留物は顕著な濃度になるとは予測されないことが示された。この検討において、繊維を除いていない綿実のサンプルの多くからは、2,4-D が検出されていないが、Texas において実施された試験において 4 倍量を投与した場合には 0.01 mg/kg 未満の濃度で検出された。加工産品(ワタ殻、ミールあるいは綿油)において、2,4-D の残留物は検出されていないため、この試験は、ワタ殻、ミール、綿油には 2,4-D が顕著な濃度で存在しないことの証拠を提供していると考えられる。2,4-DCP については、綿油に残留物が濃縮されることはなかったが、ワタ殻における濃度は綿実に比べてわずかに高かった(加工係数の総平均は 1.16 であり、ワタに使用される化学物質として典型的)。非焼成ミールと焼成ミールのそれぞれに対する加工係数の総平均は、両方の圃場と投与量を通じて、それぞれ 2.10 と 1.86 であった。もし 2,4-DCP が家畜用飼料に含まれているならば、これらの加工係数は、ヒトの食事暴露量とリスクを評価する目的にお

いて、家畜負荷量を推定するために使用することができる。

表 20 AAD-12 を発現しているコットンにおける 2,4-D を対象とした加工試験により得られたデータの概要

2,4-DCP の残留物にはコンジュゲートを含む

^a2,4-D のコリン塩を含む SL 剤である GF-2654 が 3 回投与された。目標とした濃度は、2242 g ae/ha (2 倍) あるいは 4483 g ae/ha (4 倍) である。最初の投与は出穂前に行われ、その後約 12 日の間隔で投与が行われ、最終投与は五分咲きの時期(BBCH 65)に行われた。

^b 噴霧された各溶液は、約 0.25%(v/v)の非イオン性界面活性剤(NIS)を含む。

^c ND は未検出を表し、LOD(< 0.003 mg/kg)未満の濃度となる。括弧書きで示された値は、LOQ(0.01 mg/kg)未満、LOD (0.003 mg/kg)以上を意味する。

^d 平均値計算の利便性の点から、“ND” (<LOD of 0.003 mg/kg)にはゼロを割りあて、LOD (0.003 mg/kg)以上 LOQ(0.01 mg/kg)未満の値には報告された数値(すなわち括弧書きで示された値)を使用した。

表 21 綿実の加工試験結果の概要(2,4-D 及び 2,4-DCP)

2,4-DCP の残留物にはコンジュゲートを含む

^aND は分析法の LOD である 0.003 mg/kg 未満であることを示している。“<LOQ”は、LOD と LOQ (0.01 mg/kg)の間であることを示している。加工係数(PF)を計算するために、“ND”の場合にはゼロであること、<LOQ の場合には報告された値であることを想定とした。

^bRAC における濃度が LOD(ND と示されている)未満の場合には、PFs を計算せず、表中には“NC”と示した。

^c 繊維を除いていない綿実における平均値は、加工試験において集められた RAC 試料の平均値である。

^d これらの値は、ND の値となる LOD の 1/2 の値(0.0015 mg/kg)で調整してある。

表 22 綿実の加工係数の概要(2,4-D 及び 2,4-DCP)(表 21 の結果に基づく)

動物性農産品における残留物

家畜給餌試験

該当する試験結果は以前に JMPR によりレビューされている。

1998 年の JMPR 報告書で見ることができるとおり、3 頭の牛の一群に対して、乾燥重量ベースで 1446、2890、5779 そして 8585 ppm に相当する 4 つの濃度水準で 2,4-D ae を含む飼料が 28~30 日間連続して給餌された。さらに 2 つの群に対して最高濃度の飼料が 28 日間給餌され、最後の給餌後 3 日あるいは 7 日後にと殺された。最高濃度の残留物は腎臓で検出され、肝臓、脂肪、筋肉部位、そしてミルクの順で濃度は低くなった。この残留物濃度と部位との関係は、概ね 4 つの給餌群で一致した。脂肪を除き、概ね残留物の濃度は給餌濃度に依存した。脂肪では、最高の給餌濃度で見られた残留物の平均値に比べ、中程度に高い給餌濃度で見られた残留物の平均値がわずかに高く、このことはプラトーに達していたことを示している。

1998 年の JMPR 評価書で見ることができるとおり、産卵鶏(1 羽当たりの重量が 1.5 kg の産卵鶏 5 羽で構成された 3 群)の組織、卵、排泄物における残留物の濃度が測定された。産卵鶏には消費する餌の量(1 日、1 羽当たり 112-119 g)当たり約 18 ppm に相当する放射性ラベルされた 2,4-D を含むカプセルが経口投与された。卵と排泄物は 7 日間を通じて採取され、最終投与の 22-24 時間後に産卵鶏はと殺された。¹⁴C ラベルされた 2,4-D を経口投与された産卵鶏では、投与された量の約 90%が排泄物から回収された。可食組織と卵のそれぞれには総投与量の 0.1 未満しか含まれていなかった。

APPRAISAL

除草剤である 2,4-D、2,4-dichlorophenoxyacetic acid は一群の塩、アミン、エステルの剤型で登録されており、食品や飼料となる作物に混じって生える広葉雑草の管理に使用される。合成オーキシシン除草剤 2,4-D は、植物ホルモンへの応答障害を引き起こす。2,4-D は現在、たくさんの国で登録されている。

2,4-D は、1970 年に初めて JMPR により評価された。続けて、1986 年、1987 年、1996 年、1997 年、1998 年、そして 2001 年に評価された。1998 年の評価は定期的再評価プログラムによるものである。その仕様は 1994 年に行われた the Joint FAO/WHO Meeting on Specifications により確立されている。現在の ADI は、2,4-D とその塩並びにエステルを 2,4-D に換算した和として 0-0.01 mg/kg bw である。ARfD は不要である。現在の残留の定義は 1998 年の JMPR により確立されており、2,4-D を MRLs に対する規制のための指標として、また同じく 2,4-D を植物性並びに動物性農産品を対象とした食事摂取量の推定のために定義している。

GM ワタ作物における残留物を検討するために、2017 年の JMPR において 2,4-D の評価を行うことが計画された。いくつかの Codex MRLs が設定されているが、綿実を対象とする MRLs は設定されていない。

植物代謝

1998 年の JMPR では、リンゴ、レモン、ジャガイモ、そして小麦における代謝試験の結果が評価された。これらの植物における優勢な残留物は 2,4-D であった。ただし、リンゴを用いた試験では、同定するためには放射活性が低すぎた。

今回の JMPR は、GM ワタに関する情報を受領した。この GM ワタ中では、 α -ketoglutarate-dependent aryloxyalkanoate dioxygenase-12 (AAD-12)タンパク質が発現しており、このことによって 2,4-D への耐性が獲得される。この耐性獲得は、2,4-D 代謝の昂進と関連している。以後、この GM ワタを AAD-12 ワタと呼ぶ。

AAD-12 ワタを作付けした区画に、 $[^{14}\text{C}]$ -2,4-D コリン(フェニル基がラベルされた,4-dichlorophenoxy acetic acid のコリン塩)がアメリカの栽培期最大投与率である 3.3 kg ai/ha で投与された(出穂前期、BBCH61 及び BBCH65 の生育期に、12 日間の間隔を置いて、それぞれ 1.1 kg ai/ha で 3 回投与)。2,4-D コリン塩の剤型は、水和剤(soluble concentrate)であった。AAD-12 ワタは、成熟するまで屋外で栽培された。商業栽培とは異なり、植物体の下部のボールが成熟した時点でコットンボールは収穫された。

最終投与の 56 日後の総放射活性残留物(TRR)の値は、綿実で 1.2 mg eq/kg、トラッシュで 40 mg eq/kg であった。

ヘキサン、メタノール/水(9:1)、そしてメタノール/2M NaOH による連続した抽出の結果、32% TRR が綿実から、83% TRR がトラッシュ(ヘキサン抽出はなし)から抽出された。2M NaOH への還流により、さらに 32% TRR が綿実から、12% TRR がトラッシュから抽出された。また、2M HCl への還流により 3% TRR が綿実から抽出された。これらの抽出操作後、種子では 31% TRR が、トラッシュには 3.4% TRR が抽出されない放射活性として残った。抽出されなかった放射活性は、ペクチン、リグニン、酸性デタージェント繊維、そしてセルロースに帰属した。総じて、投与された放射活性の 98% が綿実とトラッシュから回収された。

2,4-D は多数の成分に代謝され、放射活性を持つ成分のいくつかが同定された。主要な残留物は、親化合物である 2,4-D と 2,4-DCP のコンジュゲートであることが同定された。その他の代謝物も同定されたが、<5% TRR であった。

綿実：メタノール/水により抽出されたもののうち、4.8% TRR(0.057 mg eq/kg)が 2,4-D であった。8.3% TRR(0.099 mg eq/kg)が 2,4-DCP と 2,4-DCP コンジュゲートであり、sulphate-glucose コンジュゲートが主であった(4.7% TRR)。メタノール/NaOH により抽出されたもののうち 2,4-D は 0.1% TRR(0.001 mg eq/kg)未満であり、2,4-DCP と 2,4-DCP コンジュゲートは、約 2.7% TRR(0.032 mg eq/kg)であった。これらの抽出物を加水分解すると 2,4-DCP が効果的に放出され、一部の 2,4-D は 2,4-DCP に加水分解された。2M NaOH 抽出物中の 2,4-D と 2,4-DCP、2,4-DCP コンジュゲートは 2% TRR 未満だった。

トラッシュ：メタノール/水により抽出されたもののうち、31% TRR(12 mg eq/kg)が 2,4-D であった。33% TRR(13 mg eq/kg)が 2,4-DCP と 2,4-DCP コンジュゲートであり、sulphate-glucose コンジュゲートが主であった(23% TRR)。メタノール/NaOH により抽出されたもののうち 2,4-D は約 2.5% TRR(0.99 mg eq/kg)未満であり、2,4-DCP と 2,4-DCP コンジュゲートは、約 2.5% TRR(0.98 mg eq/kg)であった。これらの抽出物を加水分解すると 2,4-DCP が効果的に放出され、一部の 2,4-D は 2,4-DCP に加水分解された。2M NaOH 抽出物中の 2,4-D と 2,4-DCP、2,4-DCP コンジュゲートは 2% TRR 未満だった。

2,4-D 耐性遺伝子組み換えワタ(AAD-12 ワタ)における 2,4-D の代謝は、従来作物(レモン、ジャガイモ、小麦)における代謝と定性的には類似していた。一方で量的には、2,4-D と主要でない成分の一つである 2,4-DCP が AAD-12 コットンにおいては主要な残留物であり、2,4-DCP とそのコンジュゲートは、TRR に対して同等かむしろより高い割合で検出された。しかし、植物表面または植物の内部にある 2,4-DCP は、2,4-D の使用以外にも、水や環境に由

来する可能性もあり、そのため、この化合物を残留の定義に含めることは適切ではないと考えられた。

AAD-12 ワタにおける 2,4-D の主要代謝経路は、急速に酢酸側鎖を失わせ 2,4-DCP を生成する。2,4-DCP もまた速やかにグルコースとコンジュゲートを形成し、さらに引き続きコンジュゲートを形成する。代謝は進行し、放射性ラベルされた炭素は、リグニンやセルロースのような植物の構成要素に自然に取り込まれていく。

その化学構造のため 2,4-D は、粗油あるいは精製油のいずれの綿実油にも濃縮されないと予想される。綿実における 2,4-D は<LOQ であり、粗油あるいは精製油からは検出されていないため、加工係数を計算することはできなかった。

分析法

繊維を除いていない綿実と、AAD-12 ワタの副産物であるジンにおける 2,4-D と 2,4-DCP を対象とした分析法が、今回の JMPR には提出された。提出された分析法は、作物残留試験において同時に妥当性確認されていた。

分析手順には、メタノール/1 M NaOH(90:10, v/v)による 2,4-D と 2,4-DCP の抽出が含まれている。内標となる安定同位体の添加後、ほぼ乾燥するまで濃縮され、サンプル溶液は、2M HCl 存在下、90°C±5°Cの条件で最低 60 分間加温された。サンプルは、オンライン化された逆相ポリマー固層抽出(SPE)カートリッジで精製後、液体クロマトグラフにより分離され、陰イオンエレクトロスプレータンデムマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)により測定された。

妥当性確認された分析法の LOQ は、繊維を除いていない綿実と副産物のコットンジンにおいて、2,4-D と 2,4-DCP とともに 0.01 mg/kg であった。

保存された分析用試料中での残留物の安定性

AAD-12 ワタ並びにその加工画分のサンプル中での 2,4-D と 2,4-DCP の冷凍保存安定性が、添加濃度を 0.10 mg/kg、保存条件を-20°C、保存期間を 3~8 ヶ月として試験された。

凍結保存安定性試験の結果は、試料が-20°Cで保存された場合、2,4-D と 2,4-DCP は、副産物のコットンジンでは最低 6 ヶ月間、ワタ殻、非焼成ミール、焼成ミール、粗油そして精製油では最低 3 ヶ月間安定であることを示していた。また試験結果は、1 ヶ月並びに 3 ヶ月間それぞれ保存した場合に、繊維を除いていない綿実において、2,4-D と 2,4-DCP の残留物が観察可能な程度の分解を経験していることを示している。

作物残留試験の結果

JMPR は AAD-12 ワタを対象とした作物残留試験データを受領した。

綿実における 2,4-D と 2,4-DCP 両方の保存安定性に疑義が生じたため、JMPR はデータを評価することができなかった。

参照

2, 4-D (020)**説明**

2,4-D は、CCPR による定期的レビュープログラムにおいて、1998 年に JMPR により評価された。JMPR は、多くの MRLs を勧告した。その中には、植物生長調整剤としての収穫前の主要でない使用を取り扱った 4 件の作物残留試験に基づくグレープフルーツとオレンジを対象とした 0.1 mg/kg の MRL を含む。また、柑橘類を対象とした 2 mg/kg の既存 CXL の取り消しを勧告した。

2000 年に開かれた CCPR 第 32 回会合は、柑橘類を対象とする CXL を維持することを決めた。これは、南アフリカ、ウルグアイ並びにアメリカが、ポストハーベスト使用への対応を望み、スペインが個別の柑橘類に MRL を設定しない方が望ましいとしたためである。アメリカとスペイン政府は、CCPR に対して、追加の作物残留試験の結果を JMPR に報告予定であることを通告した。オランダと南アフリカは、オレンジとグレープフルーツを対象とした個別 MRLs の設定提案に基づくデータの評価に合意しなかった(ALINORM 01/24、para 89)。

2001 年の JMPR は、レモンとオレンジを対象としたポストハーベスト使用に関する GAP 情報と作物残留試験データを受領した。

使用基準

2,4-D イソプロピルエーテル(通常名、2,4-D イソプロピル)のポストハーベスト使用が、アメリカでレモンについて、ウルグアイで柑橘類について登録されている。収穫された果実の buttons が剥離することを防ぐ目的から、2,4-D イソプロピルは選果場において水-ワックス乳剤、あるいは希釈液をフラッシュするあるいはワックスを掛けた後のスプレーにより投与される。表 1 には登録されている使用基準が示されている。投与率は酸等量(kg ae/ha)として表記されている

表 1 2,4-D イソプロピルエーテルについて登録されているポストハーベスト使用

¹ 係数は 0.84 (2,4-D の分子量は 221、2,4-D イソプロピルの分子量は 263.12)

² 保留期間

作物残留試験の結果

Johanson and Strickland (1995). アメリカの California において実施された、レモンを対象とした 2,4-D のポストハーベスト使用に関する 2 つの作物残留試験が、1998 年の JMPR に報告されていた。しかし、最大残留濃度を推定するためには、試験の件数が少なすぎた。結果を表 2 に繰り返し示す。

表 2 1998 年の JMPR に報告された、アメリカでレモンを対象に行われた 2,4-D の使用に関する 2 つの試験の結果(Johanson and Strickland, 1995) 果実全体が分析された

¹ 収穫前処理された 7 日後に収穫された果実が、保存において処理された

Johanson and Strickland (2001). 2001 年に、ネーブルオレンジとレモンを対象とした投与実験が行われた。ネーブルオレンジについては 6 群、レモンについては 4 群に投与され、それぞれの作物につき 1 群がコントロールとされた。全ての試験 (群)において、50 個のネーブルオレンジあるいはレモンが 0.05 kg ai/hl の 2,4-D イソプロピル溶液 (0.042 kg ae/hl)により処理された。各試験では処理された 50 個の中からランダムに 20 個のネーブルオレンジあるいはレモンが選ばれ集められた。全ての試験における 2,4-D イソプロピルの投与はラベルの指示に従っており、標準的な農業における取組を模したものであった。二重に処理するためには二重の溶液が調製された。

ポストハーベストで使用するために、2,4-D イソプロピルは選別場において水-ワックス乳剤、あるいは希釈液をフラッシュするあるいはワックスを掛けた後のスプレーにより投与される。プロトコルが準備される前に行われた試験の結果は、ワックス処理した後に比べ (平均 0.16 mg/kg)、水溶液をスプレー処理した後(平均 0.26 mg/kg)のほうが 2,4-D 残留濃度がわずかに高くなることを示していた。そのため、ポストハーベストで行われるスプレー処理が可能性のある残留物の濃度を最大化する。

2,4-D イソプロピルを含まない溶液をスプレーした点を除き、コントロールサンプルは処理サンプルと同一の方法を用いて取り扱われた。各複製サンプルには、平均して 2.5 kg (ネーブルオレンジ)あるいは 1.3 kg(レモン)になる 20 個の果物を含めた。全てのサンプルは処理後速やかに凍結し、10 個の果物から成るサンプル 2 つに分割した。果物は均質化され、そこから 10 g のサブサンプルが 2 つとられ、2,4-D 残留物の抽出、GC による測定に供された。

ネーブルオレンジは、2001 年 1 月 17 日に収穫され、翌日に選果場にてサンプルが集められた。リスボンレモンは、2001 年 1 月 16 日に収穫され、翌日にサンプルが集められた。集

められた果物は、その日のうちにサンキストリサーチステーションに輸送され、コールドルーム(約 1.7°C)に保管された。集められた果物は、収穫前のいかなる 2,4-D 投与あるいは収穫後のどんな農薬の投与もされていない。

2001 年 1 月 23 日に行われた最初の 4 つの群の処理では、50 個のネーブルオレンジと 50 個のレモンが、ラベルの指示並びに通常取扱に従って、同時に処理された。この 4 つの群に加えて、追加 2 群への処理が、オレンジについては行われた。その 2 群の処理では、全ての果物が、市販のフォーマーウォッシュの 10% 溶液に通され、水でリンスしたあと乾かされた。コントロールの果物には、2,4-D イソプロピルを含まない溶液がスプレーされた。一方、処理した果物には、0.05 kg ai/hl の 2,4-D イソプロピルを含む溶液がスプレーされた。

各処理では、サンプルが一定の速度で流れていくことを確実にする目的から、果実はコンベヤベルトに乗せられ、ラインを通じてサンプルを押すためにラバーボールが用いられた。処理用並びにコントロール用の溶液は 4 つのノズルにより投与され、果実はその下を通過することで溶液をかぶることになる。スプレー溶液と果実は、スプレーされた後プラスチックのブラシがついた溝を果実が転がることによってもコートされる。接触する総時間をストップウォッチで計測してみると、約 22 秒であった。果実はその後、泡状のブラシを通過する。この通過時に、果実は部分的に乾燥する。次いで、果実は 12.5% の保存ワックスと 87.5% の軟水で構成された市販の保存ワックス溶液による処理のためにワックスブラシを通過した。その後、果実はワックスの乾燥のためにフォースエアドライヤー(52-57°C)に運ばれ、プラスチックの包みに入れられ、包装ラインを外れ、ラベルされ、2 枚目となるプラスチックの包みに入れられ、すぐに冷凍庫に保存された。翌日、サンプルはドライアイスとともに深夜急行便によって、残留物の分析のために輸送された。

投与溶液における有効成分の実際の濃度を明確に知るために、各処理をする直前に、コントロール並びに処理溶液のそれぞれ約 50 mL が集められ分析された。

分析法 皮をむかない生の柑橘類における 2,4-D の濃度が、フルバリデート^{*1}された分析法により分析された。10 個の果実で構成されたサンプルのそれぞれについて、そこに含まれる全ての果物が均質化された。均質化されたサンプルは直ちに -20°C で凍結保存された。均質化サンプルから 10 g のサブサンプルを 2 つ取り、分析した。0.7 M NaHO により 100°C で 1 時間加熱抽出することで 2,4-D が単離された。抽出物の等量は、硫酸で酸性化した後、エーテル抽出に供された。抽出物中の 2,4-D は、三フッ化ホウ素メタノール溶液を使ってメチルエステルに変換された。水を加えたのち、サンプルはヘキサン転溶され、質量分析計を備えた GC(GLC-MS)により測定された。生の柑橘類における定量下限は 0.05 mg/kg であった。全てのサンプルは、2,4-D イソプロピルの投与後 20 日以内に分析された。

*1 訳注)ここでいうフルバリデートとは OECD ガイドライン等で示されている ILV のことを指す。単純にフルバリデートという用語を使用すると、他の分析法への要求とは異なり混同することがあるため、あくまで残留農薬分析法に求められるフルバリデートとして区別し認識することは重要である。

投与溶液の混合物 5mL は、2,4-D の全てのエステルあるいは塩がナトリウム塩に変換されるように、水溶性水酸化ナトリウム溶液中で加水分解された。その上で、硫酸を加え酸性化することで、全ての 2,4-D を遊離の酸に変換し、塩化ナトリウムにより飽和することで、エチルエーテルに分配した。エーテルを蒸留し、残留物を三フッ化ホウ素-メタノール溶液で処理することで、2,4-D をメチルエステルに変換した。反応後の溶液に水を加え、2,4-D メチルをヘキサンに分配し、GLC-MSD により測定した。投与用溶液中の濃度は 2,4-D イソプロピルとして計算した。投与用溶液に対する LOQ は 0.1 mg/kg であった。

結果 分析結果は、mg ae/kg を単位とする酸等量として計算された。オレンジ、レモンともに全てのコントロールサンプル中での 2,4-D の残留物の濃度は、<0.05 mg/kg であった。0.05 kg ai/hl の 2,4-D イソプロピルをスプレー処理したオレンジサンプル中での 2,4-D 残留物濃度の平均は 0.2 mg/kg であった。検出された残留物の最大濃度は 0.27 mg/kg であった(表 3)。0.05 kg ai/hl の 2,4-D イソプロピルをスプレー処理したオレンジサンプル中での 2,4-D 残留物濃度の平均は 0.395 mg/kg であった。検出された残留物の最大濃度は 0.65 mg/kg であった(表 4)。

表 3 ネーブルオレンジの果実全体に投与後 0 日目に残留していた 2,4-D(Johanson and Strickland, 2001)

表 4 レモンの果実全体に投与後 0 日目に残留していた 2,4-D(Johanson and Strickland, 2001)

オレンジとレモンのコントロールサンプルに対して使用されたブランク溶液には 0.145 mg/hl の濃度で 2,4-D イソプロピルが含まれていた。6 つの投与用溶液における 2,4-D イソプロピルの平均濃度は、名目上の濃度である 0.05 kg ai/hl の 106~136%に相当し(表 5)、6 つの溶液全ての平均は名目上濃度の 121%であった。

表 5 投与用溶液における 2,4-D イソプロピルの濃度(Johanson and Strickland, 2001)

APPRAISAL

2,4-D の残留物について、1998 年の JMPR により定期的レビュープログラムの元で評価され、多くの MRLs が勧告された。柑橘類に関しては、植物生長調整剤としての主要でない収穫前使用を扱った 4 つの作物残留試験に基づき、JMPR はグレープフルーツとオレンジの最大残留濃度を 0.1 mg/kg と推定し、また、柑橘類を対象とした 2 mg/kg の既存 CXL の取り消しを勧告した。

2000 年に開かれた CCPR 第 32 回会合は、柑橘類を対象とする CXL を維持することを決めた。これは、南アフリカ、ウルグアイ並びにアメリカの代表団が、ポストハーベスト使用に対応するために、そうすることを望んだためである。スペインの代表団は、個別の柑橘類の MRL に対応する CXL を望んだ*2。スペインとアメリカは、CCPR に対して、JMPR が追加の作物残留試験を利用することができるようになるだろうと通告した。オランダと南アフリカは、提案されたオレンジとグレープフルーツを対象とする個別 MRLs のためのデータの評価に合意しなかった。

*2 訳注)本 evaluation の冒頭、説明に書かれている内容と矛盾する。

2001 年の JMPR 会合は、柑橘類を対象として GAP に基づき、ウルグアイとアメリカにおいて実施された作物残留試験に関する情報と、レモンとオレンジを対象とした 2,4-D のポストハーベスト使用に関する作物残留試験に関する情報とを受領した*3。

*3 訳注)冒頭の説明に書かれている内容と矛盾する。この部分の文章には乱れがあるようにも感じられる。正確には冒頭部分の説明にあるとおり、GAP と作物残留試験のそれぞれに関する情報を受領したということが事実だろうと推測される。冒頭の説明部分と、本翻訳の該当部分の原文は以下の通り。

冒頭部分 : The 2001 Meeting received information on GAP and supervised residue trials for the postharvest use of 2,4-D on lemons and oranges.

該当部分 : The 2001 JMPR received information on trials conducted in Uruguay and the USA on citrus fruit by GAP and on supervised trials of post-harvest use of 2,4-D on lemons and oranges.

作物残留試験により観察された残留物

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸イソプロピルエステル(2,4-D IPE)は、ウルグアイ(グレープフ

ルーツ、オレンジ、マンダリン、レモン)とアメリカ(レモン)において、収穫後の果物から buttons が剥離することを防ぐ目的から、商業栽培される柑橘類について現在登録されており、収穫後に投与されている。2,4-D IPE の溶液は、選果場における水-ワックス溶液を用いた処理によりあるいは希釈液の吹きつけあるいはスプレーにより投与される。

1998 年の JMPR は、ウルグアイとアメリカにおける現在の GAP に従って California で行われた、レモンを対象としたポストハーベスト試験 2 件のデータを評価した。果実全体における残留物の濃度は 0.54 と 0.61 mg/kg であった。

2001 年に、カリフォルニアの研究センターにおいて、実験的な包装ライン機器を使用し、ネーブルオレンジ(6 試験)とレモン(4 試験)について、ポストハーベスト処理がおこなれた。投与は、ウルグアイとアメリカの現在のラベルによる要求に沿って、最大の投与率で行われた。商業的な投与と果実の取扱手順は、下記の通りである。果実は、0.05 kg ai/hl の 2,4-D IPE 溶液(0.04 kg ai/hl の 2,4-D に相当)溶液でスプレーされた。オレンジの果実全体における残留物の濃度を昇順で示すと以下の通りである(中央値に下線)、0.19、0.2、0.21(2)、0.22、0.24 mg/kg。レモンの果実全体における残留物の濃度を昇順で示すと以下の通りである。0.37、0.41、0.44、0.6 mg/kg。JMPR はオレンジに対するデータ(中央値、0.21 mg/kg)とレモンに対するデータ(中央値、0.49 mg/kg)が異なっていることを認めた。しかし、オレンジ、グレープフルーツ、マンダリン、レモンを対象としたウルグアイにおける使用基準に基づき、JMPR は全データセットに基づき、柑橘類を対象とした MRL を勧告することを決めた*4。ポストハーベスト処理されたオレンジとレモンの果実全体での濃度を昇順で示すと以下の通り。0.19、0.20、0.21(2)、0.22、0.24、0.37、0.41、0.44、0.54、0.60、0.61 mg/kg。JMPR は柑橘類を対象とする最大残留濃度を 1mg/kg であると推定した。可食部に関するデータは提出されなかったため、JMPR は、果実全体における残留物濃度に基づき、STMR を 0.3 mg/kg と推定した。

*4訳注)ウルグアイにおける使用基準がアメリカにおける使用基準また柑橘類に含まれる複数の農産品(オレンジ、グレープフルーツ、マンダリン、レモン)を含み、オレンジとレモンを対象とした残留物濃度の中央値の差異が5倍以内であったことから、判断されたものと推測される。(FAO マニュアルp91 “basic principles in estimation of residue levels for commodity groups”)

加工工程における残留物の動態

1998 年の JMPR は、柑橘類ジュースに対する加工係数を 0.1、柑橘類オイルに対する加工係数を<1 と推定した。今回 JMPR は、これらの加工係数を柑橘類果実を対象とした STMR の値 0.3 mg/kg に適用し、柑橘類ジュースに対する STMR-P を 0.03 mg/kg、柑橘類オイルに対する STMR-P を 0.3 mg/kg と推定した。

勧告

作物残留試験から得られたデータに基づき、JMPR は以下に列記する残留物濃度が最大残留基準値の設定並びに IEDI の推定に用いるのに適当であると結論した。

残留の定義(MLR への適合判定並びに食事摂取量の推定用): 2,4-D

Commodity		Recommendation, values in mg/kg		
CCN	Name	MRL		STMR, STMR-P ¹ HR
		New	Previous	
FC 0001	Citrus fruits	¹ Po	-	0.3
	Citrus juice			0.03
	Citrus oil			0.3
FC 0203	Grapefruit	W	0.1	
FC 0004	Oranges, Sweet, Sour	W	0.1	

W: 以前の勧告は取り下げ

¹ 可食部を対象としたデータは利用できなかったため、STMR の値は果実全体に対する結果に基づく

食事リスク評価

長期摂取

柑橘類、それらの加工農産品であるジュースとオイルに対する 2,4-D の STMR あるいは STMR-P の値が、今回の JMPR により推定された。その他、22 の農産品に対する STMR あるいは STMR-P の値が、1998 年の JMPR により推定されている。食品消費量のデータが利用可能な場合には、これらの値が食事摂取量の推定に使用された。食事摂取量推定の結果は、Annex3 に示している。

推定された STMRs に基づく、5 つの GEMS/Food 地域食事に対する IEDIs は、ADI の 3-20% であった。JMPR は、検討されてきた使用方法に由来する 2,4-D の残留物の長期摂取は公衆衛生上の懸念につながる恐れが少ないと結論した。

短期摂取

2001 年の JMPR は、2,4-D に対する ARfD を設定する必要はないと結論した。そのため、今回の JMPR は、2,4-D の短期摂取が消費者の健康リスクにつながる恐れが少ないと結論した。

参照

2, 4-D (020)**説明**

2,4-D は、1970 年に初めて、毒性と残留の両方について評価され、最近では 1986/87 年に残留が、1996 年に毒性が評価されている。1997 年の JMPR は環境への影響を評価した。

1976 年以前に ADI が設定されているため、1989 年の CCPR における優先度検討の作業グループにより、2,4-D の再評価が提案された(ALINORM 89/24A, para 299 and Appendix V)。1990 年の CCPR において、継続使用の実態があり、農薬事業者がデータを提出できる可能性があることが示された(ALINORM 91/24 para 360, Appendix V part I)。1994 年に向けてレビューが仮に予定された。後に、1996 年、そして 1998 年の JMPR で評価することが再計画された。

今回の評価は、CCPR による定期的レビュープログラムの一環として行われるものである。

情報の大部分を提出した農薬事業者タスクフォースのメンバーは、AGROGOR、Dow Elanco、Nufarm and Rhône Poulenc であった。彼らは代謝並びに環境動態、分析法、使用基準、作物残留試験、各国の MRLs に関するデータを提出した。残留物分析法、GAP 並びに、各国の MRLs に関する情報は、オランダ政府からも提出された。

同一性(遊離酸)

ISO 名	2,4-D
化学名	
IUPAC:	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
CA:	(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid
CAS No.	94-75-7
CIPAC No.	1
構造式	
分子式	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
分子量	221.0 g/mol

物理的なまた化学的な特性**純粋な有効成分**

--	--	--	--

--	--	--	--

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：TC、WP、SP、WG。アルカリ金属塩、有機アミンとエステル類としても化合物化されている。

同一性(遊離酸ジメチルアミン塩)

ISO 名 2,4-D-dimethylamine

化学名

IUPAC: dimethylamine (2,4-dichlorophenoxy)acetate

CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, dimethylamine salt

CAS No. 2008-39-1

CIPAC No. 1

シノニム 2,4-D DMA

構造式

分子式 $C_{10}H_{13}Cl_2NO_3$

分子量 266.13 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：TK、SL、SP。

同一性(2 エチルヘキシルエステル)

ISO 名 2,4-D-ethylhexyl

化学名

IUPAC: 2-ethylhexyl (2,4-dichlorophenoxy)acetate
CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, 2-ethylhexyl ester
CAS No. 1928-43-4
CIPAC No. 1
シノニム 2,4-D EHE
構造式
分子式 $C_{16}H_{22}Cl_2O_3$
分子量 333.27 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型 : TK、EC、EW、OL。

同一性(ジエタノールアミン塩)

ISO 名 2,4-D-diethanolamine
化学名
IUPAC: diethanolamine (2,4-dichlorophenoxy)acetate
CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, diethanolamine salt
CAS No. 5742-19-8
CIPAC No. 1
シノニム 2,4-D DEA
構造式
分子式 $C_{12}H_{17}Cl_2NO_5$
分子量 326.18 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：SL。

同一性(2-ブトキシエチルエーテル)

ISO 名 2,4-D-butoxyethyl

化学名

IUPAC: 2-butoxyethyl (2,4-dichlorophenoxy)acetate

CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, 2-butoxyethyl ester

CAS No. 1929-73-3

CIPAC No. 1

シノニム 2,4-D BEE

構造式

分子式 $C_{14}H_{18}Cl_2O_4$

分子量 321.20 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：EC、TK。

同一性(イソプロピルアミン塩)

ISO 名 2,4-D-isopropylamine

化学名

IUPAC: isopropylamine (2,4-dichlorophenoxy)acetate
CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, isopropylamine salt
CAS No. 5742-17-6
CIPAC No. 1
シノニム 2,4-D IPA
構造式
分子式 $C_{11}H_{15}Cl_2NO_3$
分子量 280.04 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：SL。

同一性(イソプロピルアミン塩)

ISO 名 2,4-D-isopropylamine
化学名
IUPAC: tri-isopropanolamine (2,4-dichlorophenoxy)acetate
CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, tri-isopropanolamine salt
CAS No. 32341-80-3
CIPAC No. 1
シノニム 2,4-D TIPA
構造式
分子式 $C_{17}H_{27}Cl_2NO_6$
分子量 412.31 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：SL。

同一性(イソプロピルエステル)

ISO 名 **isopropyl**

化学名

IUPAC: (2,4-dichlorophenoxy)acetate, isopropyl ester

CA: (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid, isopropyl ester

CAS No. 94-11-1

CIPAC No. 1

シノニム 2,4-D IPE

構造式

分子式 $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$

分子量 263.12 g/mol

物理的なまた化学的な特性

純粋な有効成分

技術的なマテリアル

剤型

商業的に入手可能な剤型：TK、EC。

代謝並びに環境動態

一律に環が ^{14}C ラベルされた 2,4-D を用いて代謝並びに環境動態の試験が行われた。 ^{14}C

ラベルされた 2,4-D (^{14}C 2,4-D):マウス、ラット、山羊、家禽、魚。 ^{14}C ラベルされた 2,4-D ジメチルアミン塩(^{14}C 2,4-D DMA):リンゴ。 ^{14}C ラベルされた 2,4-D 2 エチルヘキシルエステル(^{14}C 2,4-D EHE):ジャガイモ、小麦。 ^{14}C ラベルされた 2,4-D イソプロピルエステル(^{14}C 2,4-D IPE):レモン。さらに、エステル部分がラベルされた化合物も使用された: 2,4-D 2-エチルヘキシル-1- ^{14}C エステル (2,4-D EHE-1- ^{14}C):ラット。

記載に用いられる代謝物の化学名、構造、略称は Table 1 を参照のこと。

表 1 2,4-D 代謝物の構造

家畜(動物)代謝

マウス (Eiseman, 1984) ^{14}C 2,4-D (純度 98%)の薬物動態が、26 匹の雄の B6C3F1 マウスを使用し、5、45、あるいは 90 mg/kg bw の単回経口投与と 90 mg/kg bw の単回静脈投与の後調べられた。排出バランスを評価するために、5 匹のマウスに胃への直接投与あるいは静脈投与によって、5 あるいは 90 mg/kg bw の量で ^{14}C 2,4-D が単回投与された。血漿、肝臓、そして腎臓における処理後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48 そして 72 時間後の放射性残留物が分析された。尿は処理前また処理後 0-6、6-12、12-24、24-36、36-48、48-72 に採取され、その後 168 時間目まで 24 時間ごとに採取された。糞は処理前また処理後 0-12、12-24 そしてその後 168 時間目まで 24 時間ごとに採取された。マウスはと殺され、血液、肝臓、腎臓、そして残りのと体が総放射活性残留物(TRR)測定のために採取された。

各投与量における動物の血漿からの放射性物質の消失は、経口並びに静脈のルートの間方による明らかな薬理動態パラメータを得るために、反復重み付け非線形回帰分析により検討された。高濃度処理におけるクリアランスの明らかなラグ並びに、投与後初期の 4 時間に血漿において 2,4-D に由来する ^{14}C が高いレベルになったことから、限定ミカエリスメンテンクリアランスによる 2 コンパートメントモデルが用いられた。半減期は 28-45 時間と計算された。少なくとも投与量の 50%が 12 時間以内に消失下が、推定値は実際の消失速度定数に比べて低いことを示唆していた。

経口投与後、時間に対する薬物濃度時間曲線下面積(AUC)は、投与量に比例する量を超えて増加した。

^{14}C の主要排出ルートは尿であり、経口投与 5 mg/kg bw, 静脈投与 5 mg/kg bw, 経口投与 45 mg/kg bw, 経口投与 90 mg/kg bw、静脈投与 90mg/kg bw のそれぞれについて 63、84、71、

53 そして 65%であった。経口投与 5 mg/kg bw の 7.6%、静脈投与 5 mg/kg bw の 5.2%が糞に排泄された。経口投与 45 mg/kg bw では 15%に、経口投与 90 mg/kg bw では 16%に、そして静脈投与 90 mg/kg bw では 12%に、割合が増加した。TRR の大部分は、静脈投与 5 mg/kg bw では 0-6 時間後、経口投与 5 mg/kg bw では 0-12 時間後、45 あるいは 90 mg/kg bw の投与では 6-24 時間後に尿へと排出された。投与後 168 時間に検出された ^{14}C はごくわずかであった。静脈投与したマウスの血液あるいは血漿には何も見つからなかった。経口投与したマウスのうち一匹のみで低レベルの放射性ラベルされた残留物がプラズマで検出された。各投与量で、肝臓と腎臓には同様のレベルの TRR が含まれていた。投与量や投与ルートによらず、 ^{14}C 2,4-D 投与後 7 日を経過したマウスには投与量の 1.1%未満の放射性残留物が残っていた。45 mg/kg bw を超える投与量の雄のマウスでは、2,4-D の尿への排出は飽和しているように見えた。

ラット Smith 等(1980)は、濃度との関数として化合物の動態を検討し、飽和の証拠を示す排出の初期動向が認められる概ねの濃度を同定するために、ラット雄 Fischer 344 のいくつかの群に経口並びに静脈投与した後の ^{14}C 2,4-D 消失の薬物動態(放射性化学純度 99%より高い)を調査した。3 匹のラットで構成される群の 3 つに、jugular カニユーラを用いて 10、50、あるいは 150 mg/kg bw の ^{14}C 2,4-D が与えられ、類似の 2 つの群に 5 あるいは 90 mg/kg bw の ^{14}C 2,4-D が静脈投与された。TRR は投与後 1、2、3、6、9、12、15、18、24、36、48、60 そして 72 時間後に測定された。尿中の ^{14}C レベルは 6 時間間隔で最初の 24 時間は測定され、その後 72 時間目までは 12 時間間隔で測定された。糞の試料は 24 時間間隔で採取された。

投与量の影響を検討するために、6 匹のラットで構成される群 5 つに、10、25、50、100、150 mg/kg bw の量で単回投与が行われ、投与の 6 時間後にと殺された。経口投与後の 2,4-D の吸収は、初期の 12 時間以内に投与量の 85%を超え、経口投与された 10 mg/kg bw のうち総量として 97%、150 mg/kg bw のうち総量として 95%は尿に排出された。静脈投与された 5 並びに 90 mg/kg bw のうち、99%と 86%が初期の 12 時間以内に回収され、72 時間後には 100%と 91%が回収された。血漿からの飽和クリアランスが検出され、AUC における非比例性により確認され、血漿における比率の付随する増加が認められた点:腎臓において ^{14}C 濃度が投与量に応じて増加したことは、おそらく尿への排出が飽和していることを反映していた。

排出は二相性であった。静脈また経口ルートでの平均半減期は、V 相に対してそれぞれ 55 分と 1 時間であり、II 相に対して 14 時間と 18 時間であった。尿への ^{14}C の急速な排出と II 相の寄与の小ささは、ラットにおいて 2,4-D が蓄積する可能性は低いことを示唆していた。

Timchalk (1990)は、Fischer 344 ラットに経口並びに静脈投与した後の ^{14}C 2,4-D の吸収、分布、代謝並びに排出について検討した。5 匹の雄並びに 5 匹の雌で構成された群の 4 つに、 ^{14}C 2,4-D が 1 あるいは 100 mg/kg bw の量で胃に直接単回投与、あるいは 1 mg/kg bw の量で単回静脈投与、あるいは 14 日間非ラベルの 2,4-D を 1 mg/kg bw の量で毎日経口投与した後 15 日目に同じ量で ^{14}C 2,4-D を単回経口投与した。血漿における濃度と時間との関係を決めるために、4 匹の雌のラットで構成される群を 2 群追加し、単回経口投与とそれに引き続いて jugular カニューラにより 1 あるいは 100 mg/kg bw の量で投与した影響が調べられた。血漿における濃度は、投与の 24 時間後に測定された。

全ての群において、処理後 48 時間以内に、94%を超える量が回収された。主に尿(85-94%)から回収され、糞からも 2-11%が回収された。性差は認められず、繰り返し経口投与することによって、排出経路は変わらなかった。血漿における濃度は、投与後約 4 時間維持された。 ^{14}C の非比例性 AUCs と尿への排出が遅れたことは、量に依存した非線形の動態を強く意味していた。放射性ラベルされた残留物の放出は、100 mg/kg bw を投与した後最初の数時間で飽和していたが、その排出は急速であり投与量の大部分は、全ての群において投与後 36 時間で排出された。 ^{14}C 2,4-D の急速な排出は、経口投与後の尿への排出に係る半減期が約 5 時間であることから示唆される。主要な組織と器官について行った残留性の ^{14}C 活性の分析は、投与 48 時間後には投与量のごく一部のみが存在することを示唆していた。低量を投与されたラットの組織と器官には、投与された ^{14}C の 0.7%未満が含まれていた。これらの結果は、ラットにおける ^{14}C 2,4-D の動態は、その量並びに性とは独立しており、化合物は急速にそしてほぼ完全に排出され、主たる排出経路は尿への経路であり、蓄積することはあり得ないことを示唆していた。

このエステル化合物の薬理動態上の特性を 2,4-D そのものとの関係性において検討するために、ラベルされていない 2,4-DEHE が 11 週齢の雌雄の Fischer 344 ラットに単回経口投与された(Frantz and Kropscott, 1984)。1 群当たり、雄か雌のいずれか 3 匹のラットで構成された群の 8 つに対し、130 mg/kg bw の量の 2-エチルヘキシルエーテル(86.3 mg/kg の 2,4-D に相当する量)がコーン油に溶かした状態で投与され、15 並びに 30 分後、及び 1、2、4、8、24、72 時間後に採血するためラットはと殺された。72 時間のグループから 12 時間間隔で、尿が採取された。コントロールの群(雌雄別に 3 匹)にはコーン油のみが投与され、3 時間後に末梢血が採取された。2,4-D そのものと 2,4-DEHE はともに、検出限界が 0.01 g/mL と 0.1 g/mL の GLC と GC-MS により分析された。

最も特徴的な発見は、投与後 72 時間までに測定された血液と尿の両方から、いかなる 2-エチルヘキシルエーテル(0.01 g/mL)も検出されなかったことである。遊離酸は血液と尿の両方で見ついている。時間に対する血液における 2,4-D 濃度の対数線形プロットは、雌雄で

類似しており、血液における最大濃度は雌で 2 時間後に、雄で 4 時間後に観察された。72 時間後には、雌雄いずれの血液試料からも遊離酸は検出されなかった。雌雄の両方で、尿中の遊離 2,4-D の濃度は 12 時間で最大となり、36 時間までにはクリアランスはほぼ完了していた。少量の遊離酸のみ、72 時間後に検出された。遊離の 2,4-D の尿への累積回収率(投与量に対するパーセンテージ)は、雄で $94.8 \pm 9.2\%$ 、雌で $84.3 \pm 4.5\%$ であった。これらのデータは、2,4-D の 2 エチルヘキシルエステルが極めて急速に 2,4-D に変換され、その後遊離の 2,4-D が尿に排出されることを示唆している。

15 mg/kg bw を投与した雄の Fischer 344 ラットを用いて、[EHE-1- ^{14}C]2,4-D の吸収、分布、排出並びに代謝が検討された(Dryzga et al., 1992)。各ラットから、投与後 0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、18、24 時間後に血液が採取され、血漿における放射性ラベルされた残留物が分析された。また、投与後 6、12、24、48 時間後に尿が集められ、尿中とケージ洗浄液中の放射性ラベルされた残留物が採取の間隔ごとに合一され、尿中への放射ラベルされた残留物の排出量とされた。24 時間間隔で糞は集められ放射性ラベルされた残留物が分析された。放出された ^{14}C ラベルされた二酸化炭素は、6、12、24、48 時間目に集められ、モノエタノールアミン溶液中にトラップされ、1-メトキシ-2-プロパノールと TRR が定量された。組織は分析されなかった。プールされた尿(0-6 時間と、6-12 時間)と糞中の代謝物が GC-MS により特性解析された。尿中と糞抽出物中の未変化のエステルは HPLC により分析された。

図 1 ラットにおける 2,4-D dEHE の提案代謝経路(Dryzga et al., 1992)

^a 実際に同定された化合物

2,4-DEHE は急速に吸収され、投与後 4 時間で血漿中濃度は 1.0 mg/g で最大となり、その後 9 時間の半減期により減少した。いったん吸収されると、エステルは急激に代謝され尿と糞に排出され、 $^{14}\text{CO}_2$ として放出された。血液、尿、糞のいずれからでもエステルが検出されなかったことから、2,4-DEHE は 2,4-D と 2-エチルヘキサノールに急速に加水分解される。

主たる排出経路は、尿(62-66%)、それより少なく糞(14-21%)そして二酸化炭素への放出(9-12%)であった。尿並びに糞における代謝物は、2-エチルヘキサノール、2-エチルヘキサン酸、2-ethylhexane-1,6-dioic acid そして 2,4-D であった。尿のみに見つかった代謝物は、2-ethyl-5-oxohexanoic acid、2-ethyl-5-hydroxyhexanoic acid、2-heptanone and 4-heptanone であった(図 2)。2,4-D のエチルヘキシルエステルは、このように急速に 2,4-D に変換され尿に排出される。

山羊 Guo と Stewart(1993)は、搾乳用山羊に対して [^{14}C]2,4-D を給餌量として 483 ppm に相当する濃度で、連続する 3 日間投与した。投与期間中、尿、糞、そして乳が集められ、と

殺後に組織が集められた。¹⁴C は燃焼法並びに/あるいは液体シンチレーションカウンティングにより測定された。総投与量の約 82%と 8%が尿と糞のそれぞれから回収された。投与量の 0.1%未満がその他の試料から回収された。

排泄物と肝臓を除く試料における ¹⁴C は有機溶媒並びに水溶性溶媒により抽出された。肝臓ははじめにパンクレアチンで処理され、その後有機溶媒抽出された。放射能検出器を備えた HPLC によって尿は直接分析された。様々な抽出物における ¹⁴C を 2,4-D 等量として定量する HPLC 法が用いられた。質量分析、HPLC 並びに薄相クロマトグラフィーにより ¹⁴C の主要な成分は 2,4-D であることが同定された。これら分析の結果は、表 2 に示してある。

表 2 山羊における 2,4-D の代謝。尿、乳、組織からの抽出可能な画分に含まれていた ¹⁴C 成分の同定と分布(Guo and Stewart *et al.*, 1992)

¹DCP: 2,4-dichlorophenol

²2-o and 2-p-chlorophenoxyacetic acid

³NP2 に対する GC/MS のプロファイルは 2,4-dichloroanisole に合致するが、この化合物は後に確認されなかった(Guo and Stewart 1994)

⁴抽出された総%-同定された総%。全般的に見ると、この放射活性はいくつかの異なる画分にまたがっており、HPLC 分析の後にはカウントされない放射活性である。そのため、ここに示した水準で同定されていない成分の信号はない。

⁵不検出

尿、腎臓、脂肪、肝臓、そして筋肉組織において、遊離の 2,4-D が主要な成分として見つかった。遊離の 2,4-D 並びに酸性条件下で 2,4-D に加水分解した極性の高いコンジュゲートが乳における主要な ¹⁴C の成分であった。HPLC により、低濃度の DCP が乳と脂肪において一次的に同定された。

午前並びに午後に集められた乳試料中の ¹⁴C は、2,4-D として、それぞれ 0.22~0.34 mg/kg と 0.036~0.055 mg/kg であった。遊離の [¹⁴C]2,4-D は、乳における最も主要な残留物 (38%TRR、0.077 mg/kg) であると同定された。乳において、いくつかの極性の高いコンジュゲートが観察され、それらは酸加水分解によって容易に 2,4-D を放出した。1 時間加水分解した後の総 2,4-D は 47%TRR あるいは 0.095 mg/kg であった。乳中の残留物のうち約 0.009 mg/kg(4.5%TRR)並びに 0.01 mg/kg (5.0%TRR)が o- 並びに p-chlorophenoxyacetic acid(CPA)及び 2,4-dichlorophenol (DCP)としてそれぞれ一次的に同定された。CPA はもともと被験物質の不純物として含まれていた可能性がある。

腎臓において、最も高い濃度(1.4 mg/kg)の ¹⁴C が観察された。より低い濃度の ¹⁴C が肝臓(0.22 mg/kg)、脂肪(0.088 mg/kg)、そして筋肉組織(0.037 mg/kg)で観察された。各組織における残留物中主要な成分として同定されたのは 2,4-D であった。約 0.002 mg/kg の DCP(2.3%TRR)が脂肪中に見つかった。

家禽 給餌量(112-119 g/1 羽/1 日)として約 18 ppm に相当する放射性ラベルされた 2,4-D 入りのカプセルを 7 日間経口投与した産卵鶏(5 羽で 1 群、3 群。1 羽当たりの重量 1.5 kg)から採取された組織、卵並びに排泄物中の残留物が測定された。卵と排泄物は 7 日間を通じて採取され、最終投与後 22-24 時間のうちに鶏はと殺された(Puvanesarajah and Bliss, 1992)。

採取された試料には、排泄物、卵、脂肪、砂嚢、心臓、腎臓、肝臓、胸肉そしてもも肉が含まれていた。卵(各投与群で産卵の状態は良好)を除き、全ての試料が分析に先立ち、群ごとに合一された。3 群の間で比較した試料の重量は非常ににかよっていた。

試料の TRR レベルは、直接分析若しくは、燃焼した後の放射活性分析により測定された(後者の方法を採用した場合には、試料と酸化剤の回収率に対して補正がされた)。鶏からの回収率は 95.8-101.06%の範囲にあり、約 90%が排泄物から回収された。胸肉、もも肉、脂肪、肝臓における残留物は、それぞれ 0.002 mg/kg 未満、0.006 mg/kg、0.028 mg/kg、0.03 mg/kg であった。卵における平均残留濃度は、投与後 1 日目から 7 日目にかけて、定量限界未満から 0.018 mg/kg まで安定的に上昇した。組織並びに卵に含まれていたのは、総投与量の 0.1% 未満であった(表 3)

表 3 鶏の肉や臓物、卵そして排泄物における 2,4-D 等量の濃度並びに総投与量に対する%回収(Puvanesarajah and Bliss, 1992.)

¹ 記載の数字は、合一試料を 3 回測定した結果の平均値

² 投与初日

³ 投与最終日

⁴ 定量限界(0.002 mg/kg)

⁵ 1-7 日目の試料から得られた値の範囲

卵と肝臓に遊離の残留物として存在していた ¹⁴C 成分は、2,4-D と 2,4-dichlorophenol であった(表 4)。脂肪における放射活性の大部分は、アルカリ加水分解をした後にのみ放出され、このことは 2,4-D が抽出可能な ¹⁴C の大部分を含んでいることを示唆していた。

表 4 鶏における抽出可能な ¹⁴C 残留物の成分(Puvanesarajah and Bliss, 1992)

魚 ブルーギル (*lepomis macrochirus*)に約 11 mg/kg の [¹⁴C]2,4-D が静的な条件の水により 4 日間連続で投与された(Premkumar and Stewart, 1994)。毎日、魚全体と水が採取され、4 日目には魚がフィレと内臓にさばかれた。魚全体、フィレ、内臓、そして水における [¹⁴C]2,4-D 等量となる TRR レベルが、燃焼法そして/あるいは液体シンチレーションカウンティングによって測定された。

フィレと内臓における残留物は極性並びに非極性有機溶媒により抽出された。残留物の大部分はアセトニトリルにより抽出することが可能だった。5%TRR 未満がヘキサン可溶性であり、約 10%が溶媒により抽出できなかった。酸並びにアルカリ加水分解によって、フィレ中の非可溶性の残留物が放出された。

魚全体の放射活性分析によって、投与後 1 日目(0.41 mg/kg)から 3 日目(0.6 mg/kg)にかけての定常的な増加が示された。4 日目の内臓とフィレにおける TRR はそれぞれ 1.9 mg/kg と 0.41 mg/kg であった。投与されたフィレには、わずかな量のヘキサン可溶性残留物(0.005 mg/kg, 1.2%TRR)と非抽出性 ¹⁴C(0.041 mg/kg, 10%TRR)が含まれていた。大部分の ¹⁴C は、アセトニトリルに溶解した(0.34 mg/kg, 84%TRR)

抽出物中の ¹⁴C 残留物の特性解析に HPLC 放射活性分析が用いられた(表 5)。アセトニトリル可溶性抽出物の中から、2,4-D(70.4%TRR, 0.29 mg/kg)、2,4-DCP(4.7%TRR, 0.019 mg/kg)、そしてコンジュゲート(4.4%TRR, 0.018 mg/kg)が同定された。極性コンジュゲートの酸加水分解によって、2,4-D と 2,4-DCP が放出された。抽出することのできなかったフィレのペレットを酸並びにアルカリ加水分解したところ、2,4-D(6.4%TRR と 3.9%TRR, 0.029 mg/kg と 0.016 mg/kg)と 2,4-DCP(0.5%TRR, 0.002 mg/kg)が追加で放出された。フィレ中に 2,4-D と 2,4-DCP が含まれることは、GC-MS により確認された。

表 5 水に 11 mg/kg の [¹⁴C]2,4-D を加えることで 4 日間投与した魚における抽出可能な ¹⁴C 残留物の成分(Premkumar and Stewart, 1994)

¹遊離の化合物とコンジュゲートとの和

²2,4-D として示している

³GC-MS により確認された同一性

植物代謝

リンゴ Smith (1991)は、キャノピーのかかった矮性リンゴの木の根本の芝生に、ラベルの指示に従って $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ をスプレーした。2,4-D ジメチルアミン塩の水溶液が被験物質であり、2.2 kg ae/ha(42 日間で 2 回)を投与した。土壌試料は 42 日後と 97 日後に採取され、果実試料は 97 日後(成熟した状態)に採取された。

土壌試料並びに果物試料における ^{14}C 残留物を定量するために、燃焼法と液体シンチレーションカウンティングが使用された。全ての残留物濃度は、酸化剤の回収とマトリクス効果により補正され、また土壌試料の場合には水分含量で補正された。残留物の大半は、0-7.5 cm と 7.5-15 cm の層に含まれており、極めて少量(2,4-D として 0.05 mg/kg 未満)が 15-22.5、22.5-30、30-45 cm の層に含まれていた。0-7.5 cm と 7.5-15 cm の層における TRR は、42 日後で 0.53 mg/kg と 0.042 mg/kg であり、97 日後で 0.93 mg/kg と 0.15 mg/kg であった。リンゴ果実を燃焼分析した結果、TRR レベルは 0.009 mg/kg であった。リンゴ果実は凍結粉末にされ、メタノール/酢酸(95:5)で極めて激しく抽出された。抽出物はその後濃縮され、水に再溶解され、そしてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(47.5:74.5:5)で抽出された。有機溶媒抽出物中には定量できない残留物(0.0008 mg/kg)が水溶性の残留物として 56%、残りの 44%が抽出後の固まりに含まれており燃焼法により定量された。

レモン Wu (1994)は、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ イソプロピルエステルの水和液をレモンに投与した。その結果の果実における平均残留濃度は、2,4-D として 2.4 mg/kg であった。投与されたレモンは、平均温度が $5.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ 、相対湿度が約 85%に保たれた保温器に入れられ保存された。保存されたレモンは、2 時間後、2、7、14 及び 28 日後、さらに 6、8、10、12、16、20、24 週間後に採取された。

試料採取の際、表面の残留物を除くために各レモン果実は 200mL のアセトンでリンスされた。その後、8 切片にスライスされ皮がむかれ、果汁絞り器にかけられた。皮は角切りにされ液体窒素とドライアイス中で均質化された。各試料の TRR レベルが測定された。

塩化メチレンにより全ての試料は 2 回抽出され、果肉と皮試料について残った固形物は、アセトニトリルと 0.1 N 塩酸の混合溶液で 2 回抽出された。各抽出画分における ^{14}C の分布がモニターされた。各試料採取時に得られた、アセトン洗浄、全ての有機溶媒可溶画分並びに水溶性画分は、TLC と逆相 HPLC により分析された。

全ての試料採取に関して、TRR の大部分は皮と洗浄液中で見つかった。ごくわずかな量が果肉とジュースから見つかった。投与後 2 時間では 57%TRR であった皮における放射活性は、2 週間後には 97%TRR に増加し、ほぼ同じレベルで 24 週間の保存期間中残存していた。投与後 2 時間では 0.17%であった果肉中の放射活性は、24 週間後には 3.8%に増加した。

ジュースにおける放射活性は2時間後には0.09%であり、10週間後には2.5%となり、約2%のレベルで残りの保存期間中存在していた。アセトンで除かれた表面残留物は、43.02%から24週間後には0.85%に減少した。皮における2時間後の残留は76%、23%、1.15%がそれぞれ塩化メチレン、水性アセトニトリル、そして抽出後の固形物に含まれていた。またそれぞれの画分に含まれる放射活性のレベルは、24週間後には19.9%、73.5%、6.6%であった。果肉における対応する割合は31-38%、54-62%、6-8%であり、ジュースにおいては32-44%、29-33%、26-35%であった。表6は、洗浄液、皮、果肉、そしてジュースにおける¹⁴Cの分布を各試料の採取ごとに示している。

表6 様々な試料採取時におけるレモンにおける放射活性の分布(Wu, 1994)

放射性物質検出器を伴う HPLC と TLC により代謝物が定量された。投与 20 週間後の洗浄液中の低レベルの残留物のほとんど(0.64% TRR、0.015 mg/kg)は HPLC の保持時間が約 36-50 分の間に検出された。GC-MS により 4 つの代謝物が一次的に同定された。2,4-D の heptanone エステル、2,4-D 無水物と想定される 2,4-D の二量体、2,4-D IPE の二量体、そして置換された 2,4-ジクロロフェノールである。2,4-D(0.12% TRR、0.003 mg/kg)と 2,4-D IPE(0.05% TRR、0.001 mg/kg)がともに洗浄液中で見つかった。投与 20 週間後のレモンの皮は、93.5% TRR(2.1 mg/kg)を含んでいた。これら残留物の大部分が、2,4-D の遊離体並びにコンジュゲートであった(64% TRR、1.45 mg/kg)。少量で見つかったその他の代謝物は、遊離体並びに結合型の 2,4-D IPE(0.73% TRR、0.017 mg/kg)、4-hydroxy-2,3-D もしくは 5-hydroxy-2,4-D(0.58% TRR、0.013 mg/kg)、4-hydroxy-2,5-D(0.44% TRR、0.01 mg/kg)及び 2,4-dichlorophenol (0.72% TRR、0.016 mg/kg)であった。洗浄液中で見つかったものと類似したエステル用の代謝物が少量検出された(0.92% TRR、0.02 mg/kg)。果肉とジュース中に見つかった主要代謝物は、2,4-D の遊離体並びにコンジュゲートであった(果肉において 2.9% TRR、0.07 mg/kg、ジュースにおいて 0.99% TRR、0.02 mg/kg)。

図2 保存されたレモンにおける 2,4-D IPE に対して提案される代謝経路(Wu, 1994)

投与 20 週間後のレモンの皮から得られた、抽出後の固形物画分 PES-1 (5.3% TRR、0.12 mg/kg)はセルラーゼ、それに引き続き 1N HCl、最終的に 6 N HCl で加水分解された。各加水分解物は酢酸エチル(EtOAc)により分配抽出された。最終的な PES と同様に有機層並びに水層の ¹⁴C がモニターされた。セルラーゼ処理により、PES の放射活性の 27%が放出され

た。17.6%が EtOAc(EtOAc-1)に可溶であり、9.4%が水層(Aq-1)に残った。残った PES-2 の 1N 塩酸処理により 13.2%の放射活性が放出された。そのうち、10.2%が EtOAc(EtOAc-2)に可溶であり、3%が水層(Aq-2)に残った。残った PES-3 の 6N 塩酸処理により、43%の放射活性が放出され、そのうち 39.5%が EtOAc(EtOAc-3)に可溶であり、3.7%が水層(Aq-3)に残った。一方で 57%が PES-4 に最終的に残った。残留物のレベルが低かったため、EtOAc-1 画分のみが HPLC 並びに 2 次元 TLC により分析された。この画分からは 4 つの代謝物が検出された。主たる代謝物(EtOAc-1 の約 89%、0.1%TRR 未満)の TLC Rf 値は 2,4-D の値と類似した。しかし HPLC の保持時間は一致しなかった。

ジャガイモ グリーンハウスで栽培されたジャガイモの未成熟葉の全体にスプレーされるようにして、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ エチルヘキシルエステルが投与された(Puglis and Smith, 1992)。希釈された濃縮乳化剤が 0.067 kg ae/ha の率で 2 回投与された。最初の投与は 3-4 週間育てた植物体に行われ、2 回目の投与はその約 1 週間後に行われた。この投与方法は、ジャガイモに登録された除草剤としての使用基準に従っている。葉の光障害が観察され、それにより対象区の植物に比べて塊茎の収量は 56%まで減少した。剤型化された $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ エチルヘキシルエステルの特異的な放射活性は 4.08 mCi/mmol(41,000 dpm/ μg ae)であり、放射化学的純度は 99%であった。塊茎は、投与後 82 日後の成熟した状態で収穫された。塊茎における TRR は、 $^{14}\text{CO}_2$ に等量の組織の燃焼とそれに引き続き行われた放射活性分析によって定量された。摩砕されたジャガイモ塊茎の等量分が、遊離の残留物を抽出するための方法と、遊離体と酸により加水分解される残留物との全てを抽出する方法の 2 つの方法によって抽出された。5N 塩酸処理された摩砕ジャガイモ塊茎をジエチルエーテル/石油エーテル(3:1)を用いて抽出することで、遊離の残留物が単離された。遊離体と酸により加水分解可能な残留物の全ては、ジャガイモ塊茎摩砕物の 5N 塩酸抽出物を 5N 硫酸で加熱処理した後、エーテル混合液により抽出することで単離された(表 7)。

表 7 ジャガイモ塊茎における ^{14}C 残留物の分布(Puglis and Smith, 1992)

ジャガイモ塊茎における総 ^{14}C 残留物の濃度は極めて低かった。有機溶媒に可溶性な残留物の特性解析を試みるために、50 g の試料を酸加水分解し、その後ジエチルエーテル抽出した。部分的に精製した抽出物中での ^{14}C の活性は、2-エチルヘキシルエーテルあるいは遊離体のいずれの Rf とも一致しない場所に観察された。TLC で分離された未知の ^{14}C 標識化合物と標識していない 2,4-D とを混合して、TLC により再分析した。添加した 2,4-D は既知化合物と一致した Rf を示し、その同一性は HPLC-MS により確認された。従って、もし投与された塊茎に 2,4-D が存在するのであれば、未知の ^{14}C 標識化合物と同じ領域にクロマトグ

ラフされるはずである。未知の ^{14}C 標識化合物(類)の更なる特性解析は、非常に低濃度であり試料に由来する他成分による顕著な干渉がクロマトグラフにおこったため不可能であった。0.067 kg ae/ha の投与率を超えると、生育に影響のでかねない光障害が起こるため、さらに高濃度の残留をもたらす過剰投与はされなかった。

第二の試験は、 ^{14}C 2,4-D エチルヘキシルエステルの乳化濃縮液を用いて行われた (Premkumar and Vengurlekar, 1994)。2回の葉面散布が行われた。1回目の散布は植え付けされて 58 日後の塊茎がおおよそ豆のような大きさの時期に行われ、2回目の散布はその 14 日後に行われた。剤型化された溶液の平均放射化学的純度は 95.4% であり、 1.55×10^5 dpm/mg の特異的活性が 2,4-D 等量となる。 ^{14}C 2,4-D EHE 剤が 0.35 kg ae/ha の平均過剰量 (1 回目の投与 ; 0.33kg ae/ha、2 回目の投与 ; 0.37 kg ae/ha) で投与され、この量は、ラベルに表記された最大投与率 0.078 kg ae/ha の 4.4 倍であった。

葉、ツル、そして塊茎試料中の ^{14}C が分析された。ツルは 2 回目の投与後 1、7、20 日後に集められ、それらを分析した結果、残留物濃度は 2,4-D として 15、10 そして 6.3 mg/kg であった。塊茎は、同じタイミングで集められ ^{14}C 残留物の濃度は、0.32、0.65、0.58 mg/kg であった。 ^{14}C 2,4-DEHE を投与した後の水やりは、葉から洗い流されることを避けるため地面に向けて行われており、そのため、これらの結果は、 ^{14}C 2,4-DEHE 並びに/あるいはその代謝物が地上部から塊茎に転流していることを示唆している。

成熟した塊茎中の ^{14}C 残留物は酸性にしたアセトニトリルにより抽出された。その結果、105%TRR(0.61 mg/kg)が抽出され、5.4%TRR(0.031 mg/kg)が抽出されずに残った。抽出物の HPCL 分析の結果は、8.3%TRR(0.048 mg/kg)が 2,4-D EHE であることを示していた。同定可能な主要代謝物は 2,4-D(46% TRR、0.27 mg/kg)であり、残りの放射活性は 4 つ以上の極性成分に帰属した。抽出物を濃縮し HPLC により再分析した際、極性化合物の部分でプロファイルが大きく変化し、親化合物は濃縮過程で不安定になると考えられた。親化合物の TRR は 1.6%、濃度は 0.009 mg/kg に減少した。同様に 2,4-D も 36.4%TRR(0.21 mg/kg)まで減少した。

2,4-D EHE を 0.62 mg/kg になるよう添加したコントロール試料を用いて、抽出、濃縮そして分析の手順の妥当性は確認されていた。クロマトグラフによる分析上、親化合物の 95% は未変化のまま残り続けた。残りは、2,4-D(3.4%)と未知の成分(1.9%)に加水分解された。

処理された塊茎はアセトニトリル抽出された。これにより 96%TRR(0.55 mg/kg)が抽出され、9%(0.052 mg/kg)が抽出後の固形物(PES)に残った。アセトニトリル抽出物の HPLC 分析により、0.5%TRR(0.003 mg/kg)が親化合物の 2,4-D EHE、40%(0.23 mg/kg)が 2,4-D の遊離体であることが示された。残りの放射活性は、いくつかの極性成分に帰属した。濃縮と分析の

過程で、ある程度の親化合物が再び失われそして変化していることが極性成分において観察されたが、2,4-D は未変化のままであった(43%TRR、0.25 mg/kg)。このことは、濃縮過程において、親化合物のエステル体と、いくつかの極性成分(おそらくコンジュゲート)は不安定であることを示唆している。

抽出された ¹⁴C 残留物が酸加水分解された。加水分解物の HPLC 分析は、3つの主要成分の存在を示し、それらは一次的に 4-hydroxy-2,5-D(15%TRR、0.084 mg/kg)、4-chlorophenoxyacetic acid(4-CPAA; 24%TRR、0.14 mg/kg)、2,4-D(39.5%TRR、0.23 mg/kg)として同定された。抽出物中の 2,4-D の量は加水分解後も変化せず残り、このことは、抽出物中の極性成分は 4-hydroxy-2,5-D と 4-CPAA のコンジュゲートである可能性を示唆していた。主要な代謝産物の全てが単離されメチル化された。メチルエステル体の GC-MS 分析により、4-hydroxy-2,5-D、4-CPAA そして 2,4-D であることが確認された。

酸加水分解により、PES からある程度の結合型 ¹⁴C 残留物(9.0%TRR、0.028 mg/kg)が放出された。そしてアセトニトリル抽出物の濃縮後に固形物が残った(4.9% TRR、0.028 mg/kg)。アセトニトリル層には 8.7%TRR(0.05 mg/kg)が含まれ、6.4%TRR(0.037 mg/kg)は抽出されずに残った。放出された ¹⁴C 残留物の HPCL 放射活性分析の結果は、2,4-D(2.3%TRR、0.013 mg/kg)、4-CPAA(1.6%TRR、0.009 mg/kg)、そして 4-hydroxy-2,5-D(0.9% TRR、0.005 mg/kg)の存在を示していた。成分は、保持時間に基づき特性解析された。総量として 1.4%TRR(0.008 mg/kg)がボイドボリュームに溶出され未同定のまま残った。

図3 ジャガイモ塊茎における 2,4-DEHE の代謝経路(Premkumar and Vengurlekar, 1994)

¹⁴C 成分の分布を表 8 と表 9 に示す。

表 8 2,4-DEHE が投与された成熟したジャガイモ塊茎からの抽出物中に含まれる ¹⁴C 残留物(0.58 mg/kg)の分布(Premkumar and Vengurlekar, 1994)

¹2,4-D 遊離体等量

²ボイドボリュームへの溶出

表 9 抽出されなかった ¹⁴C 残留物の酸加水分解物中に含まれた ¹⁴C 残留物の分布(Premkumar and Vengurlekar, 1994)

小麦 小麦の代謝試験では、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D EHE}$ の乳化濃縮液が分げつステージの春小麦の上部からスプレーで単回投与された。投与率は 1.68 kg ae/ha であり、ラベルの最大投与率を超えていた(Puvanesarajah, 1992)。剤の放射化学純度は 98% であり、特異的活性は $20,070 \text{ dpm}/\mu\text{g ae}$ (2.0 mCi/mmol) であった。作物は、一部が閉鎖されたグリーンハウスで育てられた。

フォレージ、ワラ、穀粒試料における 2,4-D 等量としての TRR レベルが、燃焼法並びに液体シンチレーションカウンティング(LSC)により定量された。フォレージ、ワラ、穀粒中の ^{14}C 残留物が有機溶媒、水/有機溶媒並びに 0.5 M KOH を含む水メタノールによって抽出された。抽出されずに残った残留物は酵素処理された。ジエチルエーテル並びに水性エタノール抽出により、フォレージとワラにおける残留物の大部分は回収された。穀粒から回収された残留物の大部分は、水層並びに 0.5 M KOH を含む水/メタノールに含まれていた。 ^{14}C 残留物の分布を表 10 に示した。

表 10 小麦。抽出溶媒中での ^{14}C の分布(Puvanesarajah, 1992)

^{14}C 2,4-D 酸等量として

抽出物中での放射活性残留物は HPLC により分離された。代謝物とコンジュゲートがたくさんあったため、抽出物を直接 HPLC 分析することでは成分を定量することができなかった。エーテル並びにエタノール抽出物のアルカリ並びに酸加水分解により、大部分の代謝物が exocons へと変換され、それらは HPLC により分離され、それらの同定は MS 並びに/あるいは TLC により行われた(表 11)

表 11 小麦における抽出可能な残留物の成分の分布(Puvanesarajah, 1992)

^{14}C 2,4-D 酸等量として

²MS、TLC そして HPLC により同一性が確認された

³MS 並びに HPLC により同一性が確認された

⁴遊離体とコンジュゲートの総量

⁵4-Hydroxy-2,5-dichlorophenoxyacetic acid 並びにその他二つの構造異性体 H2 と H3

⁶一般に、この放射活性は、広範な保持時間にまたがる多くの異なる画分に付随しており、

また/あるいは HPLC 分析後の放射活性量は計測されなかった。そのため、ここに示されたレベルで未同定の成分に由来する信号はない。

⁷タンパク質、デンプン、セルロースの画分に取り込まれている。

フォレージとワラ中でのコンジュゲートでない 2,4-D は、それぞれ 9%と 6%であった。また、アルカリに不安定な 2,4-D コンジュゲートは総残留物の 64%あると考えられた。これら 2,4-D コンジュゲートのきつくない条件でのアルカリ加水分解の結果は、可能性としては糖が考えられる内在性の物質とのエステル化を示唆している。フォレージにおいて同定された環状のヒドロキシル化された 2,4-D 誘導体全てのうち約 33%はエーテル抽出が可能な遊離残留物であり、その他は、極性のコンジュゲートとしてエタノール抽出物の中に発見された。これらの極性コンジュゲートはアルカリに対して安定であるが、酸性条件にすることで容易に開裂した。このことは、それらコンジュゲートがフェノール性の配糖体であることを示唆している。ワラにおける環状のヒドロキシル化された代謝物の大部分(約 77%)は極性のコンジュゲートであった。2,4-dichlorophenol になる 2,4-D の側鎖の分解は、主要でない経路であった(表 11 参照)

穀粒からの抽出物中で同定された 2,4-D 残留物は、穀粒の総残留物の 6%以下であった。45%がタンパク質、スターチ、セルロースに取り込まれていた。未処理のコントロール試料には、0.17 mg/kg の残留物が含まれていた。この ¹⁴C による汚染は、コントロールの小麦と処理された小麦とが、互いのプロットで近接しており、そこで土壤に投与された 2,4-D EHE が微生物により分解され ¹⁴CO₂ を生じたためであると考えられる。処理された試料とコントロール試料の両方が、小麦を [¹⁴C]2,4-D EHE 処理した結果としての残留物と、¹⁴CO₂ の吸収の結果とを区別するために、残留物の抽出と天然化合物の分離とについて同一のスキームに従って分析された。これらの併行分析は、コントロールの穀粒試料中に ¹⁴C が存在したことは、若い小麦に [¹⁴C]2,4-D EHE を投与した後に穀粒に含まれる残留物の特性について結論する上で影響しないことを示している。

上記試験から得られた試料について後に検討した結果では(Pither, 1992)、小麦のフォレージとワラにおいて、H2 と H3 として報告されていた 2 つの hydroxydichlorophenoxyacetic acids 構造異性体(総 ¹⁴C 残留物の 1.4-2.5%)は、クロマトグラフィーによる移動度と質量スペクトルデータから、4-hydroxy-2,3-dichlorophenoxyacetic acid と 5-hydroxy-2,4-dichlorophenoxyacetic acid であると同定された。これらの化合物は 15.0-17.5 分と 18.5-21.5 分にそれぞれ HPLC により溶出される。コントロールの小麦穀粒からのアルカリ抽出物における、2,4-D EHE と 2,4-D に類似した溶出レンジをもつ ¹⁴C 成分の存在について再検討された。その結果、コントロールの小麦と処理された小麦の抽出物に、2,4-D が存在することが再分析によって明らかにされた。HPLC 分析時のキャリーオーバーによるコンタミネーションに対する予防

措置が執られた条件では、コントロールの小麦穀粒のアルカリ抽出物から 2,4-D EHE は検出されていない。

図 4 春小麦における 2,4-D IPE の代謝経路(Puvanesarajah, 1992; Puvanesarajah and Ilkka, 1992)

土壌における環境動態

好気性分解

Concha と Shepler (1994a)は、非滅菌の Catlin silty clay soil に 5.1 mg/kg の投与率で、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ を投与し 16 日間の好気性分解について試験した。試験を通じて、試料は約 25°C で保温された。炭素の放射性同位体の回収は、平均して $95.6 \pm 6.3\%$ であった。

2,4-D は急速に分解し、16 日後には投与量の 0.5% であった。pseudo-first order kinetics に基づき計算された半減期は 1.7 日であった。

主要な分解産物は CO_2 であり、その量は、試験期間の最終の時点で、投与した量の 51.2% に相当した。主要な分解産物の 2 つは 2,4-DCP(2,4-dichlorophenol) と 2,4-DCA(2,4-dichloroanisole)であり、16 日間をかけて増加し、減少した。2,4-DCP は、投与後 2 日目に投与量の 3.5% になったのが最大で、試験期間の最終時点では 0.4% まで減少した。一方、2,4-DCA は、投与後 9 日目に投与量の 2.5% であったが、その後 1.5% に減少した。抽出することのできなかつた残留物は 36% TRR であった。5 日目に抽出された試料のフルボ酸とフミン酸画分への分離により、フルボ酸画分とフミン酸画分にはそれぞれ投与量の 16% と 11% が含まれていることが明らかになった。フルボ酸画分を HPLC によりさらに分析すると、投与量の 6.1% に相当する量が 2,4-D として回収された。

これらの結果は、2,4-D 並びにその分解物は、無機化並びに土壌の有機物への取り込みによって、土壌環境から急速に消失することを示唆している。

Reynolds (1994) は、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 暗所の試験室環境条件下、10 mg/kg の濃度で、 ^{14}C ラベルされた 2-エチルヘキサノールを保温することにより、2,4-D EHE の 2-エチルヘキシル部分の動態について試験した。処理開始後、0、2、4、8、12、18、24、48、168 そして 336 時間後に試料が採取された。

分解は急速であった。当初、投与した放射活性の大部分が有機溶媒(メタノール/四塩化炭素)に抽出されたが、48 時間間に、抽出された ^{14}C のパーセンテージは 91% から 13% に急

速に減少した。7日と14日目までに、有機溶媒で抽出される量は、投与量の6.9%と6.4%になった。抽出後に残る固形物(PES)における¹⁴Cのパーセンテージは、当初8時間目まではほぼ一定であったが、その後急激に増加し始め、48時間目には最大の値に達した(投与した¹⁴Cの48%)。14日目には、PES中の¹⁴Cは投与された放射活性の総量に対する22%になった。

最初の24時間の間に、¹⁴CO₂を含む放出された酸性の揮発物は徐々に増加した。しかし、24時間と48時間の間には、KOH溶液中に検出された量は4倍の47%になった。揮発性の¹⁴Cの量は、14日目に、投与された¹⁴Cの70%となり最大になった。

図5 土壌中での2,4-Dの分解について提案される経路(Concha and Shepler, 1994a)

0日目から14日目の範囲で、¹⁴Cの回収は93%から108%であった。投与された放射活性の回収の総平均は99%であった。

有機溶媒に可溶な画分を逆相のHPLCで分析した結果は、2-エチルヘキサノールに加え、主要な産物の一つが18時間で84%の最大に達することを示していた。この産物は、GC-MSにより2-エチルヘキサン酸であると同定された。投与後より遅い時期には、低レベルだが他に5つの化合物が観察されている。しかし、これら化合物の中に投与された放射活性の総量に対して2.6%を超える量のものはない。

14日目のPES画分が様々な方法により検討された。その方法の中には、結合性の残留物を放出させるために、アセトニトリル/水/酢酸で4時間振とうし0.25 N HClで1時間還流し、さらに0.5 N NaHOで24時間浸透するという方法も含まれていた。アセトニトリル/水/酢酸で抽出された放射性物質の量は総量の1.6%であった。0.25 N HClで1時間乾留後に、固形物から4%が抽出された。酸加水分解により抽出された放射活性の大部分は、酢酸エチルで分配した後、水層画分に残った。投与された放射活性の総量のうち0.38%未満が酢酸エチルの画分から検出された。固形分における放射活性の大部分が、天然の土壌成分(フルボ酸、フミン酸、ヒューミン)に取り込まれているようだった。フルボ酸、フミン酸、ヒューミンにおける¹⁴Cの量は、投与された放射活性の総量に対して、それぞれ4.2%、4.6%、7.5%であった。

土壌における好気性25°Cの試験条件下での2-エチルヘキサノールの半減期は、5.3時間であると計算された。

Reynolds (1995e) は、上記と同一の条件下で、土壌とジエタノールアミン(10 mg/kg)を加温することにより、ジエタノールアミン塩のうちジエタノールアミン部分の動態について調査した。1 炭素がラベルされた ^{14}C ジエタノールアミンは急速に分解し、sandy loam soil における半減期は 1.35 日であった。

HPLC と TLC また比較のために LSC で分析された。

Hanford sandy loam soil を用いた試験において、親化合物は定常的に減少した。投与の 2 日後、投与された放射活性の総量のうち 38%未満が親化合物に相当した。14 日目には投与した放射活性量の 0.9%に減少し、90 日目では 0.6%未満となった。

90 日の試験期間中、全部で 10 個(M1-M10)の化合物が観察された。M2 は 0 日目では投与された放射活性の総量の 9.91%を占めたが、1 日目には検出されなかった。2 日目にも M2 は低いレベルで観察されたが、最大で 1.4%に達した後、0.1%まで減少した。

逆相 HPLC により決定された主要な産物は M3 であり、2 日目に 7.9%に達し、試験の終わりには 1%未満になるまで定常的に減少した。同一画分の TLC 分析結果は、M3 には 3 つあるいは 4 つの化合物が含まれているが、それらのいずれもが投与された放射活性の 3%を超えないことを示していた。

グリシン(M4)とエタノールアミン(M5)も低レベルで検出された。3 日目にグリシンは最大の 5%に達し、90 日目には、0.4%未満となった。エタノールアミンは、投与された放射活性の全ての量の 2.6%を超えることは無かった。

M6、M7、M8、M9、あるいは M10 のうち、投与された放射活性 0.8%を超えるものはなかった。

sandy loam soil 中の放射活性の 60%までが CO_2 に変換された。7 日目に、結合性残留物のレベルは最大の 33%に達した。90 日目には、PES から検出された放射活性のレベルは、投与した放射活性の総量の 24%であった。

7 日目の PES が 4 時間の酸分解、それに引き続き 0.5 N NaOH による 24 時間の振とうにかけられた。酸加水分解によって、 ^{14}C の 20%が放出された。0.25N 塩酸で抽出された放射活性の 1%未満が酢酸エチルに分配された。水層画分の TLC による分析は、5 つあるいは 6 つの化合物が含まれていることを示した。土壌に残存する放射活性は、フルボ酸(4.4%)、フーミン酸(3.7%)、ヒューミン(5%)に取り込まれており、このことはジエタノールアミンが天然の土壌成分に取り込まれており、そして CO_2 に無機質化されることを示唆していた。

吸着と脱着

Cohen (1991b) は、バッチ法(batch equilibrium technique)により、非滅菌の Louisiana 稲田沈殿物における変化しなかった $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の吸着/脱着を調べた。

吸着と脱着が平衡する時間を決めるために 2 つの予備試験が行われた(それぞれ 24 時間と 8 時間)。2,4-D がガラス表面に結合しないことも示された。

$22 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件で、5 濃度(0.1、0.51、1、2.47、5.02 mg/kg)を使って、信頼できる試験が行われた。2,4-D の K_d 値は 1.322($K_{oc}=58.1$)であり、試験の吸着フェーズの間に、水から沈殿物に吸着することが示唆された。しかし、脱離フェーズにおける K_d 値が 1.64($K_{oc}=78.1$)であったことは、2,4-D が稲田沈殿物中で適度に高い移動性をもつことを示唆していた。試験された 5 濃度に対する ^{14}C の平均回収は 98.9%であった。

Fathulla (1996b)は、4 つの代表的な農業土壌に対する $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の吸着と脱着の特性を調べた。試料は土壌と溶液の比率が 1 g : 1 mL になるように調製された。溶液は、0.01 M 塩化カルシウム溶液として調製され $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の名目上の濃度は、10、5、2.5、1 mg/mL とされた。試料は、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件で 24 時間、ウォーターバス中で振とうすることで平衡化され、続いてボルテキシングされ、遠心された。被験物質の土壌への吸着を調べるために、遠心分離された上精中の ^{14}C が LSC により測定された。各試料から分離された上精は、等量の未処理 0.1 M CaCl_2 で置換された。試料は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件で 24 時間平衡化され、続けてボルテキシングされ遠心された。上精中の ^{14}C が LSC により測定され、脱着後土壌に残った放射活性が、燃焼後に LSC により測定された。

全ての土壌に対して得られた吸着と脱着のデータを直線回帰解析した結果、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の吸着と脱着は Freundlich 式に従っていた。吸着と脱着平衡定数($K_d\text{-a}$ と $K_d\text{-d}$ のそれぞれ)、並びに $K_{oc}\text{-a}$ と $K_{oc}\text{-d}$ の係数を表 12 に示す。

表 12 土壌中での 2,4-D の吸着と脱着(Fathulla, 1996b)

被験物質は、全ての土壌中、試験系において非常に安定であった。吸着溶液と土壌抽出物中で変化しなかった $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の総量は、元々の量に対して、Arizona silty clay loam では 95%、California sandy loam では 109%、Mississippi loam では 97%、Plainfield sand では 98%であった。 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ は 24 時間を通じて、また 0.01 M CaCl_2 中において安定であり脱着溶液中の放射活性の 100%は 48 時間後でも $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ であった。

Koc-a 値を使った相対移動性の推定にのみ基づくと、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ が土壌を通じてしみ出る可能性は試験した全ての土壌に対して高い。

Fathulla (1996c) は、土壌分解物である 2,4-dichloroanisole(2,4-DCA)の吸着と脱着について同一の 4 つの土壌を用いて調査した。試料は土壌と溶液の比率が 1 g : 5 mL になるように調製された。溶液は、0.01 M 塩化カルシウム溶液として調製され $[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCA}$ の名目上の濃度は、5、2.5、1、0.5 mg/mL とされた。その他の試験設計は上記の通りである(Fathulla, 1996b)。

取得されたデータの直線回帰解析の結果は、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCA}$ の吸着と脱着が Freundlich 式に従っていることを示していた。吸着と脱着平衡の定数並びに係数を表 13 に示す。

表 13 土壌中での 2,4-DCA の吸着と脱着(Fathulla, 1996c)

全ての試験系において、被験物質は安定であった。24 時間後に変化しなかった $[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCA}$ の吸着溶液と土壌抽出物中での総量は、元々の量に対して、Arizona silty clay loam では 94%、California sandy loam では 105%、Mississippi loam では 105%、Plainfield sand では 103% であった。48 時間後の脱着溶液中での放射活性の 100%が未変化の $[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCA}$ であった。

Koc-a の値に基づけば、4 種の土壌から 2,4-DCA がしみ出る可能性は低かった。

Fathulla (1996d) は、4 種の農業土壌中での 2,4-ジクロロフェノールの吸着と脱着特性について調べた。試料は土壌と溶液の比率が 1 g : 2 mL になるように調製された。溶液は、0.01 M 塩化カルシウム溶液として調製され $[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCP}$ の名目上の濃度は、10、5、2.5、1mg/mL とされた。その他の試験設計は上記の通りである(Fathulla, 1996b)。

$[^{14}\text{C}]2,4\text{-DCP}$ の吸着と脱着は Freundlich 式に従っていた。吸着と脱着の平衡定数と吸着と脱着の係数は表 14 に示してある。

表 14 土壌中での 2,4-DCP の吸着と脱着(Fathulla, 1996d)

4 つ全ての試験系において、被験物質は安定であった。24 時間後に変化しなかった $[^{14}\text{C}]2,4\text{-$

DCP の吸着溶液と土壤抽出物中での総量は、元々の量に対して、Arizona silty clay loam では 92.5%、California sandy loam では 93%、Mississippi loam では 92%、Plainfield sand では 92% であった。 ^{14}C 2,4-DCA は 0.01 M CaCl₂ 溶液中で 24 時間安定であること並びに脱着溶液中で 48 時間安定であることが示された。

Koc-a の値に基づけば、試験した土壤から ^{14}C 2,4-DCP がしみ出る可能性は低かった。

移動性

農業エコシステムを代表させるために Burgener (1993) はライシメータを使用した。このライシメータの中では、120 cm の土壤における ^{14}C 2,4-D とその分解物の転流、降水と溶脱の植生の影響が調べられた。725 日後の ^{14}C バランスの情報と同様に、土壤投与された後の作物による農薬の吸い上げの情報が得られた。

2 つのライシメータに夏小麦が植えられた。1990 年の 6 月 15 日に、750 g ae/ha の推奨される投与率で DMA が投与された。通常の農業の取組に従って耕作と転作が行われた。1990 年 11 月に冬ライ麦の種がまかれ、1991 年の夏にライが収穫された後、冬ナタネが植えられた。水の試料が定期的に採取され、被験化合物の無機化から分解によって生じた $^{14}\text{CO}_2$ の寄与を推定するため、LSC によって ^{14}C が測定された。残りの放射活性は、クロマトグラフィーの技術により特性解析された。植物によって吸い上げられた放射活性は、実験の最終段階での土壤中の放射活性と同様に燃焼法によって測定された。一方で、大気に放出された $^{14}\text{CO}_2$ とその他の揮発性化合物は別々に計算された。

ライシメータ 1 では、2 年後に浸出液に回収された ^{14}C は投与された放射活性の総量の 0.196% であり親化合物の 0.14 mg に相当した。浸出液試料の全てを含む、放射活性の総平均回収は、リッター当たり親化合物等量物として 0.14 mg の濃度に相当した。投与された放射活性の総量の 0.099% に相当する $^{14}\text{CO}_2$ を減算した後、残りの濃度は、0.07 mg/L まで減少した。全試験期間の間、958 L の水(灌水を含む総降水量の約 48%)が採取された。

ライシメータ 2 では、2 年後の水における放射活性は、投与された放射活性の総量の 0.25% であり、0.17 mg の親化合物等量に相当した。浸出液試料の全てを含む、放射活性の総平均回収は、リッター当たり親化合物等量物として 0.175 mg の濃度に相当し、投与された放射活性の総量の 0.058% が $^{14}\text{CO}_2$ であった。これを減算した後、 ^{14}C の平均含量は、2,4-D として 0.13 mg/L であった。この間、灌水を含む総降水量の約 50% に相当する 994 L の水が採取された。

$^{14}\text{CO}_2$ を除き、TLC と HPLC によって浸出液中から検出された揮発性化合物はなかった。

[¹⁴C]2,4-DDMA 塩、遊離酸、その分解産物として知られる 2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールは、いかなる浸出液試料からも検出されなかった。2つのライシメータともに、最大 3 つの未知の放射性画分が検出された。主となる未知の画分は、分析された浸水液試料の全てに存在した。その未知画分は、総量として、ライシメータ 1 では投与された放射活性(AR)の 0.043%、ライシメータ 2 では 0.087%であった。この放射活性は明らかに極めて極性の高い残留物に由来しており、フミン酸とフルボ酸に結合した開裂した環の断片に帰属するのではないかと推測された。

試験の終わりの際には、土壌の中心は約 10 cm の厚さの水平断片 12 個に切り分けられた。ライシメータ 1 では、土壌プロファイルにおける TRR は AR の 21%であり、11%は上層に含まれていた。ライシメータ 2 では、相当する割合は 17%と 8.8%であった。2つのライシメータともに、わずかに AR の 0.1%が 57 cm より深い部分の土壌に見つかった。

土壌における抽出可能な放射活性は、再度 3 つの未知画分に由来しており、2つのライシメータから得られた土壌抽出物中のそれら未知のフラクションのパターンと量を十分に比較した結果、ほぼ同一であった。放射活性は 17 cm 程度の深さの層で見つかっており、その量は、ライシメータ 1 では総量として AR の 0.26%、ライシメータ 2 では 0.29%であった。分解産物である 2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールは分析された 6 つの土壌層のどこからも検出されず、この 6 つの層で 57 センチの深さに達した。

試験中に採取された水は、総降水量の 50%を占めた。1990 年の 6 月には、投与の 1 週間前に記録的な豪雨があった。この月の総雨量は同じ月の平均降水量のほぼ 2 倍であったが、この望ましくない条件が放射活性の濃度を高くすることはなかった。

浸出液と土壌試料中に見つかった化合物の数と量が 2 つのライシメータの間で十分に比較された。その結果は、[¹⁴C]2,4-D とその分解産物は、実験に使用された sandy soil 中を移動せず、それによって 2,4-D が地下水に浸出する可能性がないことを示唆していた。浸出した放射活性は全体として極めて極性の高い未同定の残留物に由来していた。

転作作物による吸い上げ

Burnett and Ling (1994) は、2.2 kg ae/ha に相当する率で地面を覆うようにしたブロードキャストスプレーにより [¹⁴C]2,4-D が投与された 3 つの区画のそれぞれについて、土壌から転作作物によって吸い上げられる [¹⁴C]2,4-D 残留物の特徴と量を調べた。転作作物として、小麦、アイシクルホワイトトラディッシュ、レタスが、投与後(DAT)30 日目、そして 139DAT に作付けされた。

最初の 30DAT の間に土壌残留物は顕著に減少した。そして土壌抽出物のクロマトグラフィーによる分析は、この期間に 2,4-D の相当部分が分解されることを示唆していた。30 DAT での土壌残留物のわずか 8.7%だけがエーテルに可溶だった。一方 0 DAT では平均として 97.5%がエーテル可溶であった。0 DAT に土壌の中心から回収された放射活性は 2,4-D であることが HPLC により同定された。しかし、30 DAT では投与された放射活性のわずか 1.1%だけが、2,4-D に一次的に帰属された。

小麦を除く 30 DAT の作物における 2,4-D 等量としての TRR は、0.01 mg/kg から 0.06 mg/kg の範囲に含まれた。

全ての植物試料から 0.01 mg/kg の濃度を超過が見つかったエーテル可溶性の残留物はなかった。その一方で、2,4-D を添加したコントロールの組織においては、65%以上の放射活性がエーテル可溶性であった。全ての試料はエーテル可溶性残留物を含んでいたが、ラディッシュの地上部と小麦のわらでのみ、その濃度が 0.01 mg/kg を超えていた(30 DAT のラディッシュ地上部で 0.011 mg/kg、30 DAT の小麦のわらで 0.017 mg/kg、139 DAT の小麦のわらで 0.014 mg/kg)。

植物中の放射活性の大部分は、エーテルあるいは酸性/水/エタノールによって抽出することができなかった。結合性の残留物を加水分解すると異なる量の ^{14}C が可溶化したが、これはわずかなエーテル可溶性残留物のみからであり、0.004 mg/kg を超えることはなかった。2,4-D と加水分解産物に該当する保持時間での放射活性成分が、酸加水分解したラディッシュ地上部からのエーテル抽出物の HPLC によって、0.001 mg/kg の濃度で観察された。

30 DAT での小麦わら中で、粗リグニンとセルロースがそれぞれ 0.01 mg/kg と 0.007 mg/kg を含んでいた。両方の作付け間隔から得られた小麦穀粒は、デンプンから単離されたグルコースに取り込まれた ^{14}C を含んでいることが示された。 ^{14}C グルコースの量は、典型的な小麦穀粒におけるデンプンの量(60-70%)に一致した。

30 日の作付け間隔期間後であると、0.01 mg/kg を超えるレベルでは、遊離あるいはコンジュゲートの 2,4-D、あるいは既知の小麦代謝物に由来するエーテル可溶性の残留物はないことが示された。デンプンに含まれるグルコース中に ^{14}C が検出されたとに支持され、抽出、加水分解、そしてクロマトグラフィーによる特性解析の結果は、30 及び 139 DAT の両方で転作作物中に含まれる放射性残留物は、自然の取り込みによるものであったということを示唆した。

地表からの消失

地表からの消失試験が 2,4-D EHE(Barney, 1995a-d, j; Hatfield, 1995c-j; Silvoy, 1995a,b)を使用して 15 回、2,4-D DMA(Barney, 1995e-i; Burgener, 1993; Hatfield, 1995k-r; Silvoy, 1994a-d)を使用して 18 回行われた。それら試験の結果は、Wilson *et al.*(1997)によって要約された。

使用前に、各被験物質の特性は解析された。各作物には、ラベルの最大投与率並びに投与シーケンスで投与された。いくつかの試験では、作物を植える場所に加え、露出した土壌にも試験区域が設けられた。

1993 年に、2,4-D DMA あるいは 2,4-D EHE の市販の液剤が希釈したスプレーとして、Colorado、North Carolina、Texas (USA)で処理された。Colorado と North Carolina で行われた試験には、小麦と隣接する露出した土壌への芝のすき込みが含まれていた。一方、Texas で行われた試験には、牧草のすき込みが含まれていた。

小麦と露出土壌の区画には、5 月と 7 月に投与された 1.4 kg ae/ha が含まれていた。Colorado の土壌は、1.3 から 1.8%の有機質(OM)を含み、pH は 7.8 から 8.1(灌水に加えて総降水 32 cm から 36 cm)の sandy clay loam であった。North Carolina の砂は、0.77 から 1.4%の OM を含み、pH は 5.4 から 6.9(灌水に加えて総降水 32 cm から 36 cm)であった。North Carolina で行われた芝並びに隣接する露出度上処理並びに Texas で行われた牧草の処理には 5 月と 6 月に投与された 2.2 kg ae/ha が含まれていた。Texas の土壌は、1.5 から 1.6%の OM を含み、pH が 6.0 から 6.1 (灌水に加えて総降水 94 cm)の sandy loam から silt loam に変化した。

1994 年には、California、Nebraska、North Dakota、Ohio で試験が行われた。Nebraska と Ohio ではトウモロコシ、North Dakota では小麦、California では牧草、露出土壌、芝への計画された処理に続いて露出土壌にアミン塩とエステル両方がスプレーされた。2,4-D DMA の市販されている粒剤が North Dakota では露出土壌と芝に、2,4-D EHE の粒剤が Ohio では露出土壌と芝に投与された。

トウモロコシへの投与には、5 月に 2.2 kg ae/ha、6 月に 1.1 kg ae/ha、7 月に 0.56 kg ae/ha、9 月/10 月に 1.7 kg ae/ha を露出土壌に投与することが含まれていた。Nebraska の土壌は、2.9 から 3.5%OM を含み pH が 5.7 から 6.7 の silty loam であった。Ohio の土壌は、OM が 2.0 から 5.0%、pH が 6.5 から 7.1 の silty clay loam、clay loam、silt loam を含んでいた。灌水に加えた総降水は、47~97 cm であった。小麦への投与には、6 月と 8 月の 1.4 kg ae/ha が含まれていた。North Dakota の土壌は、OM が 2.9 から 6.4%、pH が 5.9 から 7.7 の sandy loam から loam にまたがっていた。灌水に加えた総降水は、33 から 34 cm の範囲だった。芝、牧草、隣接した露出土壌の処理は、3 月から 7 月までの間に 1 回目が、4 月から 8 月までを通じて

2 回目が、2.2 kg ae/ha で行われた。California の土壌は、OM が 0.7 から 3.9%、pH が 6.3 から 7.9 の loam から loamy sand までにまたがっていた。灌水に加えての総降水は 67 から 142 cm の範囲であった。

採用された分析法は、2,4-D に加え、2,4-D EHE、2,4-dichlorophenol、2,4-dichloroanisole を抽出し測定できるように設計されていた。後者の 2 化合物は、土壌分解試験において該当する化合物であることが示されていた。3 つの溶媒系とソニケーションの組み合わせにより、分析対象化合物は土壌試料から抽出された。抽出物は合一され、水で希釈され、C-18 固層カートリッジによって濃縮された。分析対象化合物は 2 つの溶媒系で続けて溶出され、2 つの溶出液が調製された。最初の溶出液には 2,4-D EHE、2,4-DCP、2,4-DCA が含まれており、誘導体化せずにクロマトグラフィーにかけられた。2 番目の溶出液に含まれていた 2,4-D は BF3/メタノールにより誘導体化された後ヘキサンに分配された。最初の溶出液とヘキサン溶液が合一され、GC-MS により分析された。分析法の検出限界は 0.01 mg/kg であり、0.01 mg/kg で添加した場合の回収率は 91%、10 mg/kg で添加した場合の回収率は 76%であった。

土壌中での 2,4-D の半減期($t_{1/2}$)は、試験ごとに残留データの回帰分析により計算された。検証技術は、投与が総じて標的としたレベルに近いことを示していた。土壌での半減期の値は、土壌の 0 から 15 cm の層で見つかった残留物のみを使用して計算された。残留物のレベルが一般に低く(0-15 cm の層における残留物の 0 あるいは 10%未満)また、土壌の深さに応じて分解の割合が減少することが示されていたため、より深い層が含まれることはなかった。

表 15 と 16 には、1993 年と 1994 年に行われた最大数の投与後に採取された様々な試料で見つかった 2,4-D 残留物がそれぞれ示されている。2,4-D EHE に関しては、残っていた 2,4-D EHE と 2,4-D の和を 2,4-D として示している。半減期もまた、各試験について示されている。これらの半減期は、全ての採取時期に得られた残留物データ並びに発見された最も高レベルの残留物を初期値として使用した回帰分析により決定された。半減期の値として 2 つが示されている場合は、1 つめが全ての採取時期に得られたデータから計算された値、2 つめが残留物の最大値を初期値として考慮した値である。

表 15 1993 年に実施された試験における 2,4-D の残留物と半減期。全て散布投与 (Wilson *et al.*, 1997)

¹アミン体投与の結果生じた残留物は 2,4-D であった

²エステル体投与の結果生じた残留物は、2,4-D と 2,4-D EHE であり 2,4-D として示した

³2 日間
⁴15 日間
⁵4 日間
⁶8 日間
⁷5 日間
⁸35 日間
⁹25 日間

表 16 1994 年に実施された試験における 2,4-D の残留物と半減期。散布並びに粒での投与 (Wilson *et al.*, 1997)

¹アミン体投与の結果生じた残留物は 2,4-D であった

²エステル体投与の結果生じた残留物は、2,4-D と 2,4-D EHE であり 2,4-D として示した

³29 日間
⁴58 日間
⁵20 日間
⁶30 日間
⁷62 日間

水/沈殿物システムにおける環境動態

水性の分解

Cohen (1991a) は、篩(2 mm)にかけられた非滅菌の Louisiana 稻田の沈殿物(泥)と水(320 g 沈殿物、534 g 水、総量 854 g)と、環が均質にラベルされた [¹⁴C]2,4-D を 4.6 mg/kg の濃度で混合し、好気性の水性の分解を調べた。微生物を活性化させるために、未処理の混合物は暗所 25°C の好気的な水性条件で 218 日間前もって加温され、その後、アセトニトリルに溶解させた [¹⁴C]2,4-D が加温フラスコ中で沈殿物/水の全体と混ぜられ、暗所 25°C の条件で 30 日間、好気的に加温された。形成されたいかなる揮発性の化合物も捕集溶液(エチレンジアミン、1M 硫酸、5%水酸化ナトリウム)に流し込むために、土壌は連続して湿度を保った空気により 30 mL/分の量でページされた。

試験系の試料は処理直後(0 日)並びに、処理の 2、5、12、20、27、30 日後に採取された。沈殿物/水の試料は遠心分離され、沈殿物の等量は燃焼され、LSC により ¹⁴C が測定された。残った沈殿物の試料は、1.5 M リン酸とエチルエーテルの混合溶液により抽出され、水で洗浄後、1 N の水酸化ナトリウム溶液で再抽出された。全ての抽出物の等量、上精と捕集溶液の二重試料における ¹⁴C が LSC により測定された。

UV(280 nm)と放射活性検出器を連結した HPLC により、沈殿物の抽出物と水の上精とが分析された。放射活性フロー検出には、2,4-D とその好気性分解物とを 0.01 mg/kg(検出限界は 0.005 mg/kg)で同定する性能がある。

沈殿物/水の試料の分析は、好気的な水性条件下で、2,4-D の半減期が 15 日であることを示した。

分解物である chlorohydroquinone は、当初の放射活性の 17%(0.78 mg/kg)に相当する最大濃度に 27 日目に達し、30 日目までに 11%(0.52 mg/kg)に減少した。30 日目までは、主要でない産物 2,4-dichlorophenol は当初の ^{14}C の 4.9%(0.23 mg/kg)に達し、 CO_2 は 16%(0.74 mg/kg)に達した。

試験期間中の ^{14}C の回収(土壌からの可溶並びに非可溶+水溶性+累積する揮発性物質)は、当初の放射活性の 69 から 100%の範囲であった。

Concha and Shepler(1993a)は、Illinois 州の Henry Country から得た池の沈殿物と水の試料における [^{14}C]2,4-D の好気的な水性の分解について、投与率を 5 mg/kg とし、25°C で加温することにより 46 日目まで調べた。試料採取ごとに、水層における pH(7 から 8)並びに溶存酸素量(2.7 から 6.75 mg/kg)がモニターされた。

最初の 25 日間に、[^{14}C]2,4-D はゆっくりと分解され、25 日目には投与された量の 75%未満となった。続く 10 日間には急速に減少し、46 日目には投与された量の 0.5%となった。[^{14}C]2,4-D の半減期は 4.5 日であった。

主要な分解産物は CO_2 であった(46 日目には、投与量の 64%)。水並びに沈殿物抽出物の両方から、2,4-DCP、4-CPA、4-chlorophenol が発見された。35 日目の 2,4-DCP は投与された ^{14}C の 1.1%に相当し、46 日目には 0.1%に減少した。4-CPA は 14 日目に 1.1%まで増加し、その後検出することができない量まで減少した。4-chlorophenol は 20 日後に投与量の 1.4%となり、その後 46 日目までにゼロまでゆっくりと減少した。35 日後の水層の試料中に、未知の産物が観察された(投与量の 1.1%)。この産物は凍結あるいは冷蔵条件下で不安定であり、水層を酸性とすると CO_2 並びに他の揮発性化合物に変換された。0.1%を超える揮発性有機化合物は検出されなかった。非抽出性の残留物は、投与からの時間がたつごとに増加し、46 日目では投与量の約 16%であった。

放射性炭素の回収は平均して 93±7%であった。ラグタイム(25 日間)の間、放射性炭素の大部分(64%より多い)は水に見つかり、約 10 から 14%がアルカリ性溶媒に、約 4%が酸性のアセトンに沈殿物から抽出された。ラグタイムの後は、2,4-D が分解されたため、放射性炭

素の分布は劇的に変化した。46 日目には、投与された量の 3%が水層から回収され、そのうち 1.0%と 0.6%がそれぞれアルカリ性溶媒と酸性溶媒に抽出された。全体の物質収支は、35 日目にはわずかに落ち込んだが、46 日目には増加した。この減少は、ラグピリオドの後に急速に大量の CO₂ が産生され、捕集溶液が変化しており効果的に捕集されなかったのかも知れない。独立した別の試料は 39 日間開封せずに加温されていたが、この試料での回収はより高く(92%)、このことによって、上部における CO₂ が捕集されずに揮散してしまったことが放射性炭素の損失原因であることが確認された。

図 6 好氣的な池の沈殿物/水系における 2,4-D の分解経路(Concha and Shepler,1993a)

Concha and Shepler(1994b)は、Illinois 州 Henry County の池から採取したそのままの蓄積物と水中での[¹⁴C]2,4-D の嫌氣的な水性の分解について、1 年間調べた。試料は試験を通じて 25°C で保温され、水層は pH(7.6-9.6)のために各採取時にモニターされた。

放射性炭素の回収は、平均して 101±5.2%であった。¹⁴C の分布は個別試料中で観察された分解の程度に依存して変化した。水層における放射性炭素は、投与した ¹⁴C の 24-85.5%に相当し、そのうち沈殿物の有機溶媒抽出物における量は 11-42%であった。結合性の放射性炭素は分解が進むにつれて増加し、240 日後には投与された ¹⁴C の 35%が抽出されずに残った。240 日目に採取された試料は、フミン酸中に 2.4%の、フルボ酸中に 14.9%の、¹⁴C を含んでおり、残りの 23.5%は抽出することができずに残った。泡の栓における揮発性有機物から投与量の 2.3%が測定され、腐食溶液に捕集された ¹⁴CO₂ は、365 日後には平均して 22%に達した。

図 7 嫌氣的な池の沈殿物/水系における 2,4-D の分解経路(Concha and Shepler,1993b)

水、沈殿物からの抽出物、泡の栓からの抽出物に含まれていた化合物は、HPLC あるいは二次元の TLC により同定された。365 日後には、水層における主成分は 2,4-D であり、投与量の 26%であった。沈殿物からの抽出物において、その時点で、親化合物は投与された放射性炭素の 13%を占めており、その量は、試験システムにおける 2,4-D の 39%であった。主要な 2 つの分解産物は 2,4-DCP と CO₂ であった。2,4-DCP は、30 日には 22%に増加し、引き続き 365 日後には 4.2%に減少した。いくつかの HPLC ラジオクロマトグラム上で、保持時間の異なる小さな未同定のピークが検出された。365 日後に検出された最も大きな未同定ピ

ークは、投与量の 1.5%に相当した。少量の揮発性化合物が泡の栓から抽出されており、365 日目には、4-chlorophenol(1.9%)、2,4-dichloroanisole(0.7%)、2,4-DCP(0.7%)が検出された。

2,4-D の概ねの半減期は 312 日であると計算された ($r^2=0.69$)

Fathulla(1996a)は、Wisconsin 州・Madison・Dane County (USA)の Lake Mendota から採取された代表的な沈殿物と水における、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の好氣的な水性の分解について調べた。

2 mm の篩にかけた約 3 g (乾燥重量等量)の沈殿物と 30 mL の湖水をガラス製容器に入れることで、18 個の試料が準備された。名目上濃度を 10 mg/kg として、試験する化合物は各試料に溶液として加えられた。添加後すぐに、0 日目の試料は分析された。その他の試料容器は穏やかに振とうされ、各容器の水位がマーキングされた。好氣的な条件を保ち、揮発性化合物を収集するために、試料容器がガラス容器のマニフォールドに連結され、その容器には一連の捕集容器が接続された。捕集容器は、エチレングリコール、0.1 N 硫酸、2 N KOH 2 つ分である。空気は継続的に捕集容器から吸い取られ、試験機器は暗所に保たれ、室温は 25°C に管理された。pH、酸化還元電位(Eh)、溶存酸素量(DO)は全ての試料についてモニターされ、試験中の好氣的条件の維持が確実にされた。

遠心分離により、水層と沈殿物が分けられた。水における放射活性は LSC により測定され、放射活性のある化合物は HPLC により分離された。沈殿物試料は、5% v/v 酢酸(HOAc)メタノール(MeOH)溶液によりまず抽出され、引き続き 50:50 MeOH/5% HOAc、最終的に 5%HOAc 水溶液により抽出された。3 つの抽出物は合一され、放射活性は LSC により測定され抽出物は HPLC により分析された。

放射活性の回収は、97 から 103%であり、ほとんどすべて(94 から 101%)が水層にあった。沈殿物からの抽出物における放射活性は、投与量の 3.1%を超えることはなく、平均は 0.1%を超えなかった。放射活性のある二酸化炭素は、捕集された唯一の揮発性成分であり、1 日目には投与量の 0.015%であったが、30 日目には 0.28%まで増加した。

水層と沈殿物からの抽出物における放射活性は、0 日目から 30 日目までを通して、ほぼ全てが $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ によるものであり、投与された ^{14}C に対する平均パーセンテージは、0 日目で 103%、8 日目で 97%であった。顕著な分解が観察されなかったため、半減期を計算することはできなかった。主要でない成分の 1 つだけが、唯一 30 日目の複製試料の 1 つにだけ検出されたが、その量は、放射活性の投与量の 0.1%に過ぎなかった。 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の同一性は、2 次元 TLC 並びに非標識参照標準の HPLC による共クロマトグラフィーにより確認された。

好氣的な水性の条件下では、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ は 30 日間の加温期間中に顕著に分解しなかった。 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ に加え、少量の $^{14}\text{CO}_2$ (当初の ^{14}C の 0.28%に相当)とその他 1 つだけの成分(0.1%)が 30 日目までに検出された。

Levine (1990)は、篩(2 mm)にかけられた、未滅菌の Louisiana 稲田の沈殿物(泥)と水における $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の水性の分解を 4.9 mg/kg の濃度で調べた。土壌微生物を活性化させるために、未処理の混合物は 暗所 $25\pm 0.8^\circ\text{C}$ の嫌氣的な条件で 138 日間前もって加温された。活性化期間の後、アセトニトリルに溶かした $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ が沈殿物/水の混合物全体に加温フラスコ中で混ぜられ、暗所 $25\pm 0.8^\circ\text{C}$ の条件で 365 日間、嫌氣的に加温された。生じたいかなる揮発性化合物も一連の捕集溶液(エチレングリコール、1 M 硫酸、エタノールアミン、5%水酸化ナトリウム)に押し出すため、混合物は湿らせた窒素を 45-50 mL/min の量流すことで継続的にページされた。

試験混合物の試料は、処理後直ちにまた、処理後 1、6、13、22、35、70、85、120、160、224、281、338、365 日後に採取された。沈殿物と水は遠心により分けられ、複製した沈殿物試料は、燃焼され LSC により総放射活性を分析された。加えて、複製試料は 1.5 M リン酸/エチルエーテルにより抽出され、水で洗浄され、最終的に 1 N 塩化ナトリウム溶液により再抽出された。全ての抽出物、複製された上精の水試料と捕集溶液中の ^{14}C が LSC により測定された。

水試料と沈殿物からの抽出物は UV(280 nm)検出器と放射活性フロー検出器を連結した HPLC によって分析された。放射活性フロー検出により、2,4-D とその分解産物を 0.01 mg/kg で同定することができる。TLC は同定の確認方法として使用された。

試験結果は、嫌氣的な水性条件下で 2,4-D が 41 日間の半減期をもって分解することを示していた。365 日間の加温期間中に生じる主たる産物は 4-chlorophenol であり、2-chlorophenol が主要でない産物であった。0.01 mg/kg のあるいはそれを超える濃度の ^{14}C 残留物の全てが同定された。

試験の終わりまでに、 CO_2 の産生量は、初期の放射活性(2,4-D として 3.5 mg/kg)の 71%に達した。

沈殿物試料からの ^{14}C の抽出は、各試料の採取時点で、90 から 102%の範囲にあり、総回収(沈殿物から抽出可能であったもの、抽出できなかったもの+水の上精、累積した揮発性物質)は、0 日目の放射活性の 52 から 98%の範囲にあった。回収が不完全だったのは、揮発性の $^{14}\text{CO}_2$ が失われたためである。

結果は、嫌気的な水性条件下で、2,4-D が長い間は環境中に残っていそうにないことを示していた。

Reynolds(1995b)は、 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ の嫌気性条件下で灌水した土壤中において、約 10 mg/kg の濃度の ^{14}C ラベルされた 2-ethylhexanol が急速に分解されることを示した。

上精画分中の ^{14}C のパーセンテージは、0 日目の 75% から 3 日目の 59% まで減少し、試験の残り期間では安定化するように見えた。固形画分から $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ に抽出することができた放射活性の割合は最初の 30 日間は 22 から 26% のレベルにとどまっていた。60 日目までには、初期の放射活性の 14% が $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分に見つかっており、この割合は、残りの期間、ほぼ一定のレベルで保たれた。抽出後の固形画分における ^{14}C のパーセンテージは、6.7%(3 日目)から 1.9%(179 日目)までの範囲にあったが、14 日目から 270 日目まではほぼ一定に保たれていた。

$^{14}\text{CO}_2$ を含む、放出された酸性の揮発性物質は時間とともに増加し、30 日目と 270 日目にはそれぞれ 14% と 25% に相当した。各試料採取時における KOH 溶液からのバリウム沈殿は、 $^{14}\text{CO}_2$ を除くそれ以外の揮発性物質の存在を示唆していた。 $^{14}\text{CO}_2$ は平均して、初期の放射活性の 1.1%(3 日目)から最大 9.1%(179 日目)までの範囲にあった。224 日目の KOH 試料を合一して分析した結果は、主たる成分が 2-ethylhexanol であることを示していた。

水試料と有機溶媒可溶性画分が逆相 HPLC により分析された。主たる成分は 2-ethylhexanoic acid と 2-ethylhexanol であった。

親化合物の 2-ethylhexanol は、総投与量に対して 30 日目では 22%、60 日目では 5.1% そして 270 日目には検出不可になり、急速に減少した。2-ethylhexanoic acid は 7 日目に初めて観察され(9.3%)、120 日目に 61% の最大に達し、その後一定となった。270 日目では投与した 59% が 2-ethylhexanoic acid のままであった。

$\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分中の 2-ethylhexanol に由来する放射活性は、投与した放射活性に対して、0 日目の 24% ~ 30 日目の 2% に減少し、残りの試料では 0-0.53% で検出された。主たる成分はこの場合も 2-ethylhexanoic acid であり、30 日目で 19% であった。その後わずかに減少したものの、最終の試料採取までは安定して残っていた。

その他に 4 つの主要でない産物が存在したが、投与された放射活性総量の 2.4% を超えるものはなかった。 ^{14}C の回収は、97% から 105% の範囲にあり、平均は 99% であった。

要約すると、嫌気的な条件下では、10 mg/kg の投与率で投与された ^{14}C 2-ethylhexanol は、2-ethylhexanoic acid に分解され、沈殿物/水の試験系に含まれる微生物によって $^{14}\text{CO}_2$ までさらに無機化された。2-ethylhexanol の顕著な量は、 $^{14}\text{CO}_2$ とともに、KOH 捕集溶液からも検出された。2-ethylhexanol の半減期は14日であった。

Reynolds(1995a)は、 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 暗所の試験室環境で、約10 mg/kg の dimethylamine(DMA)が好気的な水/沈殿物システムにおいて非常に急速に分解されることを立証した。推定された半減期は2.8日であった。

HPLC 並びに TLS と LSC の比較により分析された。

^{14}C の定量的な回収は、14日間の試験を通じて全ての試料から得られ、その平均は99.6%であった。

9つの分解産物が観察された。主要な産物は monomethylamine(MMA)であり、0日目には観察され投与された放射活性の総量の5.9%に相当した。時間とともに徐々に減少し、試験期間の終わりには、初期の放射活性の総量の1.2%であった。全ての試料において投与した ^{14}C の0.29%を超える量に相当する他の産物はなかった。

KOH に捕集された、放出された酸性の揮発性化合物は14日の間に劇的に増加し、平均して投与された放射活性の63%に相当した。エチレングリコールに捕集された中性の揮発性化合物は無視できる量であり、投与された ^{14}C の0.08%に相当した。KOH 溶液からのバリウム塩沈殿によって、捕集された放射活性の大部分が $^{14}\text{CO}_2$ であることが確認された。

沈殿物に結合した残留物は徐々に増加し、5日目に最大の41%に達した。これらはいくつかの技術によって放出された。0.25 N HCl による還流によって、投与した放射活性の29%に相当する量が放出されたが、これらは有機溶媒によって抽出されなかった。酸加水分解後の水層画分を benzoyl chloride の有機溶媒分配によって誘導体化すると、投与した ^{14}C の26%が抽出された。誘導体化した水層画分をクロマトグラフィーにより分析した結果、N,N-dimethylbenzamide として同定された成分の存在が明らかとなり、このことは、親化合物が土壌構成成分に結合していたことを示唆していた。

残りの結合性残留の土壌画分は、フミン酸、フルボ酸、そしてヒューミン画分のそれぞれに、投与された放射活性の3.1%、3.96%、5.1%があることを示した。

同一の実験、しかし嫌気的な水/沈殿物システムで行われた実験(Reynolds, 1995c)において、

10 mg/kg の DMA が非常にゆっくりと分解することが示された。推定された半減期は約 1610 日であった。

既出と同じ分析により、全ての試料について、 ^{14}C の定量的な回収が試験期間の 180 日を通じて得られた。平均回収は 109% であった。

水と沈殿物における総 DMA は、投与された化合物に対し、平均して 0 日目で約 99% であり、180 日目で 88% であった。8 つの分解産物が検出された。主要な分解物の一つは monomethylamine であり、0 日目にはすでに存在し、その量は投与された放射活性総量の 5.3% に相当した。その後の濃度は 14 日目の 5.5% から 90 日目の 3.2% の範囲にあり、形成あるいは減少の明確なパターンは観察されなかった。その他の 7 つの分解物中に、初期の ^{14}C の 0.63% を超える量に相当するものはなかった。

投与した ^{14}C の 2% 未満が $^{14}\text{CO}_2$ を含む酸性の揮発性化合物として放出され、KOH 溶液に捕集された。バリウム塩の沈殿により、捕集された放射活性の大部分が $^{14}\text{CO}_2$ であると確認された。

酸加水分解により投与された ^{14}C の 7% が放出され、その大部分(6.9%)が酢酸エチルによる分配の後、水層に残った。水層画分を誘導体化した後には、初期の ^{14}C の 5.9% がジクロロメタンに抽出され、抽出物の主要成分は N,N-dimethylbenzamide としての DMA であった。酸環流時に用いた KOH 捕集により、初期 ^{14}C の 0.03% が含まれることが明らかになった。このことは、還流時に揮発性化合物が生じないことを示唆している。フルボ酸(0.51%)、フミン酸(0.38%)、ヒューミン(0.87%)中に低レベルの放射活性が検出された。

Reynolds(1995d)は、灌水した沈殿物と 10 mg/kg の ^{14}C ラベルされたイソプロパノールとを $25\pm 1^\circ\text{C}$ 暗所、嫌気性の条件下で保温した。分解は急速であった。1N KOH に捕集された放出された酸性の揮発性化合物には $^{14}\text{CO}_2$ が含まれており、一定量で増加し、120 日後には、投与された ^{14}C の 65% に相当した。しかし、バリウム塩の沈殿並びに HPLC は、多くの ^{14}C 揮発性化合物がアセトンとイソプロパノールであることを示した。その他の主要でない成分も観察されたが同定されなかった。

[2- ^{14}C]イソプロパノールの半減期は 15 日であった。嫌気的な水性の試験条件下で、イソプロパノールはアセトンに分解されさらに $^{14}\text{CO}_2$ に無機化した。

Reynolds(1995f)は、同一の試験室環境下で、10 mg/kg のジエチルアミンが好気的な水/沈殿物のシステムにおいて、非常に急速に分解することを示した。推定された半減期は、10.3 日であった。LSC とともに HPLC と TLC により分析された。

親化合物とエタノールアミンに加えて、9つの分解産物が観察された。M3と記載されている主要な分解産物は、投与された放射活性の総量に対して、0日目には4.1%、7日後には8.2%を占め、試験の最後には2.1%まで減少した。いずれの試料においても、4.3%を超える化合物は、エタノールアミンも含めて無かった。

沈殿物に結合している残留物は徐々に増加し、21日目には27%に達した。14日目に得られた残留物がさらに検討された。溶媒を用いた還流によって、投与された放射活性の13%が放出されたが、それは有機溶媒可溶性ではなかった。極性残留物のクロマトグラフィー分析によって、いくつかの成分が同定されたが、ARの3%を超える残留物はなかった。

残りの結合性残留物の土壌分画により、フミン酸、フルボ酸、ヒューミンのそれぞれに投与された放射活性の総量(ARR)の3.4%、2.2%、5.5%が含まれていることが明らかになった。

対応する嫌気性システムにおいて、その他の条件を同一(Reynolds, 1996)にすると、試験期間である365日間での半減期を推定するためには、分解がゆっくりすぎた。

親化合物とエタノールアミンに加えて4つの分解産物が観察された。M1と表記された主要な分解産物は、投与された放射活性の総量に対して0日目では1.4%、14日目では6.4%であったが、365日目には、0.84%まで減少した。全ての試料において、4.7%を超える化合物は、エタノールアミンを含めても観察されなかった。

沈殿物に結合した残留物は、投与された放射活性の総量に対して、59日目では20%、91日目では9.1%に相当した。59日目に採取されたPESの酸加水分解によって、投与された¹⁴Cの14%が放出されたが、そのうち酢酸エチルに分配されたのは0.5%未満であった。水性画分のTLCは、親化合物と同一のR_f値を持つ放射活性のあるスポットがあることを示した。酸環流の間に、KOH捕集容器には投与された量の0.25%未満しか含まれないことが明らかになり、このことは、揮発性化合物が生じないことを示唆していた。投与された放射活性に対して低いレベルの活性がフルボ酸(2.75%)、フミン酸(1.4%)、ヒューミン(1.4%)に含まれていた。

365日の期間中、¹⁴Cの回収は102から110%の範囲であり、総回収の平均は105%であった。

水性圃場での消失 (Aquatic field dissipation)

1993年の6月に、灌水したMowata silt loamに植えられた稲に投与された場合の2,4D DMAとその主要な代謝物2,4-D、2,4-DCP、2,4-DCA、4-CPAA及び4-CPの消失と移動を検討するために、Louisianaにおいて試験が開始された(Barney, 1994)。2 kg ae/haの率で、1回

スプレー投与された。0日目に投与の前後で、処理区画とコントロール区画から土壌と水の試料が採取された。土壌試料は1、3、7、15、30、45、60、90、120及び180日に、水試料は1、3、7、15、30日に採取された。0日目を除いて、土壌の試料は深さ30 cmまで採取された。0日目の土壌試料は、深さ10 cmまで採取された。沈殿物が舞い上がりコンタミネーションを起こすことを避けるために、土壌試料採取の前に水試料は採取された。試料採取ごとに、それぞれ200 mLの量で3つの副試料が試験区画の異なる場所から、水については採取された。

水試料中の2,4-D、2,4-DCP、2,4-DCA、4-CPAA及び4-CPが分析された。2,4-D残留物の最高濃度(平均1.4 mg/kg)は0日目に観察され、それ以後減少し、1日目には平均して0.54 mg/kg、3日目には平均して0.19 mg/kgであった。7、15、30日目の水試料からは、LOD(0.01 mg/kg)を超える濃度の2,4-Dが検出されなかった。2,4-DCPと4-CPAAの残留は最初の3回の試料採取では検出されたが、LOD(0.01 mg/kg)未満の濃度であった。0日目には明らかに残留のあった2,4-DCPと4-CPAAは、7日目には検出不可能になった。痕跡程度の2,4-DCP、2,4-DCA、4-CPAA及び4-CPが15日目に観察された。水中での2,4-D消失の半減期は1.1日であった。30 cmの深さまで10 cmずつの層を採取した土壌試料中の2,4-D、2,4-DCP及び2,4-DCAが分析された。最も高濃度の2,4-Dの残留(0.04 mg/kg;3つの深さの総平均)は投与の1日後に観察され、3日後には0.013 mg/kgの濃度まで減少した。1日目のサンプリングでのみ、10 cmより深い部分からわずかにLOD(0.01 mg/kg)を超える濃度の2,4-D残留物が検出された。この結果は、より深い部分に残留物が移動しているというよりも、試料採取に使用した器具によるコンタミネーションであることを示唆している。分解産物(2,4-DCPと2,4-DCA)は1どもLODr(0.01 mg/kg)を超える濃度で検出されなかった。2,4-Dの土壌中での消失の半減期は1.5日と計算された。

水性の池での消失

Hatfield(1995a,b)は、North Carolina(NC)とNorth Dakota(ND)の水性環境(小さな池)において、土壌中での2,4-D DMA、2,4-D、2,4-DCP、2,4-DCA、4-CPAA及び4-CPの消失と移動について調べた。NCの土壌はBibb sandy loamであり、NDの土壌はRunaff sandy loamであった。池の副表面への注入によって、2回の投与が行われた。NCでは最初の投与が45 kg ae/haで、30日後に行われた2回目の投与が50 kg ae/haで行われた。NDでは、2回とも47 kg ae/haで31日の間隔を置いて投与が行われた。投与の前後(0日)及び、最初の投与後1、3、7、14及び21日後並びに、2回目の投与後1、3、7、14、21、30、60、90及び120日後(NDでは180日後)に土壌と水の試料が、処理区及びコントロール区から採取された。試料採取ごとに、20 cmの深さまで土壌試料が採取され、池の水の表面から90 cm(NC)あるいは120 cm(ND)の場所から水のコンポジット試料が採取された。

NCの水試料中の2,4-D残留物濃度は、0.54 mg/kg(最初の投与、0日目)から2.1 mg/kg(3日目)まで増加し、その後2回目の投与をする直前には0.86 mg/kgまで減少した。2回目の投与後0日目の2,4-Dの濃度は、2.8 mg/kgであり、21日目までには0.01 mg/kgまで減少した。それ以後の試料から、LOD(0.001 mg/kg)を超える濃度で検出されることはなかった。

水における2,4-DCP残留物の平均濃度は、0.006 mg/kg(最初の投与後7日並びに14日後、また2回目の投与日)から21日目(2回目の投与)のLODまで、変動した。試験を通じて、2,4-DCAを検出することはできなかった。4-CPAA残留物の平均濃度は、2,4-DCPと類似しており、最高濃度(0.012 mg/kg)は、2回目の投与の0日並びに1日後に観察された。低濃度の4-CPの検出が、2回目の投与後14日目(0.002 mg/kg)と30日目(0.001 mg/kg)に報告された。

水中での2,4-Dの半減期は、1回目と2回目の投与後のそれぞれについて、20日と7.6日であった。

0-5 cmの土壌/沈殿物層における2,4-D残留物の平均濃度は、1回目の投与後0、1、3、7、14日後には、1.1、1.2、1.3、1.5、0.79 mg/kgであった。21日後には、0-20 cmの深さの層を通じて、総濃度として0.33 mg/kgの2,4-Dが検出され、同じく2,4-DCPの濃度は0.22 mg/kgであった。

2回目の投与後、0-5 cmの土壌画分における2,4-D残留物の平均濃度は、0.62 mg/kg(0日目)から14日目までに0.13 mg/kgまで減少し、それ以降には検出されなくなった。低濃度の4-CPと4-CPAAが21日目(1回目の投与後)から7日目(2回目の投与後)まで検出されたことが報告されたが、土壌の深さとしては、0-5と5-10 cmのみであった。

1回目と2回目の投与について、土壌/沈殿物中での2,4-Dの半減期は、7.6日と2.0日であるとそれぞれ計算された。

NDにおいて、水中の2,4-Dの残留物濃度は、4.7 mg/kg(1回目の投与後0日)から2回目の投与の前日の1.2 mg/kgまで減少した。2回目の投与後0日目における2,4-Dの濃度は、3.1 mg/kgであり、30日目までに1.5 mg/kgに減少した。60日後に得られた試料からは、LOD(0.001 mg/kg)を超える濃度で残留物は検出されなかった。

水中の2,4-DCP残留物の平均濃度は、2回目の投与後、1、3、21日目において0.01 mg/kgであり、60日後にはLOD未満に減少した。試験を通じて2,4-DCAが検出されることはなかった。2回目の投与の0日目については、2,4-DCPに続いて4-CPAAの平均残留濃度(0.008

mg/kg)が高かった。

水中での 2,4-D の半減期は、1 回目と 2 回目の投与に対してそれぞれ 14 日と 6.5 日であった。

0-5 cm の土壌/沈殿物層における 2,4-D 残留物の平均濃度は、1 回目の投与後 0、1、3、7、14 日でそれぞれ 0.25、0.61、0.35、0.37、1.2 mg/kg であった。21 日目には、0-20 cm の深さを通じて検出された 2,4-D の濃度は、総濃度として 1.05 mg/kg であった。

2 回目の投与後、0-5 cm の画分における 2,4-D 残留物の平均濃度は、1.6 mg/kg(3 日目)から 0.016 mg/kg(180 日目)まで減少した。

低レベルの 4-CP 並びに 4-CPAA が 21 日目(1 回目の投与)の 5-10 cm の深さの層、60 日目(2 回目の投与)の 10-15 cm の深さの層からのみ検出されたことが報告された。

残留分析法

分析法

オランダの公的な分析法(Anon. 1996)は、以下の手順を基礎としている。まず塩基性の水溶液により試料から抽出する。その後 C-18 シリカカートリッジを使用した固相抽出(SPE)により溶液の濃縮と分析対象化合物の単離を行い、さらにシリカカートリッジあるいはアミノプロピルカートリッジによる精製を行う。SPE の抽出物は、内面逆相(ISRP)の基材を詰めたプレカラムと 18 結合型アルミナカラムを使ったカラムスイッチの逆相 LC に供された。分析対象化合物は、118 nm の UV で検出された。LOD は肉に対して 0.02 mg/kg、穀物と野菜に対して 0.05-0.1 mg/kg として報告されている。

作物、全般的な方法

James(1994)は、小麦、フォレージ、わら、穀粒中の残留物を分析するために使用される EN-CAS 法 No. ENC-2.93 の妥当性を確認した。

表 17 は、ABC 試験所により実施された代謝試験により得られたフォレージ、穀粒、そしてわら試料中で報告された 2,4-D の濃度(Puvanesarajah, 1992)と、同一試料を EN-CAS 法により分析して得られた 2,4-D 残留物濃度の平均を比較して示している。比較結果は、2,4-D を投与された小麦における残留物の分析に ENC-2/93 法が適していることを示している。

表 17. 小麦中の 2,4-D 分析法の比較(James, 1994; Puvanesarajah, 1992)

--	--	--	--

--	--	--	--

分析手順は以下の通りである。抽出は 0.5 M KOH を含むエタノール：水混液(1:1)を用いた振とうにより行う。振とう後にはフィルター濾過を行う。等量に対して 0.2 M HCl を加えた後、ホットプレート上で 1 時間の還流を行う。抽出物はオクタデシルシリル固層(ODS)による抽出と溶媒分配により精製する。抽出物を乾燥させた後、3 フッ化ホウ素によりメチル化し、メチルエステル誘導体を溶媒分配とそれに引き続いて行うアルミナカラムクロマトグラフィーにより精製する。¹⁴C を液体シンチレーションカウンティング(Optiphase HiSafe® scintillation cocktail with LKB 1214 RackBeta counter)により測定する。

2,4-D の残留物はメチルエステル体として、ECD を接続した GLC により定量された。シリカを充填した膜厚 0.25 μm の 15 m x 0.32 mm DB-1701 カラムが小麦穀粒とわらの分析時には使用され、膜厚 0.25 μm の 30 m x 0.32 mm DB-17 がフォレージの分析時には使用された。

上記した分析法によって、多くのフォレージ試料については良好な回収が得られ、クロマトグラフのベースラインも良好であった。ダイズ(フォレージと種子)、稲わら、サトウキビを対象とする場合には、過マンガン酸塩による酸化が追加の精製操作として必要となる。

表 18 は、添加した加工画分からの EN-CAS 法 No. ENC-2/93 による 2,4-D の回収を示している。

表 18. EN-CAS 法 No. ENC-2/93 による添加した加工画分からの 2,4-D の回収(James, 1994)

¹括弧内の数字は、70-120%の範囲から外れた回収を示した試料の数

表 19 には、圃場栽培されたトウモロコシ、牧草、コメ、ソルガム、サトウキビ及び、トウモロコシ、コメ、ソルガム、サトウキビ、小麦の加工画分のコントロール試料に添加した試料からの、2,4-D の同時回収を示している。

表 19. 添加試料からの 2,4-D の回収(Carringer, 1995a-x, Rosemond, 1995a-c)

¹括弧内の数字は、70-120%の範囲から外れた回収を示した試料の数

Centre Analytical Laboratories, Inc.により実施された EN-CAS Method No. ENC-2/93 の独立試験所による妥当性確認において(Zheng 1995)、小麦のフォレージ、わら、穀粒のコントロール試料に 0.01 mg/kg(LOD)、そして 5 あるいは 20 mg/kg の濃度で 2,4-D を添加した試料が用いられた。それら全ての試料からの回収は、平均として 94% であり、小麦フォレージの 82% から小麦のワラの 103% までの範囲にあった*5。

*5 訳注) 時々見受けられる結果の解釈ではあるが、マトリクスとアナライト濃度の違いを無視した回収(率)の取扱は、分析科学上不適切である。

柑橘類

オレンジとグレープフルーツにおける 2,4-D 残留物が、10 g の試料を 0.2 M NaOH により 1 時間還流することで抽出された(Siirila, 1995)。抽出物の等量が硫酸により酸性化され、エチルエーテルにより抽出された。2,4-D はメタノール中で三フッ化ホウ素によりメチル化された。水を加えた後に残留物はヘキサンに抽出され GC-MS により測定された。

最初の抽出に 0.7 M NaOH が使用された点を除き、同一の分析法が、レモン、レモンジュース、湿ったレモン果肉の分析に使用された。レモンモラセス、乾燥したレモン果肉、そしてレモンオイルを対象とした場合は、それぞれ 5、2、1 g の試料から 0.2、0.7、0.2 M NaOH により抽出された。

LOD は、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、レモンジュース、湿ったレモン果肉が対象の場合には 0.05 mg/kg、乾燥したレモン果肉とモラセスが対象の場合には 0.2 mg/kg、レモンオイルが対象の場合には 0.5 mg/kg であった。表 20 は、柑橘類並びに加工柑橘製品のコントロール試料に 2,4-D を添加した試料からの回収を示している。

表 20. 柑橘類とその加工画分からの 2,4-D の回収(Johnson and Strickland, 1995a-c)

¹ 括弧内の数字は、70-120% の範囲から外れた回収を示した試料の数

家畜産品

牛の筋肉に相当する部位、肝臓、腎臓、脂肪そして乳に含まれる 2,4-D 残留物を抽出し定量する手順が開発された(Howard, 1996a)。

酸性にしたアセトニトリルと組織をホモジナイズすることによって、牛の筋肉に相当する部位から 2,4-D が抽出された。ホモジネートは遠心され、フィルター濾過され、水で希釈された。分析対象化合物は、ジエチルエーテルに引き続き 0.1 % NaOH 溶液に分配された。

ロータリエバポレータにかけることで、残った有機溶媒は取り除かれた。抽出物は酸性になるよう調整後、C-8 と C-18 の固層抽出(SPE)カラムに連続して通された。分析対象化合物は *tert-butyl methyl ether*(MTBE)により溶出された。MTBE 溶出液は濃縮され、分析対象化合物はメタノール中で 3 フッ化ホウ素(BF_3/MeOH)によりメチル化された。

牛の脂肪はヘキサンを用いてホモジナイズされ、2,4-D はそこから 0.1%NaOH 溶液中に抽出された。塩基性の抽出物は酸性になるよう調整され、ジエチルエーテルにより分配された。その後の分析手順は、牛の筋肉に相当する部位について記述されたものと同じである。

牛の肝臓は、2N 塩酸を用いて 1 時間還流された。放冷した後、水層の抽出物はアセトニトリルにより希釈され、そこに塩化ナトリウムが加えられた。相が分離した後、干渉物を除くために、アセトニトリル相を手詰めしたフロリジルカラムに通過させ、溶出液を 1% NaOH 溶液を用いて希釈した後、アセトニトリルはロータリエバポレータを用いて留去された。この水層の抽出物は酸性に調整され、分析対象化合物が移行した 10%酢酸エチルを含むヘキサンには手詰めした中性アルミナカラムに通された。分析対象化合物は 10%メタノールを含む 1%NaOH の溶液により溶出され、酸性に調整された後、MTBE に分配された。MTBE 相は濃縮され、分析対象化合物は *ethereal diazomethane* 若しくは BF_3/MeOH によりメチル化された。

酸性にしたアセトニトリル中で牛の腎臓はホモジナイズされた。ホモジネートは遠心され、フィルター濾過され、その後の分析手順は、牛の肝臓について記述されたものと同じである。

2N 塩酸を加え牛の乳を酸性にした。1 時間還流した後、放冷した。放冷後の試料にアセトニトリルと塩化ナトリウムが加えられた。その後の分析手順は、牛の肝臓について記述されたものと同じである。

GLC conditions:

Instrument:	HP 5890
Column:	60 m, J&W DB-1, 0.32 mm, 5 μm film
Injector temperature:	250°C
Carrier:	Helium at 2 mL/min
Detector:	ECD at 325°C
Detector make-up:	Nitrogen at 58 mL/min
Column temperature programme	220°C, 5 min, 2°C/min 230°C, 30 or 40 min, 40°C/min 300°C, 10 or 15 min

Injector volume:	4 µL splitless
Retention time:	Approximately 28 to 30 minutes

LOD は、牛の筋肉に相当する部位、牛の肝臓、腎臓、脂肪に対して 0.05 mg/kg、牛の乳に対して 0.01 mg/kg であった。

家禽の筋肉に相当する部位、肝臓、脂肪そして卵中の 2,4-D を抽出し定量するための手順が開発され妥当性確認された(Howard, 1996b)。

牛の筋肉に相当する部位と脂肪について記述された手順によって家禽の筋肉に相当する部位と脂肪から 2,4-D 残留物が抽出された。

酸性にしたアセトニトリルを用いてホモジナイズすることで、卵から 2,4-D の残留物が抽出された。ホモジネートは遠心され、フィルター濾過され、干渉物を除くために手詰めのフロリジルカラムを通過された。溶出液は 1% NaOH 溶液により希釈され、ロータリエバポレータによってアセトニトリルが留去された。水層の抽出物は酸性にされ、分析対象化合物は 10% 酢酸エチルを含むヘキサンに分配された。有機層は分離され、手詰めの中性アルミナカラムに通された。分析対象化合物は、10%メタノールを含む 1%NaOH 溶液により溶出され、溶出液は酸性に調整された後、MTBE に分配された。MTBE 相は濃縮され、分析対象化合物は BF₃/MeHO 溶液によりメチル化された。反応後の溶液に水が加えられ、2,4-D のメチルエステルは GLC による測定のためにヘキサンに分配された。

家禽の肝臓は、1 時間、2N HCl により還流された。放冷後、アセトニトリルと NaCl が加水分解物に加えられ、アセトニトリル相が除かれ、手詰めのフロリジルカラムに通された。その後の分析手順は、卵について記載された内容と同じである。

GLC の条件は、牛とその乳の場合と同一である。

LOD は、家禽類の筋肉に相当する部位、脂肪、肝臓については 0.05 mg/kg、卵については 0.01 mg/kg であった。

土壌、水、沈殿物

2,4-D EHE(適用可能な場合)、2,4-D、2,4-DCP 並びに 2,4-DCA を対象として土壌試料が分析された(Hatfield, 1995r)。5%酢酸を含むメタノール、5%酢酸を含む 50%メタノール/水混液、最終的には 5%酢酸を含む水を用いて、連続的にソニケーションすることで、上記分析対象の残留物が抽出された。抽出物は合一後、水により希釈、酸性に調整され、C-18 SPE カートリッジを用いて濃縮された。カートリッジからは、2%アセトンを含むヘキサン、それに引き続き 20%メタノールを含むヘキサンによって溶出された。最初の溶出液には、もし

そこに残留物がある場合には、2,4-DCP、2,4-DCA、2,4-DEHE が含まれた。2 番目の溶出液には、2,4-D が含まれており、濃縮され、BF₃/メタノールによりメチル化され、石油エーテルに分配され、その後、最初の(誘導体化されていない)溶出液と合一された。合一された溶液はヘキサン中において濃縮された後、質量分析計を接続した GC により分析された。LOD は 0.01 mg/kg であった。

GC-MSD conditions

Instrumentation:	Hewlett-Packard model 5890 Series II gas chromatograph/model 5971A mass selective detector
Column:	Durabond-1 (DB-1), 15 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm with DF film
Pre-column:	Stabilwax, 1 m x 0.25 mm i.d., with 0.25 µm DF film
Oven temperature:	Hold at 60° for 2 minutes, then 60-150°C at 10°C/minute, then 150-200°C at 45°C/minute, then 200-240°C at 10°C/minute, then hold at 240°C for 2 minutes
Injector temperature:	250°C
Transfer line temperature:	280°C
Carrier gas:	Helium
Carrier gas flow rate:	~40-60 cm/second (internal flow sensor)
Head pressure:	5 psi
Injection mode:	Splitless
Injection liner:	Silanized dual taper
Injector purge delay:	1.5 minutes
Septum purge:	~7.5 ml/minute
Injection volume:	2 µl
Ionization potential:	70 eV
Electron multiplier voltage:	1400-1900 V (typical)
Dwell time:	50-200 msec

水が試料となる場合、抽出、C-18 カラムを用いた濃縮、またそこからの溶出は、土壌を対象とした手順と同一であった(Hatfield 1995b)。2,4-D、2,4-DCP、2,4-DCA、4-CPA、4-CP を対象として水試料が分析された。水の場合、最初の溶出液には 2,4-D、2,4-DCA 及び 4-CP が含まれ、2 番目の溶出液には 2,4-D と 4-CPA が含まれていた。土壌を対象とする場合と同様に分析は行われ、GC-MS の条件も同一であった。LOD は 0.001 mg/kg であった。

2,4-D、2,4-DCP、2,4-DCA、4-CP、4-CPA を対象として沈殿物試料が分析された(Hatfield, 1995b)。土壌試料と同様の溶媒を用いて、10 g の試料がボルテックスされソニケートされた。

各抽出後、抽出物はデカントされフィルター濾過された。その後合一され、既知の量に定容された。2,4-D とそれに由来する化合物は、分取された等量の液-液分配により画分とされた。残留物は、質量分析計を接続した GC により測定された。分析対象化合物の全てについて、LOD は 0.01 mg/kg であった。

GC-MS conditions:

Instrumentation:	Hewlett-Packard model 5890 Series II gas chromatograph/model 5972 mass selective detector
Column:	HP-5MS, 0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 µm film thickness
Oven temperature:	Hold at 50°C for 1 minutes, then 50-100°C at 5°C/minute, then 100-260°C at 10°C/minute then hold 5 minutes
Injector temperature:	240°C
Transfer line temperature:	280°C
Carrier gas:	Helium
Carrier gas flow rate:	1 ml/minute
Head pressure:	12 psi
Injection mode:	Splitless
Injection liner:	Silanized single taper
Injector purge delay:	1.5 minutes
Septum purge:	50 ml/minute
Injection volume:	2 µl
Ionization potential:	70 eV
Electron multiplier voltage:	1400-1900 V (typical)
Dwell time:	100 msec

保存した分析用試料における農薬残留物の安定性

冷凍保管した 1 年間(作物残留試験において採取された試料の最長保管期間)における、生の農産品(トウモロコシの穀粒、フォレージ、フォダー、ソルガムの穀粒、小麦の穀粒、フォレージ、わら、サトウキビ、コメの穀粒、牧草とそのヘイ、ダイズの種子)並びに加工画分(トウモロコシデンプン、トウモロコシ粉、未精製油、小麦粉、砂糖、モラセス、バガス、米ぬか、粃殻)中での 2,4-D 残留物の安定性が試験された(Barker, 1995)。結果は表 21 並びに表 22 に示してある。凍結保存中の温度は毎日モニターされ、-12°C から -27°C であった。添加濃度は 0.1 から 5 mg/kg の範囲であった。0 日目の試料を除き、保存された試料の分析結果は、回収が 100% を下回った場合には、操作回収の結果によって補正された。保存された試料と同時に分析された、0.1~5 mg/kg の濃度で添加をした試料の操作回収は、総平均と標準偏差として表すと 89±10%(n=232)^{*6} であった。

*6 訳注)原文のままだが、分析結果の解析の点から言えば、一般には異なる濃度に対して得られた回収(率)を一群と見なすことは不適であり、そもそも、想定される母集団のない回収(率)に対して平均や標準偏差を求めることも不適である。

表 21. 生の農産品における 2,4-D 残留物の保存安定性(Barker, 1995)

表 22. 加工農産品における、投与に起因する 2,4-D 残留物の保存安定性(Barker, 1995)

添加したグレープフルーツ、レモン、レモン加工品を使用し、-20℃未満の条件で保存した場合の 2,4-D の保存安定性が試験された(Johnson and Strickland, 1995c)。

表 23. 柑橘系農産品における 2,4-D 残留物の保存安定性(Johnson and Strickland, 1995c)

¹ 同時に実施した操作回収の平均に対して補正されている

その他の作物中での 2,4-D の安定性は、表 24 に示されている。

表 24. その他の添加作物における 2,4-D の凍結保存安定性

¹ 同時に実施した操作回収に対して補正されている。アスパラガスについては 89-117%、チェリーについては 75%、モモについては 77%、ピスタチオについては 93%、プラムについては 83%、プルーンについては 79%、グレープについては 77%、グレープジュースについては 87%、レーズンについては 69%。

² 作物残留試験(1992)におけるコントロール試料に添加した試料を用いた保存安定性試験

³ 作物残留試験(1994)におけるコントロール試料に添加した試料を用いた保存安定性試験

⁴ 除去された殻とともに

保存されたアスパラガスの添加試料では、約 20 ヶ月の間に、2,4-D の量に平均して 46% の減少が見られた。これらのアスパラガス試料の分析は、保存期間中 1 回行われたのみであり、-20℃の条件ではその他の農産品中での 2,4-D 残留物が安定であったことから、この減

少が実際に起こった 2,4-D の分解を反映したものか、あるいは操作上の誤りをあらわしたものかはっきりとしない。

牛の肝臓、腎臓、筋肉に相当する部位、脂肪、乳中での 2,4-D の保存安定性が試験された (Krautter and Downs, 1996)。ホモジナイズされた組織並びに乳に 2,4-D が添加され、添加した日、凍結条件下で約 2 並びに 4 ヶ月間保存した後に分析された。

調製したての肝臓、腎臓、筋肉に相当する部位、脂肪そして乳試料からの 2,4-D の平均回収は、それぞれ 99、71、111、85 及び 71% であった。保存試料の結果は、同時に得られた操作回収によって補正された。肝臓、腎臓、筋肉に相当する部位、脂肪、乳からの平均補正回収は、2 ヶ月後に 115、112、106、112、81% であり、4 ヶ月後に 107、124、110、117、109% であった。これらの結果は、凍結保存された少なくとも 4 ヶ月間は、分析された牛の产品中で 2,4-D が安定であることを示していた。

使用基準

酸、塩あるいはエステルとしての 2,4-D は、選択性のあるホルモンのフェノキシ除草剤である。2,4-D は容易に葉や根から吸収され、成長の異常と植物体のネクロシスを引き起こす。2,4-D を含む植物保護製品は、幅広の葉を持つ雑草の出芽後管理のために、葉面投与される除草剤として使用される。登録されている使用基準を表 25 に示す。

表 25. 2,4-D の登録された使用。投与率は酸等量(kg ae/ha あるいは ae/hL)として表してある

¹ リンゴを対象に 2,4-D と混合して使用されるその他の除草剤:benazolin、dicamba、MCPA、mecoprop

² 投与後 7 日目以内に、農薬を投与した場所に、搾乳用家畜を放牧することは認められていない。投与後 30 日以内に、カットしたヘイをフォレージにまとめることは認められていない。投与した場所で育てた肉用家畜は、と殺前に最低 3 日間、休ませる。

³ 提案されている使用

⁴ 投与の 1 週間以内には、牛を再侵入させない

⁵ グラスを対象に 2,4-D と混合して使用されるその他の除草剤:benazolin、dicamba、MCPA、mecoprop

⁶ 洋なしとプラム(樹齢 2 年以上)を対象に 2,4-D と混合して使用されるその他の除草剤:dicamba、mecoprop

⁷ 保留

⁸ 小麦を対象に 2,4-D と混合して使用されるその他の除草剤:benazolin、dicamba、MCPA

作物残留試験の結果

作物残留試験の結果を表 26 から 53 に示す。全ての試験はアメリカにおいて実施された。

表 26. グレープフルーツ	表 50. ダイズフォレージ
表 27. オレンジ	表 51. ダイズヘイ
表 28. レモン	表 52. ダイズ種子
表 29. 仁果類果実	表 53. 牧草、フォレージ、ヘイ
表 30. 核果類果実	
表 31. ベリー類	
表 31. スイートコーン	
表 33. ジャガイモ	
表 34. アスパラガス	
表 35. トウモロコシフォレージ	
表 36. トウモロコシフォダー	
表 37. トウモロコシ穀粒	
表 38. コメ穀粒	
表 39. 稲わら	
表 40. ワイルドライス	
表 41. ソルガム穀粒	
表 42. ソルガムフォレージ	
表 43. ソルガムフォダー	
表 44. 小麦フォレージ	
表 45. 小麦穀粒	
表 46. 小麦わら	
表 47. サトウキビフォレージ	
表 48. サトウキビ	
表 49. 種実類	

残留物の濃度、投与率、スプレーの濃度は通常有効数字 2 桁に丸めている。0.1 mg/kg を下回った残留物濃度は 1 桁に丸めている。コントロール試料中で残留物濃度が定量可能であった場合にのみ、表には記録している。同一の試験について複数の数値が示されている場合、それらは複製試料から得られたものである。下線の引かれた残留物濃度が、最大残留濃度の推定並びに/あるいは STMRs の推定に使用された。

柑橘類への投与

アメリカにおいて2,4-Dは、(1)成熟果実の落下を減らすため、(2)果実を大きくするため、(3)農薬散布後の葉並びに果実の落下を減らすため、(4)収穫済み果実(レモン)からのボタン離脱を防ぐための成長調整剤として登録されている。

(1)~(3)が目的の場合には、収穫前に、希釈液のスプレーが果樹に投与される。これに対して(4)が目的の場合には、集荷・選果場において水-ワックス混和液中に浸すあるいは希釈液をフラッシュまたはスプレーするポストハーベスト投与が行われる。使用目的が(1)~(3)の場合については、グレープフルーツとオレンジを用いて(表 26 並びに表 27)、(4)の場合にはレモンを用いて(表 28)、作物残留試験が行われた。

グレープフルーツ cGAPはアメリカのものであった：1 x 2.4 g ae/hl, PHI 7 日。California 州 Riverside County の2つの圃場(site)において、グレープフルーツを対象とした2,4-D IPEのブロードキャストスプレーによる投与が3回行われた。最初の投与は、7月初旬に、未成熟の(1994)そして成熟した(1995)果実を实らせた果樹に対して、約2.4 g ae/hLの濃度で行われた。2回目の投与は、約3ヶ月後に0.4 g ae/hLの率のスプレーオイル(1.25% v/v)として未成熟の果実を实らせた果樹に対して行われた。最後の投与は、さらに9ヶ月後に、2.3 g ae/hLの濃度で地表に向けて行われた(Johnson and Strickland, 1995a)。

最初の投与後、PHIが0と7日目のタイミングで、成熟した果実の投与された試料とコントロール試料が3つずつそれぞれの圃場で採取された(1994)。2回目の投与後、未成熟の投与された試料3つがそれぞれの圃場においてスプレー後PHIが0日のタイミングで採取され乾かされた。最終投与後、PHIが0日と7日のタイミングで、成熟した果実の投与された試料3つが各圃場において採取された。各試料のセットのうち2つの試料における残留物が分析された。グレープフルーツにおける2,4-DのLODは、0.05 mg/kgであった。

表 26. California 州 Riverside County で行われた作物残留試験における、グレープフルーツ中の2,4-D 残留物(Johnson and Strickland, 1995a)

オレンジ cGAPはアメリカのものであった：1 x 2.4 g ae/hL、PHI 7 日。ネーブルオレンジを対象とした4回の作物残留試験が、California 州で行われた。オレンジには、2,4-D IPE 単独あるいは水和石灰溶液に溶かした2,4-D IPEが地表噴霧器を使って投与された。圃場ごとに2回の試験が実施された。

表 27. California 州で行われた作物残留試験における、ネーブルオレンジ中での 2,4-D 残留物 (Johnson and Strickland, 1995a)

レモン cGAP はアメリカのものであった：ポストハーベスト時の使用として 1 x 0.05 kg ae/hL。レモンの果樹には、2,4-D IPE が 1.2-1.3 g ae/hL(約 56 g ae/h)の率で収穫前に 1 回投与されていた。レモンは投与前、投与後 0 日(投与後の果実は乾かされた)並びに 7 日目に採取された。

7 日目には、収穫前に処理された“明るい緑色”のレモンが、GAP に従い、50 g ae/hL を含む市販の保存上ワックスを用いて、水-ワックス乳剤により処理された。試料は乾かした後、投与したその日に採取され、そのうちのいくつかは 5.6-16°C で保管され、ポストハーベスト処理後の 28、56、112 日目に、分析のために取り出された。

表 28. California 州で行われた作物残留試験における、レモン中での 2,4-D 残留物 (Johnson and Strickland, 1995a)

WHP: 保留期間(ポストハーベスト処理と試料採取の間の期間)

果実を対象とした除草剤としての使用

果樹園の地面に向けて 2,4-D は投与された。作物残留試験は、リンゴ並びに洋梨(表 29)、チェリー、モモ並びにプラム(表 30)、ベリー類(表 31)を対象に行われた。投与方法は全てブロードキャストスプレーであった。

仁果類の果実 cGAP はアメリカのものであった: 2 x 2.2 kg ae/ha、PHI 14 日。2 回投与するうちの 2 回目の投与後 14 日目に収穫されたリンゴにおける 2,4-D の残留物濃度を定めるために、アメリカの 4 つの州で 5 回の試験が行われた。5 回の試験のうち、4 回の試験においては、2,4-D DMA が 2.2 kg ae/ha の率で、69 から 110 日の間隔をおいて 2 度、ブロードキャストスプレーとして投与された。New York で行われた残り 1 つの試験では、11 kg ae/ha の率で過剰投与されたことを除き、上記と同様のやり方で 2,4-D が投与された。この試験で採取された試料は、対応する加工試験において使用された (barney and Kunkel, 1995b)。

2 回投与するうちの 2 回目の投与後約 14 日目に収穫された洋なしにおける 2,4-D の残留物濃度を定めるために、アメリカの 4 つの州で 6 回の試験が行われた。この試験では、28 から 75 日の間隔を置いて 2,4-D DMA が 2.2-2.7 kg ae/ha の率で投与されており、季節当たり

の投与率は 4.5 kg ae/ha である(Kunkel, 1995b)。

2,4-D に対する LOD は 0.01 mg/kg であった。

表 29.リンゴ並びに洋梨中での 2,4-D 残留物

核果類の果実 cGAP はアメリカのものであった: 2 x 1.6 kg ae/ha、PHI 14 日。アメリカの 3 つの州において、チェリー、モモ、プラムのそれぞれを対象に 3 回の試験が行われた。2,4-D DMA が 1.6 kg ae/ha の率で 2 回投与され、投与の間隔は 7 から 28 日(チェリー)、35 から 78 日(モモ)、77 から 93 日(プラム)であった(Barney and Kunkel, 1995c,d,f)。

2 回目の投与後 12 から 14 日目に試料は採取された。コントロール試料また投与された試料中の残留物濃度は LOD を下回った(<0.05 mg/kg チェリー、<0.01 mg/kg モモ、プラム)。

新鮮なプラムを対象とした追加試験が Idaho において行われた。この試験では、2,4-D が 6.4 kg ae/ha の率で 2 回直接投与された。4 倍量を投与された新鮮なプラムは、乾燥プルーンに加工された。

表 30.チェリー、モモ、プラム並びにプルーン中での 2,4-D 残留物

ベリー類 cGAP はアメリカのものであった: 2 x 1.6 kg ae/ha、PHI 30 日。低木性のブルーベリーを対象に行われた 1 回の試験では、2,4-D DMA が 4.5 g ae/L の水を含む溶液として、作物の上部まで生育する木本性の雑草を拭き落とししている布に覆われたスティックに対して、夏の間 1 回投与された。2 回目の試験では、12 g ae/L のオイルを含む混合液が、木本性雑草の茎の切り口に秋の間に投与された。ブルーベリーは投与後その年のうちに通常の成熟度になった時点で収穫された(ワイプ投与の 55 週間後、切り口投与の 41 週間後)。投与した雑草に隣接した果樹からブルーベリーは採取された。全ての残留物濃度は LOD(0.05 mg/kg) 未満であった(Kunkel, 1995b)。

2,4-D は 1.6 と 3.1 kg ae/ha の投与率で 2 回、高木性ブルーベリーの畝の midpoint に対して投与されもした。最初の投与は、前年の作物の収穫後に行われ、2 回目の投与は収穫の約 30 日前に当たる春になるのを待って行われた。スプレーが樹冠や果実にかからないように注意が払われた。2,4-D 残留物濃度が LOD(0.01 mg/kg)を下回る場合も超える場合もあった(Kunkel, 1997b)。

クランベリー cGAPはアメリカのものであった:2 x 4.5 kg ae/ha、PHI は決められていなかった。クランベリーを対象とする2つの作物残留試験が実施された。それぞれの作物残留試験において、春には休眠状態の植物に対して4.5 kg ae/haの率でブロードキャストによる投与が、さらに夏には、クランベリーを覆うようにして成長した雑草を対象に直接拭き取りする投与が2回行われた。最終投与の30日後にクランベリーは収穫された。残留物の濃度は0.02未満から0.11 mg/kgの範囲にあった(Barney and Kunkel, 1995a)。

グレープ cGAP: 1 x 1.6 kg ae/ha、PHI は100日。Californiaにおいて、グレープとその加工産品を対象とした2つの作物残留試験が行われた。収穫の約100日前に、ブドウ園の地面に向けて、1.6 kg ae/haの率で2,4-Dが1回投与された。採取されたグレープの一部はレーズンとジュースに加工された。すべての残留物はLOD(0.05 mg/kg)を下回っていた(Kunkel, 1996b)。

ラズベリー Critical GAP: 2 x 3.1 kg ae/ha、PHI は24日。2,4-Dは、1.6と3.1 kg ae/haの率で、ラズベリーの樹木から離れた畝の中心に向けて直接スプレーにより2回投与された。2回目の投与は、収穫の24日前に行われた。2,4-D残留物のすべてはLOD(0.05 mg/kg)未満の濃度であった(Baron, 1988)

ストロベリー Critical GAP: 1 x 1.7 kg ae/ha、PHI は決められていなかった(休眠中の植物に投与することが決められていた)。収穫の59日から129日までの間に、1.7 kg ae/haの率で1回、ブロードキャストスプレーにより1回投与された。この投与期間は、その地域における生産活動における通常の変動を代表している。この使用方法は、多年生のストロベリーの生育に必要なものである。2,4-D残留物のすべてはLOD(0.05 mg/kg)未満の濃度であった(Kunkel, 1995e)。

表 31.ブルーベリー、クランベリー、グレープ、ラズベリー並びにストロベリー中での2,4-D残留物

¹ 植物体を避けるための方向を定めた投与

² 拭き取り投与(溶液中濃度は4.5 g ae/L)

³ 硬木断面にむけ方向を定めたスプレー(12 g ae/Lの濃度のオイルとの混合液)

⁴ 最初の投与は顆粒、それに引き続き植物体を越えた雑草への2回の拭き取り投与

⁵ 収穫前後で投与が行われた

野菜を対象とした除草剤としての使用

野菜については、雑草管理のために 2,4-D が地面に向けて投与された。スイートコーン (Table 32)、ジャガイモ (Table 33)、アスパラガス (Table 34) を対象とした作物残留試験が実施された。

スイートコーン cGAP はアメリカのものであった: $1 \times 1.1 + 1 \times 0.56 \text{ kg ae/ha}$ 。作物残留試験は、アメリカの 9 つの州で行われた。作物残留試験の目的は、2 回の 2,4-D 投与のうち、2 回目の投与の 22-48 日後に収穫されたスイートコーンにおける残留を明らかにすること及び、アミンとエステル剤型による比較を行うことであった。2 つの剤型ともに、1 回目の投与は出芽前に 1.1 kg ae/ha の率でブロードキャストによりおこなわれた。その 33-50 日後の出穂するまえに 0.56 kg ae/ha の率で 2 回目の直接投与が行われた。この時、植物体は 40-50 cm の大きさだった。軸(鞘を除いた粒と軸)における 2,4-D 残留物の LOD は 0.05 mg/kg であった (Kunkel, 1995c)。

表 32. スイートコーン中での 2,4-D 残留物。鞘を除いた粒と軸が分析された。剤型は DMA と EHE。出芽前と出穂直後の 2 回投与。

ジャガイモ cGAP はアメリカのものであった: $2 \times 0.078 \text{ kg ae/ha}$ 。アメリカの 7 つの州で、 0.078 kg ae/ha の率で 9-13 日の間隔を置いて 2 回葉面投与した後の、赤ジャガイモへの 2,4-D の残留物濃度を測定するために、8 回の作物残留試験が行われた。異なる州で行われた 7 つの作物残留試験で使用された 2,4-D の剤型はアミン塩であり、残り 8 番目の作物残留試験で使用された剤型はエステルであった。追加された 2 つの作物残留試験では、アミンとエステル剤が上記の通り投与された。ただし、投与率には過剰となる 0.36 g ae/ha が採用された。ジャガイモは、2 回目の投与後に採取された。投与の 24-67 日後の、市販可能な大きさになってすぐのタイミングである。異なる作物残留試験において集められた試料は、異なる方法によって分析されたが、個々の作物残留試験から得られた繰り返し分析の結果は、3 つの GLC-ECD 法で類似の分析結果が得られることを示唆していた (Barney and Kunkel, 1995g)。

0.078 kg ae/ha の投与率で二回目の投与が行われた 24-67 日後に集められた、30 個のジャガイモ試料における残留物の濃度は、 $0.05-0.13 \text{ mg/kg}$ 未満であった。また、 0.36 kg ae/ha の率で二回目の投与が行われた 50 日後に集められた 8 つの試料における残留物の濃度は、 $0.05-0.08 \text{ mg/kg}$ 未満であった。PHI が最短 (24 日) の時に残留濃度は最大 ($0.07-0.13 \text{ mg/kg}$) となったが、PHI が最長 (67 日) の場合でも残留物の定量が可能であった ($0.05-0.08 \text{ mg/kg}$)。アミンとエステルという剤型の違いによって、残留物の濃度が明らかに異なることはなかつ

た。

表 33. 芽が出る前に投与されたジャガイモ中の 2,4-D 残留物。剤型は DMA と EHE。出芽前と出穂直後の 2 回投与。

アスパラガス cGAP はアメリカのものであった: 2 x 2.2 kg ae/ha、PHI は 3 日。1992 年中にそして再び 1994 年に、アメリカの Washington と Michigan で 2 回の作物残留試験が行われた。29 から 31 日の間隔を置いて、2.2 kg ae/ha の率で 2,4-D の DMA 塩が出芽後 2 回、ブロードキャストスプレーにより投与された。1992 年の作物残留試験においては、2 回目を投与した 24 時間後に試料が集められた。1994 年に Washington で行われた作物残留試験では、24、48、72 時間後に試料が集められた。これに対し、Michigan で行われた試験では、気温が低かったために 72 時間後のみに試料が集められた。LOD は 0.05 mg/kg であった。

1992 年に行われた作物残留試験では、明確な 2,4-D 残留物が認められており、Michigan の試料からは 10-15 mg/kg、Washington の試料からは 4.8-5.3 mg/kg の濃度で検出された。圃場から集められた農薬が投与された試料と一緒に保存されていた添加コントロール試料を分析した結果から、約 20 ヶ月保存しておいた間に平均して 46%まで残留物が減少しているかも知れないことが示唆されているために、実際の残留濃度はもっと高かったかもしれない。

1994 年の作物残留試験では、24 時間後に集められた 2 つの試料における濃度は 2.3 mg/kg と 2.8 mg/kg、48 時間後の試料における濃度は、1.1 mg/kg と 0.97 mg/kg であった。72 時間後までに、Washington の試料における濃度は 0.09 mg/kg と 0.1 mg/kg、Michigan における試料の濃度は 3 mg/kg になった。1994 年の試料はサンプリングの後 34 日以内に分析されたため、分析結果を支持するための凍結保存安定性のデータは要求されない(Kunkel, 1995a)

表 34. アスパラガス中の 2,4-D 残留物。茎が分析された。

穀類を対象とした除草剤としての使用

2,4-D は、冬並びに夏穀物を対象とした出芽前、出芽後、そして収穫前投与によって全世界で使用されている。Table 35-46 に残留データを要約した。

トウモロコシ cGAP はアメリカのものであった: 1.1 + 0.56 + 1.7 kg ae/ha、PHI は 7 日。2,4-

DDMA 塩と 2-EHE を用いて、アメリカにおいて、7つの隣り合った区域を使用して作物残留試験が実施された。総量として約 3.4 kg ae/ha/season となるように、それぞれの試験では 2 回あるいは 3 回投与がされた。これらの投与には、約 1.1 kg/ae/ha の率での出芽前投与、0.56 kg ae/ha (1 度だけ 1.1 kg ae/ha であったことを除く)の率での出芽後投与(その時にトウモロコシは 25-41 cm の高さ)、そして通常の作物の成熟度になる 14 日前に 1.7 kg ae/ha で行った収穫前投与が含まれる。同一の使用方法に従い、2,4-D を使用した同時追加試験が 2 件行われた。地上設備を使用して投与行われた。1 回目と 2 回目の投与の間隔は 30-48 日間、2 回目と 3 回目の投与の間隔は 83-113 日間であった(Carringer、1995d、e、f)。

フォレージ試料は、2 回目を投与した 7 日後に集められ、サイレージ試料は、2 回目を投与した(1.7-2.3 kg ae/ha で総量投与)約 54-89 日後の dough-dent 期に集められた。穀粒とフォダー試料は、3 回目を投与した 7 日後(1 試験では 9 日後)と 14 日後に集められた。

表 35. トウモロコシフォレージとサイレージ中の 2,4-D 残留物。

表 36. トウモロコシフォダー中の 2,4-D 残留物。

表 37. トウモロコシ穀粒中の 2,4-D 残留物。

コメ cGAP はアメリカのものであった: 1 x 1.7 kg ae/ha、PHI は 60 日。10 件の作物残留試験が行われた。そのうち、4 つの州のそれぞれで 2 回行われた試験では DMA 塩が用いられる、2 つの州でそれぞれ 1 回行われた試験では遊離酸が用いられた。それぞれの試験において、第一節の前の分けつ期に、1.6-1.8 kg ae/ha の率で出芽後ブロードキャスト投与が行われた(Carringer、1995p、q)。

穀粒(籾なし)とワラの試料は、通常の作物の成熟時期、投与の 61-104 日後に集められた。LODs は 0.01 mg/kg であった。CA で行われた試験で得られた穀粒とワラのコントロール試料からは、穀粒について 0.11-0.13 mg/kg の濃度、ワラについて 0.03-0.04 mg/kg の濃度で検出されており、明らかに隣接した区画に 2,4-D をスプレーしたことを原因とするコンタミネーションがあった。農薬を投与した試料における残留物の濃度は、コントロール試料におけ

る明らかな残留によって補正されなかった。残留物濃度は、穀粒において<0.01-0.49 mg/kg、ワラにおいて 0.06-8.8 mg/kg であった。LA2 の試験で見られた高残留濃度は、試験地を取り巻く道端にスプレーした 2,4-D からのドリフトが原因かも知れない。

表 38. コメ穀粒中の 2,4-D 残留物。

¹ 試験地を取り巻く道端に 2,4-D をスプレーしたことにより起こったドリフトの結果。外れ値

表 39. 稲わら中の 2,4-D 残留物。

ワイルドライス cGAP はアメリカのものであった: 1 x 0.28 kg ae/ha、PHI は 60 日。DMA 塩を 0.56 kg ae/ha の率で投与する単回試験が実施された。各試験区から 53 日後に 3 つの試料、64 日後に 1 つの試料が集められた。穂先を切って試料は収穫し、脱穀して穀粒と籾殻を分けた。穀粒と籾殻のいずれからも 2,4-D は検出されなかった。LOD は 0.05 mg/kg (Kunkel、1995f)。

表 40. DMA 塩を投与したワイルドライス中の 2,4-D 残留物。

ソルガム cGAP はアメリカのものであった: 1 x 0.56 kg ae/ha (エステル)、1 x 1.1 kg ae/ha (その他の剤型)、フォレージ用の PHI は 30 日。アメリカの 4 つの州のそれぞれで行われた独立した作物残留試験において、EHE の場合には 0.56 kg ae/ha の率で、DMA 塩の場合には 1.1 kg ae/ha の率で、出穂後に単回の直接投与が行われた。全ての投与は、植物体が 20-25 cm の高さになったときに、地上設備を使用して行われた。投与の 26-31 日後にフォレージ試料は集められ、穀粒とフォダー試料は、投与後 82-112 日後の成熟期に集められた(Carringer、1995g、h、i)。

全ての試料について LOD は 0.01 mg/kg であった。2,4-D 濃度は、フォレージ試料において<0.01-0.14 mg/kg、穀粒試料において<0.01-0.01 mg/kg、フォダー試料において<0.01- 0.04 mg/kg であった。ほぼ全ての試験において、コントロールとなる穀粒とフォダー試料における残留物の濃度が、農薬を投与した区画から得られた試料における濃度と同程度の高さあ

るいはより高かったことから、これら試験結果が妥当ではないことが示唆される。

表 41. ソルガム穀粒中の 2,4-D 残留物。

表 42. ソルガムフォレージ中の 2,4-D 残留物。

表 43. ソルガムフォダー中の 2,4-D 残留物。

小麦 cGAP はアメリカのものであった: 1 x 1.4 + 1 x 0.56 kg ae/ha、PHI は 14 日。1993 年に、小麦のフォレージ、穀粒、ワラにおける 2,4-D 残留物を測定するために、アメリカの 7 つの州で 19 の作物残留試験が行われた。1.4 kg ae/ha の率で EHE あるいは DMA 塩のいずれからが 1 回又は 2 回投与された。ただし、2,4-D が 2 回投与された 2 つの州で行われた試験を除く。地上設備によって投与され、投与間隔は 61-90 日であった。全ての作物残留試験において、フォレージとヘイの試料は、最初に投与した 7 日後と 14 日後に集められ、穀粒とワラの試料は 2 回目に投与した 7 日後と 14 日後に集められた(Carringer, 1995a, b, t)

1994 年には、アメリカの 7 つの州で 16 の作物残留試験が行われた。半分の試験では EHE が、もう半分の試験では DMA 塩が使用された。(i)名目上 1.4 kg ae/ha の率で分けつ時に単回、あるいは(ii)1.4 kg ae/ha の率で分けつ時に単回投与し、hard dough 期に名目上 0.56 あるいは 0.84 kg ae/ha の率で収穫の約 7 日あるいは 14 日前に投与された。最初と 2 回目の投与の間隔は 37-98 日であった(Carringer, 1995y, z)。コントロール試料における残留物の濃度は、フォレージに関して<0.01 to 0.09 mg/kg、穀粒に関して<0.01 to 0.05 mg/kg であった。GA 試験地では、分けつ期の後に EHE と DMA 塩が投与されており、穀粒、フォレージ、そしてワラから異常に高い残留物が検出されており、使用基準を代表していない。

1996 年には、1994 年の使用基準を繰り返し、最初と 2 回目の投与間隔を 54-101 日として 12 の作物残留試験が行われた(Carringer, 1996a, b)。

表 44. 小麦フォレージ中の 2,4-D 残留物。全て分節期における単回投与

--	--	--	--

--	--	--	--

表 45. 小麦穀粒中の 2,4-D 残留物

表 46. 小麦わら中の 2,4-D 残留物

砂糖あるいはシロップ製造用草本を対象とした除草剤としての使用

サトウキビにおける 2,4-D の残留物を、表 47 (フォレージ)と表 48 (茎)に示す。

サトウキビ cGAP はアメリカのものであった: 2 x 2.2 kg ae/ha、PHI は特定されていない。DMA 塩を使用して、Florida、Hawaii、Louisiana のそれぞれにつき 2 試験が行われ、Florida と Louisiana で遊離酸を使用して 2 つの追加試験が行われた。全ての試験において、投与は地上設備によるブロードキャストであった。投与率は 2.2-2.6 kg ae/ha であり、投与のタイミングは出穂前と出穂の 106-175 日後の 2 回、栽培期の総投与率は 4.4-4.8 kg ae/ha であった (Carringer, 1995r, s)。

フォレージ試料は 2 回目投与の 88-92 日後に集められ、茎試料は 137-214 日後の成熟した段階で集められた。茎とフォレージに対する LOD は 0.01 mg/kg であった。2,4-D の残留物は、7 つのフォレージコントロール試料並びに、8 つの茎コントロール試料において、検出されなかった(<0.01 mg/kg)。フォレージコントロール試料の 1 つからは、0.12 mg/kg の濃度で残留物が検出された。農薬を投与したフォレージと茎試料における残留物濃度は、コントロール試料による濃度によって補正しなかった。

表 47. サトウキビフォレージ中の 2,4-D 残留物

表 48. 成熟したサトウキビ中の 2,4-D 残留物

種実類を対象とした除草剤としての使用

2,4-D は樹木の周辺の地面に向けて投与された。アーモンド、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、ピスタチオを対象に作物残留試験が行われた(表 49)。

cGAP はアメリカのものであった:2 x 1.6 kg ae/ha、PHI は 60 日(ピスタチオは 50 日)。ヘーゼルナッツでは、濡れた葉と 15-20 cm の高さにある stems of sucker^{*7}に対して、4 x 0.12 kg ae/hl の率でスプレーされた。

***7 訳注)植物の形態上特定可能な茎の種類の一つ。わき芽**

アーモンド アーモンドにおける 2,4-D 残留物の LOD は 0.05 mg/kg であった。5 件の作物残留試験のうち 1 件だけを除き、アーモンドの種から 2,4-D 残留物が検出されることはなかった。検出された 1 件では、農園の地面に落ちたアーモンドの実を集めるのに、機械的な熊手が使われていた。それらの試料における 2,4-D 残留物の濃度は、<0.05 から 0.16 mg/kg であった(Kunkel, 1997a)

ヘーゼルナッツ 2,4-D を 4 回直接投与された 49 日後に収穫されたヘーゼルナッツにおける 2,4-D 残留物の濃度を測定するために、Oregon において 3 回の作物残留試験が行われた。それぞれの試験にはコントロールが含まれていた。また、2,4-D は DMA 塩並びに EHE として 0.11 kg ae/hl の率でわき芽に投与され、投与間隔は 28-31 日であった。投与した溶液には展着剤が含まれており、したたるまで投与された (Kunkel, 1996a)。

ナッツ試料は、4°C で 4-9 日間保存された後に、商業的な取組に沿って 40-65°C のオーブンで 18 時間乾燥され、そして殻むきされた。4 つのコントロール試料における 2,4-D 残留物の濃度は LOD(<0.05 mg/kg)未満であり、2 つのコントロール試料における濃度は 0.06 mg/kg と 0.07 mg/kg であった。農薬を投与した 12 個の試料における残留物の濃度は <0.05 から 0.1 mg/kg であった。

ペカンナッツ 4 つの州で行われた 5 件の作物残留試験において、DMA 塩と EHE が隣り合わせで 2 回投与された。投与間隔は 27-34 日であった(Kunkel, 1996c)。

約 60 日後に試料は集められ、すぐに殻むきされた。全ての試料における残留物の濃度は、LOD(<0.05 mg/kg)を下回っていた。

ピスタチオナッツ California で実施された 2 件の作物残留試験において、DMA 塩が 1.6 kg ae/ha の率で、地上設備を使用して 2 回直接投与された。投与の間隔は 22 日であった(Barney, 1995e)。

農薬が投与されたまた、投与されていないコントロールのナッツが、2回目の農薬を投与した50日後に集められ、殻むきされた。全ての試料において、2,4-D 残留物の濃度はLOD(<0.05 mg/kg)未満であった。

表 49. アーモンド、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、ピスタチオナッツ中の 2,4-D 残留物

¹他に表記が無ければ kg ae/ha

ダイズを対象とした除草剤としての使用

少なくとも、作付けの7日(エステル)あるいは15日(その他の剤型)より前に、2,4-D が畑に投与された。その結果が表 50 から 52 にまとめられている。cGAP はアメリカのものであった:1 x 0.56 kg ae/ha(エステル)あるいは1 x 1.1kg ae/ha (その他剤型)。

アメリカの5つの州で実施された作物残留試験において、EHE の単回投与が作付けの7~9日前に、0.56~0.57、1.4~1.5、そして3~3.2 kg ae/ha の率で行われた。5つの州のうち2つの州で実施された作物残留試験においては、DMA と遊離酸が同一の率で投与された(Carringer, 1994a-d)。

新鮮なフォレージとヘイの試料が、農薬投与の64~85日後に集められた。ヘイ試料は、切断された後、1.5~7日間、風乾された。種子試料は、農薬投与の124~157日後に、成熟した時期に集められた。全ての分析に関してLODは0.01 mg/kgであった。

表 50. 作付け前に投与された場合のダイズフォレージ中の 2,4-D 残留物

表 51. 作付け前に投与された場合のダイズヘイ中の 2,4-D 残留物

¹汚染した試料。2回分析された。その他の試料を分析した結果、残留物濃度は0.01 mg/kg 未満

表 52. 作付け前に投与された場合のダイズ種子中の 2,4-D 残留物

家畜飼料用作物を対象とした除草剤としての使用

2,4-D は、飼料用の草と牧草地に生える幅の広い葉を持った雑草の管理に、世界中で使用されている。

牧草とヘイ cGAP はアメリカのものであった:2 x 2.2 kg ae/ha、PHI は決められていない。アメリカの 16 の州において、32 件の作物残留試験が行われた。地上設備を使用して、遊離酸、DMA 塩、あるいは EHE のブロードキャスト投与が出穂後に 2 回行われた。投与間隔は 29 ~33 日であり、投与率は約 2.2 kg ae/ha であったため総量として 4.3~4.7 kg ae/ha となった。サンプリング前の 10 時間から 7 日間の間、切断されたヘイは乾燥された。(Carringer、1995j、k、o、u、v、w、x; Rosemond、1995a、b、c)

全ての分析に関して LOD は 1 mg/kg であった。2,4-D の残留物は、69 のフォレージコントロール試料、70 のヘイコントロール試料から検出されなかった(<1 mg/kg)。フォレージ試料の 1 つからは、1.1 mg/kg の濃度で残留物が検出された。

表 53. 牧草(rangeland and pasture grass)(フォレージとヘイ)中の 2,4-D 残留物。最初の投与時の生育段階は、全ての試験で 20-25 cm の時期

哺乳類の農産品

(Krautter and Downs、1996)。搾乳用ホルスタイン 3 頭からなるグループ^{*8}に、2,4-D を含むゼラチンカプセルが 1 日に 2 回、連続する 28 から 30 日間投与された。投与された濃度は、餌(乾燥重量)として 1446、2890、5779、そして 8585 ppm に相当する。1 頭がコントロールとされた。上記投与量は、1 日当たりの単位重量当たりの 2,4-D 投与量(2,4-D/kg body weight/day)として、それぞれ約 50.6、100、190、280 mg に相当する。牛は、最終投与後 12-18 時間以内に 3 日間をかけてと殺された。

***8 訳注)投与濃度の違いから、4 グループであると分かる。この試験で用いられた頭数は、4 グループ x 3 頭+コントロール 1 頭の計 13 頭に下記追加 2 グループ(6 頭)を加えた計 19 頭。**

3 頭からなるグループ 2 つを追加し、28 日間連続して高濃度投与をし、最終投与の 3 あるいは 7 日後にと殺した。午前中と午後の 1 日 2 回、搾乳した。4 つの濃度投与群のそれぞれについて、1 頭 1 頭の牛から集められた乳を比例するようにしたコンポジットが調製された。このコンポジットは、搾乳日として 0 日目(投与前)、1、3、7、11、14、18、21、24、そして 28 日目に調製された。回収を検討するためのグループに属する牛からの試料は、0、

24、28 日目また、最終投与の 3 あるいは 7 日後に採取された乳から調製された。

とたいを解剖する間、肉眼的に組織異常がないか検討された。肝臓、腎臓、コンポジットされた筋肉部位(もも肉とテnderロイン)またコンポジットされた脂肪(腎脂肪と大網脂肪)はドライアイスを加えて凍結状態を維持したままホモジナイズされ、分析までの間凍結保存された。

全てのグループについて、順応期間中の 1 日当たりの餌の消費量並びに乳の生産量の平均は、農薬投与期間の量と同様であった。投与期間中の平均体重の変化も、グループ間で同等であった。通常でない、あるいは牛の健康を損なうような投与に関連した効果は無かったため、採取された組織と乳試料は分析するのに適切であると結論づけられた。

集められた試料は、Howard, 1996a によって記述された方法によって分析された。肝臓、腎臓、筋肉部位、そして脂肪に対する LOD は 0.05 mg/kg であり、乳に対する LOD は 0.01 mg/kg であった。分析結果は表 54 に示した。

表 54. 投与された牛に由来する乳と組織中での 2,4-D 残留物濃度の範囲と平均 (Krautter, 1996)

¹7 日目から 28 日目にかけて試料が採取された

²1 日目から 28 日目にかけて試料が採取された

³最終投与の 3 日後に試料が採取された

⁴最終投与の 7 日後に試料が採取された

魚と貝類

(Biever, 1996)。ナマズ(Channel catfish)、ブルーギル(bluegill sunfish)、ザリガニ(northern crayfish)及び、淡水アサリ(freshwater clams)が、土壌基質を含む静的な水性システムの中で、DMA 塩として 6 mg の 2,4-D ae/L に、3 時間から 15 日間暴露された。ブルーギル、ザリガニ、アサリの可食組織は、3、6、12 時間後、1、2、8、15 日後に集められた。ナマズに関しては、暴露したグループ、コントロールとなるグループの両方が死んでしまったため(原因不明)、同じ間隔だが、8 日目までしか試料を集めることができなかった。

表 55 に結果が示されている。ナマズの可食組織における 2,4-D 平均濃度の最大は 0.07 mg/kg であり、暴露 6 時間後に観察され、それ以降 8 日目にかけて減少した。ブルーギルの可食組織における残留物の平均濃度の最大は 0.06 mg/kg であり、暴露 6 時間後に観察され、

8日目と15日目ではほぼLOD(0.01 mg/kg)であった。ザリガニの可食組織における最大残留濃度は1.1 mg/kgであり、暴露8日後に観察され、8日目と15日目の間で明らかに減少することはなかった。淡水アサリの可食組織における2,4-Dの濃度は報告されなかった。これは、当初試料の分析と同時に分析された品質管理用試料からの回収率が、回収率の基準である70-120%の範囲から外れてしまったこと、いくつかの試料について、0.01 mg/kgのLODを達成するために十分な量の組織が残っておらず、再分析ができなかったことが理由である。

表 55. アメリカナマズ、ブルーギル、ザリガニの可食部位中の2,4-D 残留物 (Biever, 1996)

¹最初の分析前に、試料が合一されることはなかった。残りの試料は合一され2回目の分析に使用された。

²ザリガニが死んでしまったため、分析可能な試料はなかった

³分析の回収が許容限界である70%-120%から外れてしまったため、分析結果は報告されていない。

⁴コントロールとなる試料の二重分析はされていない

保存及び加工における残留物の動態

保存における動態

(Johnson and Strickland, 1995a)。Californiaにおいて、レモンに対して収穫前と後とに2,4-D IPEを投与する2件の試験が実施され、この試験においてレモン試料は、6-16°Cで28-112日間、商業的な保存施設で保存された。表28に結果が示されている。

加工における動態

レモン (Johnson and Strickland, 1995b)。上記の試験で得られた丸のままのレモンが、商業的な手法をまねて、ジュース、ウェットパルスとドライパルス、モラセス、そしてオイルに加工された。各加工画分からの単一試料が、まるごとの果実それぞれの試料から集められた。

LODは、ジュースとウェットパルスに対して0.05 mg/kg、ドライパルスとモラセスに対して0.2 mg/kg、そしてオイルに対して0.5 mg/kgであった。各加工画分に対する2つのコントロール試料中の2,4-D残留物濃度はLODs未満であった。

加工試験は適切であり、2,4-Dの残留物はモラセスとドライパルスで濃縮されるものの、ジュース、ウェットパルス、オイルには濃縮されないことを示唆している。平均濃縮係数は、モラセスについて4.3、ドライパルスについて4.6であった。

表 56. レモン及びレモン加工製品における 2,4-D の残留物 (Johnson and Strickland, 1995b)

¹ 平均値の計算には含まれていない

トウモロコシ (Carringer, 1995c)。Iowa と Nebraska で実施された 2 つの試験において、2,4-D EHE がトウモロコシに 3 回投与された。1 回目は 1.7 kg ae/ha の率で出芽前に、2 回目は出穂後に 0.83 kg ae/ha の率で直接投与として、3 回目は 2.5 kg ae/ha の率でブロードキャストによって収穫前に投与された。地上設備が使用され、投与の間隔は 1 回目と 2 回目の間で 32~49 日間、2 回目と 3 回目の間で 88~111 日であった。穀粒試料が最終投与(収穫前)の 7 日後と 14 日後に集められた(表 57)。

各試験について PHI ごとに農薬を投与したそして投与しないコントロールの穀粒試料が 2 つ集められたが、Nebraska で実施された試験において PHI を 7 日として集められた単一の試料のみが、商業的に用いられる手順をまねて、デンプン、グリット、ミール、フラワー、粗精製油(ウェット並びにドライミリング)、そして精製油(ウェット並びにドライミリング)に加工された。

全ての試料に対する LOD は 0.01 mg/kg であった。全てのコントロール試料から 2,4-D の残留物が検出されることはなかった。

表 57. トウモロコシ穀粒から加工された食品目における 2,4-D 残留物 (Carringer, 1995c.)

コメ (Carringer, 1995n)。Arkansas と Louisiana で行われた 2 つの試験において、約 2.5 kg ae/ha (GAP 投与率の 1.5 倍)の率で、分けつの後期に、地上設備を使って 2,4-D DMA がコメに投与された(表 58)。

各圃場の農薬投与区並びにコントロール区から、投与の 61~66 日後に穀粒試料 2 つが集められた。そして、商業的な手順をまねて、粳穀、糠、とう精した白米に加工された。Arkansas の試験で得られた加工品の試料のみが分析された。コントロール試料の全てにおいて、2,4-D の残留物は LOD(<0.01 mg/kg)未満であった。

表 58. コメ及びコメ加工画分における 2,4-D 残留物 (Carringer, 1995n)

--	--	--	--

--	--	--	--

ソルガム (Carringer, 1995m)。Kansas と Texas で行われた試験において、2,4-D DMA を 1.7 kg ae/ha の率で、地上設備を使って投与した 81~112 日後に、2 つのソルガム穀粒試料が集められた(表 59)。

Texas で行われた試験において集められた試料が、商業的な手順をまねて、スターチとフラワーに加工された。両方の試験圃場から集められた穀粒及び Texas の試験から得られた加工農産品から 2,4-D が検出されることはなかった(<0.01 mg/kg)。

表 59. ソルガム並びにソルガム加工画分における 2,4-D 残留物 (Carringer, 1995 m)

小麦 (Carringer, 1995a)。North Dakota と Kansas のそれぞれで行われた 2 つの試験において、栽培期間における GAP 率の 1.4 あるいは 2.1 倍に相当する、1.4 あるいは 2.1 kg/ae/ha いずれかの投与率で、地上設備を使い、82 日間の処理間隔を置いて、2,4-DEHE が 2 回ブロードキャスト投与された。North Dakota では、試料は 7 日後と 14 日後に集められた。しかし Kansas では、14 日後に採取するはずだった区画が意図せず破壊されたため、7 日後の試料だけが集められた。Kansas の試験区から集められた穀粒試料は加工されなかった。

North Dakota の試験区では、各 PHI で、農薬投与された穀粒試料とコントロールの穀粒試料が 2 つ集められた。PHI 7 日で集められた穀粒試料は、商業的な手順をまねて、ブラン、低品位小麦粉(low grade wheat flour)、粗挽き小麦粉(patent flour)、小麦ミドリリング粉(middlings)、小麦ショーツ(shorts)、吸い出された穀粒ダスト(aspirated grain fractions)に加工された。PHI 14 日で集められた穀粒試料は、吸い出された穀粒ダストに加工された。吸い出された穀粒ダストについて 0.1 mg/kg であったことを除き、その他全ての試料に対する LOD は 0.01 mg/kg であった。穀粒コントロール試料の 1 つから、0.01 mg/kg の濃度で 2,4-D が明らかに検出された。結果を表 60 に示す。

表 60. 小麦及び小麦加工画分における 2,4-D 残留物 (Carringer, 1995aa)

¹加工係数

サトウキビ (Carringer, 1995l)。Florida と Louisiana で行われた 2 つの試験において、地上

設備を用いて、総量として 9 kg ae/ha/season(GAP 投与率の 4 倍)となるように、出穂前と 110～176 日後に再度、4.5 kg ae/ha の率で 2,4-D DMA がサトウキビに投与された。

2 回目を投与した 166 あるいは 188 日後に、茎の単一試料が集められ、商業的な手順をまねて、バガス、モラセス(first and final strike)並びに砂糖に加工された。このうち、Florida の試験で得られた試料だけが分析された。2 つのコンロトル茎試料及び 1 つの各加工農産品における 2,4-D の残留物濃度は LOD(<0.01 mg/kg)を下回っていた。Florida と Louisiana の試験で得られた茎試料及び、バガス、モラセス(first strike)そして砂糖における残留物濃度も 0.01 mg/kg を下回っていた。モラセス(final strike)試料の 1 つにおける残留物濃度は 0.01 mg/kg であったが、二重分析した結果は 0.01 mg/kg 未満であった。表 61 に結果を示す。

表 61. サトウキビ並びにその加工画分における 2,4-D 残留物 (Carringer, 1995l.)

販売段階あるいは消費段階にある食品における残留物

1992 年、1993 年、1994 年、1995 年を対象に、US FDA の残留農薬モニタリングデータベースをレビューした結果、4 つのレモン試料における残留が、1992 年に California から報告されているのみであった。残留濃度は 0.05、0.06、0.06、そして 0.11 mg/kg であった。表 62 には、1992 年、1993 年、1994 年を対象とした USDA の農薬データプログラムから得られた結果を示している。

表 62. 1992-1995 年にかけての、2,4-D 残留物を対象としたアメリカのモニタリングデータの要約

各国における最大残留基準値

以下は、カナダのインターネットサイトから得られた各国の MRLs のリストである。
(<http://www.hc-sc.gc.ca/pmra/indimrle.html>).

APPRAISAL

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)は、1970年から1987年にかけての数回の JMPR において評価され、その評価において多くの農産品に MRLs が勧告された。また、1997年には環境への影響が勧告された。今回の JMPR では、CCPR における定期的レビュープログラムの一環として、2,4-D が評価された。

JMPR は、家畜並びに作物代謝、環境動態、分析法、更新された GAP、作物残留試験、家畜給餌試験、そして加工後の残留に関する情報を受領した。

2,4-D の剤型は塩(diethanolamine, DEA; dimethylamine, DMA; triisopropanolamine, TIPA; isopropylamine, IPA)あるいはエステル(2-butoxyethyl, BEE; isopropyl, IPE; 2-ethylhexyl, EHE)である。2,4-D は選択性があり、全身に葉面散布されるホルモン除草剤であり、葉と根により容易に吸収され、幅広の葉の雑草を管理するための成長調整剤として機能する。

マウス、ラット、山羊、産卵鶏、そして魚を使って、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ の吸収、分配、代謝そして排出が調べられている。

ラットとマウスを使った試験の結果は、経口投与後の 2,4-D の吸収は速やかであり、ほぼ完全であることを示している。投与後 4 時間で血漿中のピークレベルに達した。

ラットに 2-ethylhexyl エステルを経口投与した後、被験物質は血液中に検出されず、そのことは速やかに 2,4-D へと加水分解されることを示唆している。血漿中での 2,4-D の濃度は、経口投与後 2 から 4 時間後にピークとなり、約 9 時間の明らかな半減期を伴って減少した。

1 あるいは 100 mg/kg bw の $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ を経口投与されたラットにおける放射活性の排出は急速であった。経口投与された量の 94%以上が、投与後 48 時間までに回収されており、尿としての排出に関する半減期は約 5 時間であった。尿は排出の主要な経路(85~94%)であり、一方の糞は主要でない経路であった(2~11%)。100 mg/kg bw の高投与量では、2,4-D の排出は投与後最初の数時間で飽和に達した。これらの血漿からの急速な消失及び尿への急速な排出は蓄積の可能性が低いことを示している。

ラットにおいて、 $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ は第一には変化せず尿に排出された(>97%)。おそらく 2,4-D のコンジュゲートと考えられる 2 つの主要でない代謝物が検出された。

2-ethylhexyl エステルは急速に吸収され 2,4-D と 2-ethylhexanol に加水分解された。経口投

与の72時間後に、血液、尿あるいは糞中に2,4-D 2-ethylhexyl は発見されなかった。生じた2,4-D の遊離酸はそのまま急速に尿に排出され、2-ethylhexanol はさらに2-ethyl-hexanoic acid、2-ethyl-1,6-hexanedioic acid、2-ethyl-5-oxohexanoic acid、2-ethyl-5-hydroxyhexanoic acid、2-heptanone and 4-heptanone に代謝され、急速に尿、糞に排出されそして空気に拡散した。

[¹⁴C]2,4-D を経口投与された搾乳用山羊の器官、組織、乳、尿における¹⁴C の分配のパターンは、腎臓が主要な標的器官(投与量の0.45%を含む)であることを示していた。より低い割合で肝臓(0.07%)、乳(0.06%)、脂肪(0.03%)そして筋肉(0.01%)に見つかる一方、尿における総¹⁴C は99.4%(97.9%が2,4-D であると同定された)であった。より低レベルで発見された代謝物は2- or 4-chlorophenoxyacetic acid(2- or 4-CPAA)と2,4-dichlorophenol (2,4-DCP)であった。

[¹⁴C]2,4-D を経口投与された産卵鶏では、投与した量の約90%が尿から回収された。可食組織と卵はそれぞれ総投与量の0.1%未満の量を含んでいた。

ブルーギルが、静的な条件の水の中で11 mg/l の[¹⁴C]2,4-D に4日間連続して暴露された。4日目の内臓(食べられない)とフィレット(可食)における総¹⁴C(2,4-D として)は、それぞれ1.9 と0.41 mg/kg であった。2,4-D(¹⁴C の80%、0.33 mg/kg)と2,4-DCP(¹⁴C の7.9%、0.03 mg/kg)が可食部には含まれていた。

植物における2,4-D の代謝に関する情報は、リンゴ、レモン、ジャガイモ、そして小麦について提供された。

2-ethylhexyl エステルを0.35 kg ae/ha の投与率でジャガイモに投与した後、塊茎における残留物の濃度は、2,4-D が0.24 mg/kg(総¹⁴C の42%)、4-CPAA が0.15 mg/kg(総¹⁴C の26%)そして4-hydroxy-2,5-D が0.09 mg/kg(総¹⁴C の15.5%)であった。

ラベルの手順に従って、矮性リンゴの木のキャノピーの下の芝生に[¹⁴C]2,4-D をスプレー投与した後のリンゴにおける残留物は同定するには少なすぎた(総¹⁴C は2,4-D として0.009 mg/kg)。

2,4-D-EME を投与した小麦のフォレージとワラにおいて、総¹⁴C の74%と70%が2,4-D の遊離体あるいはコンジュゲートとして回収された。残りはたくさんの異なる代謝物で構成されており、そのうち4-hydroxy-2,5-D が主要な化合物であった(総¹⁴C の8%)。小麦の穀粒では、総¹⁴C の約半分が天然の成分(タンパク質、デンプン、そしてセルロース)に取り込まれていた。残りは、主に特定されていない極性のそして非極性の化合物で構成されていた。2,4-D は総¹⁴C の6%に相当し、唯一同定された成分であった。

[¹⁴C]2,4-D IPE がポストハーベストとしてレモンに投与され、2,4-D として 2.4 mg/kg の残留につながった。レモンの果実は 5-6°C で最長 16 週間保存された。総 ¹⁴C の大部分は皮に発見され、非常に少量が果肉とジュースに見つかった。20 週間たったレモンの皮は総 ¹⁴C の 93.5% (2.1 mg/kg) を含んでいた。これらの残留物は主として 2,4-D の遊離体とコンジュゲートであった(総 ¹⁴C の 64%、1.5 mg/kg)。少量で見つかったその他の化合物は、遊離のそして結合した 2,4-D IPE (総 ¹⁴C の 0.73%、0.017 mg/kg)、4-hydroxy-2,3-D あるいは 5-hydroxy-2,4-D (0.58%、0.013 mg/kg)、4-hydroxy-2,5-D (0.44%、0.01 mg/kg) そして 2,4-DCP (0.72%、0.016 mg/kg) であった。果肉とジュースで見つかった主要な代謝物もまた、2,4-D の遊離体あるいはコンジュゲートであった(果肉では、総 ¹⁴C の 2.9%、0.07 mg/kg。ジュースでは、総 ¹⁴C の 0.99%、0.023 mg/kg)。

2,4-D の分解は、土壌あるいは水における分解物の濃度として環境上顕著なレベルにつながることはなかった。

好氣的なインキュベーションの条件下では、2,4-D は土壌中で急速に分解する(silty clay Soil における半減期は 25°C で 1.7 日)。最終分解産物は二酸化炭素と土壌に結合した分解物であり、その多くは土壌のフルボ酸とヒューミン酸画分に分配された。

2,4-D エステルの 2-ethylhexyl と isopropyl 部分及び塩の dimethylamine と diethanolamine の動態に追加情報が受領された。

[¹⁴C]2,4-D の KOC 値は 59 から 117 の範囲にあり、試験された土壌を通じて浸出する可能性が高いことを示唆していた(Arizona clay loam、Mississippi loam、California sandy loam、Plainfield sand)。その一方で、分解産物である 2,4-dichloroanisole (KOC: 436-1442) と 2,4-dichlorophenol (KOC: 368-1204) の浸出する可能性は中程度から低かった。これとは対照的に、2つの圃場ライシメータの結果は、sandy soils (表層から 30 cm は pH 5.7、そこから先の土壌層は pH 4.8-5.0) 中を 2,4-D とその分解産物が移動しないことを示していた。2,4-D は、浸出の可能性が高いにもかかわらず、その剤が GAP に従って使用されている場合には、地下水で発見されることは予想されないということを示唆している。

dimethylamine 塩と 2-ethylhexyl エステルを使用した 2 年に亘る地上散逸試験は、2つの剤型が急速に同一のアニオン型に変換されるため、2,4-D の塩あるいはエステルが投与された場合には 2,4-D と類似の散逸率になることを示した。

転作作物における残留は、土壌に 2.2 kg ae/ha の率で [¹⁴C]2,4-D を投与した 30 日並びに 139 日後に作付けしたラディッシュ、レタス、そして小麦を用いて測定された。30 日後に作

付けした作物における総放射活性残留物は、小麦のフォレージでは<0.001 mg/kg、ラディッシュの根では 0.01 mg/kg、小麦のわらでは 0.06 mg/kg であった。作付け間隔として 30 日後に、遊離のあるいはコンジュゲートになった 2,4-D あるいはその代謝物からのエーテル溶解性の残留物が 0.01 mg/kg を超えるレベルで存在することはなかった。30 日並びに 139 日後の両方で作付けされた転作作物において観察された ¹⁴C の残留物は、天然物への取り込みによるものであった。

[¹⁴C]2,4-D の好気性水性分解試験が、5 mg/L の濃度で 46 日目を上限として実施された。2,4-D は当初ゆっくりと分解し、25 日後には投与量の<75%であった。分解率はその後急速に増加し、46 日目では、投与された放射活性の 0.5%のみが 2,4-D であった。主要な分解産物は CO₂ であり、試験が終了する頃には、投与された ¹⁴C の 64%に相当した。その他の同定された残留物で最も濃度が高かったものは(投与された ¹⁴C の%で表すと)、35 日目の 2,4-dichlorophenol が 1.1%、14 日目の 4-chlorophenoxyacetic acid が 1.1%、20 日目の 4-chlorophenol が 1.4%であった。

2,4-D は、好気性水性条件下では環境に長期間残ってはいないようであり、41 日の半減期をもって分解した。

追加の情報が、dimethylamine 塩とその主要分解物である、2,4-D、2,4-dichlorophenol、2,4-dichloroanisole、4-chlorophenoxyacetic acid そして 4-chlorophenol の水性環境と池における消失に関して得られている。

最近の残留物分析法は、塩基性水溶性溶液により抽出し、C18 結合シリカカートリッジを用いて固層抽出し、溶媒分配することを基本としている。メチル化とエステル追加精製の後で、2,4-D 残留物が ECD が付属した GLC によって 2,4-D メチルエステルとして測定される。回収率が 70%を超えていたことから、この分析法は植物性と動物性農産物の両方に対して妥当性確認がされている。植物性のマトリクス、乳そして動物性組織における典型的な定量限界は、0.01~0.05 mg/kg である。多くの作物残留試験において報告されている LOD^{*9} は 0.01 mg/kg である。水、土壌、沈殿物中の残留物は、質量分析計を付属した GLC により測定されており、LOD は水について 0.001 mg/kg、土壌と沈殿物について 0.01 mg/kg である。

***9 訳注)LOD は一般的には、検出限界の略記である。しかしここでは、Limits of Determination (定量限界)の略として使用されている。**

オランダにより提供された分析法は類似の抽出並びに精製手順に基づいている。しかし、SPE 抽出物はさらに内部表面逆相(ISRP)基材を充填したプレカラムと結合 C-18 分析カラムとをカラムスイッチさせた HPLC によりさらに精製され 118 nm の UV で検出された。LOD

は肉に対して 0.02 mg/kg、穀類と野菜類に対して 0.05～0.1 mg/kg であると報告されている。

様々な保存分析用試料における 2,4-D 残留物の安定性に関する情報が提供された。JMPR は、試験期間中(ジャガイモ、チェリーとクランベリーでは最低 2 年、穀粒の生の農産品並びに加工品、フォダーとフォレージ、油糧種子、サトウキビ、グレープと洋ナシでは 1 年、かんきつ類、プラムとピーチでは 7 か月)化合物は安定であったと結論した。

植物における 2,4-D 残留物の特性は、リンゴ、レモン、ジャガイモ、そして小麦の代謝試験から適切に理解され、動物における残留物は、マウス、ラット、ヤギ、家禽類そして魚の代謝試験から理解された。

JMPR は、植物並びに動物における残留物の定義を、MRLs への適合判定用並びに経口摂取量の推定用ともに、2,4-D として定義すべきと結論した。

中性 pH での 2,4-D の分配係数の値(pH5 と pH7 での log POW は、それぞれ 0.18 と -0.83) は、この化合物が脂溶性でないことを示唆している。

2-ethylhexyl エステルを投与した小麦とジャガイモを対象とした植物代謝試験並びに、isopropyl エステルを投与したレモンを対象とした植物代謝試験は、エステル類は、投与後約 10 日までに 2,4-D を重要な最終残留物として、ほぼ完全に分解されることを示唆していた。ラットとマウスを用いた動物の薬理試験また代謝試験は、2-ethylhexyl ester が 2,4-D に急速に変換され、その代謝は 2,4-D と同等であると考えられることを示唆していた。これらの理由から、ethylhexyl ester あるいはその他のエステル類を投与した結果生じる残留物の定義は、遊離酸から生じる残留物に対する定義と同一にすべきである。

様々な作物を対象とした作物残留試験がすべてアメリカで実施され、アメリカの GAP に対して評価された。遊離酸、エステル類、塩類によって得られた残留物の間に顕著な違いは認められなかったため、2,4-D 酸、the ethylhexyl ester そして 2,4-D dimethylamine salt が投与された作物残留試験の結果は、統合され評価された。

かんきつ類。2,4-D は収穫前の成長調整剤として、グレープフルーツとオレンジ(US GAP 1 x 0.0024 kg ae/hl, PHI 7 日)に使用され、ポストハーベスト剤としてレモン(US GAP 1 x 0.05 kg ae/hl)に使用された。JMPR は、グレープフルーツとオレンジを対象とした 2,4-D の噴霧投与は主要でない使用方法であることを知らされていた。

アメリカの GAP に従った 2 件の作物残留試験がグレープフルーツを対象に実施された。最初と最後の農薬投与の間に 1 年が経過したことから、1994 年と 1995 年に収穫された成熟

した試料が評価に使用された。果実全体における残留物は、 <0.05 (2)、 0.07 及び 0.08 mg/kg であった。GAP に従いオレンジを対象に行われた追加の 2 つの作物残留試験の両方において、果実全体における残留物濃度は LOD: <0.05 mg/kg という結果になった。すべての残留濃度を順番に示すと、 <0.05 (4)、 0.07 及び 0.08 mg/kg である。JMPR はグレープフルーツとオレンジを対象とした最大残留濃度を 0.1 mg/kg と推定し、現在のかんきつ類を対象とした CXL 2 mg/kg の取り消しを勧告した。可食果肉に対する残留データは提出されなかったため、JMPR は果実全体における残留濃度をもとに、STMR を 0.05 mg/kg と推定した。

California で、レモンを対象としたポストハーベスト使用の作物残留試験が 2 件行われた。保存期間(0~112 日、6~16°C)における残留物濃度の減少は観察されなかった(0.29 から 0.61 mg/kg の範囲)。作物残留試験数が少なかったため、JMPR は最大残留濃度を推定することができなかった。

果樹園とブドウ園における除草剤としての使用

果物に関する 2,4-D のほかの使用方法として、果樹園やブドウ園の地面に直接投与し雑草を管理するというものがある。リンゴの代謝試験は、果樹園の地面に直接投与された後の果実において、残留物が存在することは予期されないことを示唆しており、作物残留試験データの解釈を支持している。

仁果類。アメリカにおいてリンゴと洋ナシを対象に行われたいくつかの作物残留試験が、現在の GAP(2×2.2 kg ae/ha、直接投与、PHI 14 日)に適合していた。利用可能だった 10 試験分すべてから得られた果実における残留濃度は、PHI 13~15 日で LOD 0.01 mg/kg を下回っていた。JMPR は、仁果類における最大残留濃度を、現実的な定量限界として、 0.01 *mg/kg と推定した。5 倍の率で投与された果物を含むすべての試料において、残留濃度は LOD 以下であったため、STMR の値は 0 と推定された。

核果類。チェリー、ピーチ、プラム(一つは生のプルーン)のそれぞれについて 3 件の作物残留試験が行われた。投与率は最大でアメリカの GAP(2×1.6 kg ae/ha、直接投与、PHI 14 日)であり、その結果、14 日の PHI での残留濃度は LOD 0.05 mg/kg(チェリー)、あるいは 0.01 mg/kg(ピーチとプラム)を下回っていた。JMPR は、核果類に対する最大残留濃度を現実的な定量限界として、 0.05 * mg/kg と推定した。4 倍の率で投与された果物を含むすべての試料において、残留濃度は LOD 以下であったため、STMR の値は 0 と推定された。

ベリー類とその他の小さな果実。アメリカの GAP に従った、 2×1.6 kg ae/ha の率での直接投与がされた、ブルーベリーを対象とした 4 つの作物残留試験において、最終投与の約 30

日後に 0.01 mg/kg までの濃度で残留物が検出された。残留物の濃度は、<0.01 (2) 及び 0.01 (2) mg/kg であった。

アメリカの GAP(1 x 1.7 kg ae/ha, 開花前)に従ったストロベリーを対象とした 6 件の作物残留試験において、投与の 59~129 日後では残留物は検出されなかった(<0.05 mg/kg)。

3 x 4.5 kg ae/ha の投与率でクランベリーを対象にアメリカで実施された 2 件の作物残留試験の結果が報告された。アメリカの GAP は 2 x 4.5 kg ae/ha の率での直接投与であった。30 日の PHI では、1 件目の試験で得られた試料からは、LOD 0.02 mg/kg を超える濃度で残留物は見つからなかったが、2 件目の試験から得られた試料からは、0.11 mg/kg までの濃度で残留物が見つかった。

ラズベリーを対象とした試験は 1 件だけ実施された(1 x 1.6 + 1 x 3.1 kg ae/ha)。LOD 0.05 mg/kg を超える濃度の残留物は見つからなかった。ブラックベリーについては残留データが報告されなかった。

最近のアメリカの GAP(1 x 1.6 kg ae/ha, 直接投与)に従って、ブドウを対象とした 2 件の作物残留試験が実施された。推奨される 100 日の PHI 後には、LOD 0.05 mg/kg を超える濃度での残留は見つからなかった。

アメリカの GAP に従った作物残留試験から得られたすべての残留物の濃度は、その濃度順に、<0.01 (2)、0.01 (2)、<0.05 (9) そして 0.11 mg/kg であった。

JMPR は、ベリー類とその他の小さな果実類(ブドウを含む)に対して、0.1 mg/kg の最大残留濃度を推定し、ブラックベリー、ラズベリー、バクシニウムベリー(ベアベリーを含む)を対象とした CXLs の取り消しを勧告した。

JMPR は、ブドウを除くベリー類に対して STMR 0.05 mg/kg を推定した。ブドウについては、その特殊な使用パターン(PHI 100 日及び高い植物毒性)を理由に、STMR を 0 mg/kg とした。

野菜を対象とした除草剤としての使用

野菜の場合、2,4-D は雑草管理のために地面に向けて投与される。スイートコーン、ジャガイモ、アスパラガスを対象とした作物残留試験の結果が報告された。

スイートコーン(穂についたコーン)。アメリカの投与率で実施された 9 件の作物残留試験の

結果が報告された。それらの作物残留試験のうち、2 件のみが推奨される 21 日の PHI を含んでいた。しかし、すべての試験における投与は、登録された作物の成長段階で行われていた。鞘を除いたカーネルと穂のすべての試料において、残留物の濃度は、LOD 0.05 mg/kg と同じもしくは下回っていた。JMPR は、実際的な定量限界として、スイートコーンを対象とした最大残留濃度を 0.05* mg/kg、STMR を 0.05 mg/kg と推定した。

ジャガイモ。アメリカで行われた 10 件のうち 8 件の作物残留試験が、アメリカの GAP(2 x 0.078 kg ae/ha)に従っていた。投与は、登録された作物の成長段階で行われていた。収穫時、残留物の濃度は、<0.05(5)、0.08(2)、そして 0.13 mg/kg であった。JMPR は現在の CXL 0.2 mg/kg を改めて確認し、STMR を 0.05 mg/kg と推定した。

アスパラガス。アメリカの投与率を含む 4 件の作物残留試験が報告されたが、そのうち 2 件だけが特定の PHI 3 日を含んでいた(残留物の濃度は 0.1 と 3 mg/kg)。2 件の作物残留試験データでは、最大残留濃度の推定に不十分である。

穀類を対象とした除草剤としての使用

2,4-D は、冬並びに夏穀類の出穂前後あるいは収穫前処理のために世界的に使用されている。

トウモロコシ。dimethylamine salt(7 試験)、2-ethylhexyl ester (6 試験)、あるいは遊離酸(1 試験)を 3 回、都合 3.4 kg ae/ha を投与した、7 日(アメリカの GAP)あるいは 14 日後の穀粒における 2,4-D 残留物は、<0.01, 0.01 (8), 0.015, 0.02 (2), 0.03 and 0.04 mg/kg(14 日後の残留濃度のうち 4 つは、対応する 7 日後の残留濃度に比べ高かった)。JMPR は、0.05 mg/kg の最大残留濃度を推定し、それにより現在の CXL (0.05* mg/kg)を置き換え、また STMR を 0.01 mg/kg として推定した。

コメ。アメリカで実施された 10 件の作物残留試験のうち、7 件が GAP(1 x 1.7 kg ae/ha、PHI 60 日)に適合していた。籾を除いたコメ穀粒における残留濃度を順番に並べると、<0.01(2)、0.01 (3)、0.03 及び 0.05 mg/kg となる。JMPR は、玄米を対象に最大残留濃度を 0.1 mg/kg と推定し、これによりコメを対象とした現在の CXL 0.05* mg/kg を取り消し、また、STMR を 0.01 mg/kg と推定した。

ワイルドライス。過剰投与された作物残留試験 1 件(4 つの複製)のみが報告された。0.56 kg ae/ha の率で投与した 53 日あるいは 64 日後に、残留物は発見されなかった。最大残留濃度を推定するために、作物残留試験 1 件では不足である。

ソルガム。アメリカにおいて、エステル類の場合 0.56 kg ae/ha、酸と塩類の場合 1.1 kg ae/ha として、2,4-D は登録されている。アメリカの 4 つの州で行われた都合 10 件の作物残留試験において、推奨される率で登録された作物の生育時期に投与された。

収穫された穀粒において、LOD 0.01 mg/kg を超える濃度で残留物が見つかることはなかった。JMPR は、実質的な定量限界として 0.01* mg/kg をソルガムの最大残留濃度として推定し、それにより現在の CXL 0.05* mg/kg を置き換え、また STMR を 0.01 mg/kg と推定した。

小麦とライ麦。アメリカにおいて小麦を対象とした作物残留試験がたくさん行われ、そのうちの 24 件がアメリカの GAP(1.4 + 0.56 kg ae/ha、PHI 14 日)に沿っていた。小麦穀粒における残留濃度を高い順に並べると、0.11 (2)、0.12、0.13、0.16 (2)、0.17 (4)、0.21、0.22 (2)、0.23、0.24 (2)、0.31、0.34、0.46、0.63、0.87、0.94、0.95 及び 1.4 mg/kg であった。GAP が同一であることから、JMPR は、小麦の残留データをライ麦に外挿することに合意し、STMR 0.22 mg/kg とともに、現在の CXLs 0.5 mg/kg に代わる 2 mg/kg の最大残留濃度を推定した。

その他の穀類。大麦、きび、オーツ麦、ライ小麦を対象とする使用について、2,4-D は世界中で登録されている。大麦、オーツ麦、きびを対象としたアメリカの GAP は、小麦を対象とした GAP と同一だが、開花後の使用により dough stage における残留濃度がかなり高くなる可能性があるため、JMPR は小麦から大麦、オーツ麦、キビへの外挿を勧告できる可能性について合意した^{*10}。

*10 訳注)矛盾があるように感じられ、文意を理解することができない。原文は以下の通り。
Although the US GAP for barley, oats and millet is the same as for wheat the Meeting agreed that extrapolation from wheat to barley, oats and millet could be recommended because the residue could be considerably higher from the use after blossom at the dough stage.

推測するならば、「Although the US GAP for barley, oats and millet is the same as for wheat the Meeting agreed that extrapolation from wheat to barley, oats and millet could not be recommended because the residue could be considerably higher from the use after blossom at the dough stage.」であり、「大麦、オーツ麦、きびを対象としたアメリカの GAP は、小麦を対象とした GAP と同一だが、開花後の使用により dough stage における残留濃度がかなり高くなる可能性があるため、JMPR は小麦から大麦、オーツ麦、キビへの外挿を勧告することができないことについて合意した。」であろう。

オーストラリアでは、ライ小麦を対象に 2,4-D が登録されている(1 x 1.6 kg ae/ha、PHI 7 日)。アメリカで実施された小麦を対象とした作物残留試験の多くが、オーストラリアの GAP に準拠していたが、気候条件が異なるため、JMPR はアメリカのデータの外挿を支持しな

った。

JMPR は、大麦とオーツ麦を対象とした現在の CXLs 0.5 mg/kg の取り消しを勧告することに合意した。また、きびとライ小麦に対する最大残留濃度を推定することができなかった。

サトウキビ。出芽前に 1 度、出芽後に 1 度、2.2 kg ae/ha の率で投与する GAP に従いアメリカで実施された 8 件の作物残留試験の結果が報告された。PHIs が 137~214 日の成熟したサトウキビにおける残留物の濃度は、<0.01 (7) と 0.02 mg/kg であった。JMPR は最大残留濃度を 0.05 mg/kg、STMR を 0.01 mg/kg と推定した。

種実類。アメリカにおいて、アーモンドとピーカンナッツをそれぞれ対象として、10 件の作物残留試験が行われた。10 件のうち、5 件では dimethylamine salt が、5 件では 2-ethylhexyl ester が、アメリカの GAP(2 x 1.6 kg ae/ha、PHI 60 日)に従い直接投与された。

ピスタチオナッツを対象に直接投与した 2 件の作物残留試験もまた、アメリカの GAP(2 x 1.6 kg ae/ha、PHI 50 日)に従っていた。

Dimethylamine salt と 2-ethylhexyl ester をそれぞれ用いた 3 件の作物残留試験は、ヘーゼルナッツに対するアメリカの cGAP(4 x 0.12 kg ae/ha の率で sutems of sucker にスプレーし、PHI は 45 日)に従っていた。

残留物濃度は、アーモンドカーネルでは<0.05 (8)、0.08、0.16 mg/kg であり、ピーカンナッツとピスタチオナッツでは全ての試料の濃度が LOD 0.05 mg/kg を下回っており、ヘーゼルナッツでは<0.05 (2)、0.05、0.1 mg/kg であった。全ての残留濃度を順番に並べると、<0.05 (22)、0.05、0.08、0.1、0.16 mg/kg となった。

JMPR は、種実類を対象とした最大残留濃度を 0.2 mg/kg、STMR を 0.05 mg/kg と推定した。

ダイズの種子、フォダー並びにフォレージ。アメリカにおいて、1 x 0.56 kg ae/ha の率でエステル類をあるいは、1 x 1.1 kg ae/ha の率で遊離酸あるいは塩類を作付け前に投与することが 2,4-D の使用として登録されている。0.56、1.4 あるいは 3.2 kg ae/ha の率で投与された 27 件の作物残留試験が報告された。全ての種子試料における残留物の濃度は LOD 0.01 mg/kg を下回っていた。JMPR は、ダイズの種子では検出可能な残留は起こりそうにないと結論し、最大残留濃度を 0.01* mg/kg、STMR を 0 mg/kg と推定した。

新鮮なフォレージの 27 試料のいずれからも残留物は検出されなかった。

フォレージを切断後、1.5～7 日間風乾した後に、フォダー試料が分析された。GAP に従った 9 件の作物残留試験により得られた試料中から、LOD 0.01 mg/kg の濃度を超えて残留物が発見されることはなかった。より高い率で投与された後の試料からは、0.04 mg/kg を最大濃度として残留物が発見された。

JMPR は、ダイズのフォレージ(青葉)あるいはフォダーには検出可能な濃度の残留は予測されないと結論し、現実的な定量限界の値として 0.01* mg/kg の最大残留濃度を推定した。STMRs はダイズのフォレージ(青葉)に対して 0 mg/kg、フォダーに対して 0.01 mg/kg と推定された。

飼料作物

草本のフォレージ、ヘイあるいはフォダー。飼料として使用される牧草地と牧草を対象としたアメリカの GAP(2 x 2.2 kg ae/ha)に従った作物残留試験の結果が報告された。JMPR には、牧草地を対象とする最大残留濃度を推定する際に、PHI が 0 日であることを考慮すべきであることが知らされた。

投与当日のフォレージにおける残留物の濃度を順番に並べると、90、92、135、153、154、162、169、172、173、177、182、183、192、194、198、223、233、236、241、258、271、280、285、311、314 そして 358 mg/kg であった。JMPR は草本のフォレージに対する STMR を 193 mg/kg と推定した。

ヘイ(新鮮なフォレージに対する PHI は 7～30 日)に対する各試験から得られた最大の残留濃度は、19、39、40、50、61、65、68 (2)、74、82、86、94、96、101、103、109、126、142、145、147、149、150、155、180、182、206、216、218、231、236、279 そして 330 mg/kg であった。JMPR は、草本のヘイあるいはフォダー(乾燥)に対する最大残留濃度を 400 mg/kg また、STMR を 117.5 mg/kg と推定した。

トウモロコシのフォレージとフォダー。アメリカの GAP では、1.1 kg ae/ha の率での出芽前投与、トウモロコシが 25-41 cm の高さに成長した段階における 0.56 kg ae/ha の率での出芽後の直接投与、そして 1.7 kg ae/ha (穀粒に対する PHI 7 日)の率での収穫前投与が認められている。

併せて 1.7～2.2 kg ae/ha になる、2,4-D の 2 回投与後の残留物濃度を順位ごとに並べると、PHI を 7 日として集められた 16 のフォレージ試料においては、0.01、0.03、0.09、0.25 (2)、

0.33、0.46、0.61、0.69、0.88、1.0 (2)、1.1、2.7、3.0、5.2 mg/kg、54～89 日後に集められた 16 のサイレージ試料においては、<0.01 (14)、0.01、0.03 mg/kg であった。

併せて約 3.4 kg ae/ha になる、2,4-D の 3 回投与後のフォダーにおける残留濃度は、投与後 7 あるいは 14 日後において、3.6、4.2、4.4 (2)、5.7、6.4 (2)、9.1、9.9、15、20、25、30 mg/kg であった。

JMPR はトウモロコシのフォレージとフォダーを対象とした最大残留濃度をそれぞれ 10 mg/kg と 40 mg/kg と推定した。またフォレージとフォダーの STMRs はそれぞれ、0.65 mg/kg、6.4 mg/kg と推定された。

稲わらと稲のフォダー。GAP に従った 61～66 日後における 2,4-D の残留物濃度は、1.1、1.5、2.1、3.1、5.4、6.4、8.8 mg/kg であった。JMPR は、乾燥した稲わらと稲のフォダーに対し、最大残留濃度を 10 mg/kg、STMR を 3.1 mg/kg と推定した。

ソルガムのわらとフォダー。上記したアメリカで実施された 10 件の作物残留試験から得られた、投与 30 日後の緑色のフォレージにおける残留物の濃度を順番に並べると、<0.01、0.02 (2)、0.03 (2)、0.04、0.06、0.08、0.13、0.14 mg/kg であった。JMPR は、ソルガムのフォレージ(緑色)に対して、最大残留濃度を 0.2 mg/kg、STMR を 0.035 mg/kg と推定した。

投与の約 82～112 日後、成熟した段階において、フォダー試料は採取された。未処理のコントロール試料における残留物濃度は、作物残留試験における試料と同程度であった。そのため、JMPR は、提出されたデータはソルガムの藁とフォダーにおける最大残留濃度を推定するために使用することができないと結論した。

小麦のフォレージ、藁そしてフォダー。アメリカにおいて、2,4-D の最初の投与は、植物が十分に分けつしているが茎に節が形成される前に行うことが、また 2 回目の投与は穀粒が dough stage にあるときに行うことが推奨されている。

小麦は収穫前投与の前に切り取りフォレージとして使用することができ、そのため、フォレージ試料は、最初の投与の 7 日後に集められる。残留物の濃度順に並べると、5、6 (3)、6.3、7、8(2)、8.5、9 (2)、11、14 (3)、15 (2)、16、17、18 (2)、19、20 (2)、22 (2)、23 (2)、24、25、26、29、30 (2)、33(3)、34、35、41、42、50、54、55、58、112 mg/kg であった。

GAP に従った投与の結果得られた残留物濃度は、収穫前投与の 13～15 日後において、2、3、4 (5)、5 (3)、6 (2)、7 (3)、8 (2)、11、15 (4)、17、18、22、41、85 mg/kg であった。

JMPR は、乾燥した小麦の藁並びにフォダーに対して、最大残留濃度 100 mg/kg と STMR 7 mg/kg を推定し、小麦のフォレージに対して STMR 20 mg/kg を推定した。

サトウキビフォレージ。道路脇(by layby)から 2.2 kg ae/ha の率でサトウキビに対し 2,4-D を出芽前及び出芽後に投与した後、2 回目投与の 88~92 日後に集められたフォレージ試料における残留物の濃度は、<0.01(2)、0.01、0.03、0.04、0.08、0.14 mg/kg であった。JMPR は、最大残留濃度を 0.2 mg/kg、STMR を 0.03 mg/kg と推定した。

家畜移行試験

3 頭の牛で構成された複数の群に対し、乾燥重量ベースの飼料として、2,4-D ae が 1446、2890、5779、8585 ppm 等量となる 4 つの投与量での投与が 28 から 30 日間連続して行われた。追加の 2 群を対象に、28 日間高濃度投与が行われ、最終投与の 3 あるいは 7 日目後にと殺された。

2,4-D の残留物は、分析された乳試料の大部分から検出された。高投与群から得られた試料における平均残留濃度は、投与の 7 日後にはプラトーに達し、残りの投与期間を通じて、0.47 mg/L の残留濃度を示した。3 日並びに 7 日間回復させた群における平均残留物濃度は、28 日目での 0.46 mg/kg と 0.47 mg/kg の濃度から、0.01 mg/kg まで減少した。

中程度の高濃度で投与した群から得られた乳における残留物濃度もまた、7 日後にはそれぞれ 0.29 mg/kg と 0.04 mg/kg の平均濃度でプラトーに達した。中程度の低濃度で投与した群から得られた乳における残留物は、投与した初日の後定常となり、その後の残りの期間を通じて 0.12 mg/kg の平均濃度となった。

分析された大部分の組織試料からも、2,4-D 残留物が検出された。高濃度群、中程度高濃度群、中程度低濃度群、低濃度群における、肝臓における平均残留濃度は、それぞれ 3.1、3.0、1.9、1.2 mg/kg であり、3 日及び 7 日間の回復後には、それぞれ 0.45 mg/kg と 0.39 mg/kg に減少した。

4 つの群から得られた腎臓における平均残留濃度は、それぞれ 24、17、14 及び 3.8 mg/kg であり、3 日及び 7 日間の回復後には 0.06 及び <0.05 mg/kg に減少した。4 つの群から得られた筋肉組織における平均残留濃度は、1.0、0.76、0.41、そして 0.21 mg/kg であり、3 日及び 7 日間の回復後には 0.06 及び <0.05 mg/kg に減少した。また脂肪における平均残留濃度は 2.2、2.5、0.59、0.42 mg/kg(中程度高濃度投与群で最高値)であり、3 日及び 7 日間の回復後には 0.07 及び <0.05 mg/kg に減少した。

このように、動物組織における残留濃度は腎臓で最も高く、続いて肝臓、脂肪、筋肉組織そして乳の順で高くなった。この関係性は、全般的に見て、4つの投与群全てで一致していた。高濃度投与群での平均残留濃度が、中程度高濃度投与群での平均残留濃度に比べてわずかに低値となった脂肪を除き、残留濃度は総じて投与濃度に依存していた。脂肪で得られた結果は、脂肪においてはプラトーに達していることを示唆していた。

2,4-D 残留物への最大量での暴露は、草本フォレージにおける最高の残留濃度が 358 mg/kg となった、除草剤として牧草に使用することによって起こる可能性がある。乳牛(550 kg 体重)による 1 日の飼料消費量の最大が、乾燥重量ベースで 20 kg であり、そのうち 60%が 25%の乾燥物を含む草本フォレージであると想定すると、摂取量を以下の通り計算することができる。

湿重量ベースの 358 mg/kg は、乾燥物ベースで 1432 mg/kg に相当する(358 x 1/0.25)。

草本のフォレージは飼料の 60%に相当するため、乾燥物ベースでの総試料として 859.2 ppm に寄与することになる(1432 x 0.6)。

従って、経口摂取量は、859.2 x 20/550=31 mg/kg bw/day となる。

給餌試験における最低の投与濃度は 50.6 mg/kg/day であった。しかし、投与量と残留濃度との間に、原点を通過するグラフとともに、ほぼ直線の関係が確立されたため、JMPR は、この場合、実際の経口摂取量推定値のために下方に外挿することが正当化されると結論した。以下の表は、測定並びに外挿された最高濃度また平均濃度を示している。最大残留濃度は、外挿により得られた最高の残留濃度から推定された。STMRs は、最大残留濃度を推定するための外挿により得られた平均残留濃度と STMR のそれぞれから推定された。

¹ 給餌試験において観察された残留物濃度は括弧書きで示した。

JMPR は、腎臓から検出された残留物の濃度を使って、肝臓と腎臓を“可食臓物”として統合すべきかを検討し、最大残留濃度を乳について 0.1 mg/kg、可食臓物について 5 mg/kg、肉について 0.2 mg/kg、STMR を乳について 0.043 mg/kg、可食臓物について 2.745 mg/kg、肉について 0.125 mg/kg と推定し、乳と乳製品に対する CXLs(0.05* mg/kg)を取り消すことを勧告した。得られた結果が不規則であると思われたため、脂肪を対象とした最大残留濃度あるいは STMR は推定されなかった。

産卵鶏を用いた代謝試験の結果は、投与量の約 90%が排泄物に回収されることを示していた。可食組織及び卵には、総投与量の<0.1%しか含まれていなかった。2,4-D 残留物への

最大の暴露は、小麦とライ麦の穀粒に起因すると考えられた。小麦とライ麦の穀粒については、作物残留試験における最高の残留濃度が 1.4 mg/kg であり、最大残留濃度が 2 mg/kg、STMR が 0.22 mg/kg で推定されている。鶏(1.9 kg 体重)の 1 日の飼料消費量の最大が乾燥物ベースで 0.12 kg であり、これが 80%の小麦穀粒(89%乾燥物)と 20%のライ麦穀粒(88%乾燥物)で構成されていると想定すれば、最大残留濃度から、2.25 ppm が経口摂取量として計算される。そのため、0.002 mg/kg (0.1%)を超える濃度での可食組織及び卵における残留は理論的に予想されなかった。JMPR は家禽類の肉、可食臓物、そして卵を対象とした STMR を 0、家禽類の肉及び可食臓物に対する最大残留濃度を実質的な定量限界の値として 0.05* mg/kg と推定した。JMPR は、既存の CXL 0.05* mg/kg を置き換える事になる卵を対象とした最大残留濃度を、LOD 濃度の 0.01* mg/kg として推定した。

加工

レモン、トウモロコシ、コメ、ソルガム、小麦そしてサトウキビにおける 2,4-D 残留物に対する加工の影響を検証するための試験が行われた。

中央値として 2,4-D 濃度が 0.51 mg/kg のレモンが、ジュース、ウェットパルプ、ドライパルプ、モラセス、オイルに加工され、それぞれの加工品における残留濃度の中央値は、0.05、0.45、1.9、2.0、<0.5 mg/kg であった。対応する平均加工係数は 0.1、0.88、4.7、4.3、<1 であった。JMPR は、これらの加工係数をオレンジとグレープフルーツの STMR 0.05 mg/kg に適用し、ジュースについて 0.005 mg/kg、ウェットパルプについて 0.044 mg/kg、ドライパルプについて 0.235 mg/kg、モラセスについて 0.215 mg/kg、オイルについて 0.05 mg/kg の STMR-Ps を推定した。

トウモロコシに関する加工データは、食品あるいは飼料として使用されるいかなるトウモロコシ加工品においても、2,4-D 残留物の濃縮が起こらないことを示唆していた。グリッツ、ミール、フラワーにおける 2,4-D 残留物の濃度(それぞれ 0.04、0.05、0.05 mg/kg)は、穀粒における濃度(0.06 mg/kg)と同程度であった。aspirated maize grain 画分における 2,4-D 残留物の濃度は、穀粒における残留物濃度の約 37 倍であった。化合物の科学的な特性の観点からは、トウモロコシ油における残留物濃度は、LOD 0.01 mg/kg よりも低くなるはずである。

ともろこし穀粒を対象に STMR が 0.01 mg/kg と推定され、加工農産品における残留濃度が、生の農産品における残留濃度に類似していたことから、JMPR は、ともろこしのグリッツ、ミール、フラワーを対象とした STMR-Ps を 0.01 mg/kg と推定した。

コメを用いた加工試験 1 件の報告があった。2,4-D の残留物は、米ぬかあるいは米粉において濃縮されていなかったが、粳殻においては係数が 3 になるように濃縮されていた。未加

工の農産品(玄米)に対するデータが報告されていなかったため、米粉に対する STMR-P は推定することができなかった。

ソルガムの穀粒あるいはその加工農産品において、2,4-D 残留物が検出されなかったため、ソルガムを対象とした加工試験は評価することができなかった。

残留物の濃度を高くするために、小麦が過剰量の 2,4-D(1.5 及び 2.4 mg/kg)により処理され、ブラン、フラワー、ミドリングス、そしてショートを作るために加工された。残留物はブランに濃縮されフラワーでは減少した。それぞれの平均加工係数は3.65と0.11であった。小麦穀粒に対する SRMR が 0.22 mg であったことから、JMPR は小麦ブランと小麦フラワーを対象とした STMR-Ps をそれぞれ 0.803 mg/kg と 0.024 mg/kg と推定した。

GAP に規定された率の 4 倍で投与されたサトウキビを対象とする 2 件の作物残留試験により得られた残留物濃度は、定量限界(0.01 mg/kg)を下回った。1 件の作残試験で得られたサトウキビはモラセスと砂糖に加工され、その両方における残留濃度は <0.01 mg/kg であった。STMR-PS は推定されなかった。

勧告

作物残留試験のデータに基づき、JMPR は下記の通り最大残留濃度と STMRs を推定した。最大残留濃度は、MRLs としての使用目的に対して勧告されるものである。

MRLs への適合判定用並びに暴露量評価用の残留の定義：2,4-D

¹ ベリー類とその他の小さな果実に対する勧告により置き換えられた。

² 柑橘類を対象とした MRL に含まれている

³ 玄米に対する勧告により置き換えられた。

経口リスク評価

26 の農産品に対して推定された STMRs と 5 つの GEMS/Food 地域食に基づく、国際的に推定された 2,4-D の経口摂取量は、ADI の 3 から 10% の範囲にあった。JMPR は、JMPR によって検討された使用方法に起因する 2,4-D 残留物の経口摂取は現在の公衆衛生上の懸念につながらないと結論した。

参照

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities

導入

1. 作物、作物産品、動物由来産品から、残留物の程度を知るための(MOR ; magnitude of residue)データを収集する際には、その対象となる試料に、残留の定義(リスク評価と規制用の定義の両方)に含まれるすべての成分の残留物が、サンプリング/収穫された時から分析までの間、正確に定量可能なまま残っていることを確実にすることが基本である。MOR 試料が、収集後可能な限り速やかに分析されない場合には、残留物の成分に化学的な変化が起こるかもしれない、その変化は不正確な結果につながるかもしれない。MOR 試料を採取後直ちに分析することができない場合には、MOR 試料は分析するまでの間、適切なゼロ℃付近の条件下で保存すべきである。このような場合、残留物の安定性に関する保存条件の影響が調査されなければならない。このガイドラインにおけるカギとなる論及は、38 段落の(i)~(v)に挙げられている。

目的

2. これらの試験の目的は、作物に由来する加工画分への外挿により作物を代表する農産品において、また動物由来製品において、農薬の残留物が安定に存在する期間を示すことである。申請者に対しては、代表的な農産品において安定性が示されている最短の期間中の分析を確実にすることが求められる。MOR 試験には、それに限られないが以下が含まれる。

- ・ 作物圃場試験
- ・ 隔離圃場における転作物中の残留物に関する試験
- ・ 家畜飼養試験
- ・ 加工試験

全般的事項

3. 多くの MOR 試験では、試料は分析するまでのある期間、保存される。この保存期間の間に、残留の定義に含まれる、農薬並びに/またはその代謝物の残留物は、気化もしくは酵素による分解のような過程によって、減少するかもしれない。そのため、MOR 試料が採取された時点での残留物の濃度と分析時の濃度とが変わらないようにするためには、MOR 試料における残留濃度への保存の影響を評価するための管理された試験が必要である。言い換えれば、申請者が、MOR 試料が凍結保存される期間中、農薬残留物が安定であることを示すことあるいはその期間中に残留物が減少する程度を示すことが必要である。

4. MOR 試料が凍結条件で保存されて 30 日以内に常に分析されるのであれば、申請者は、例えば基本的な物理的・化学的特徴に関するデータが、残留物が揮発性であったり不安定であったりすることを示していないことを正当化のための理由として提供することで、凍結保存安定性試験の実施を省略することができる。通常、MOR 試料は、サンプリングあるいは収穫後 24 時間以内に凍結されるべきである。しかし、そのようにすることができない場合には、通常の状態あるいは冷却された条件に置かれた期間についても、凍結保存安定性試験の計画において考慮すべきである。

5. 通常は、1 つの農産品から得られたデータがそのほかの関連する農産品(別添 1 の農産品のカテゴリーを参照)の代表となる可能性があるため、すべての農産品に対して、同時の残留物冷凍保存安定性試験が必要とされないことは許容される。対象となる農産品中で残留物が安定であることが示されている限り、保存条件(特に温度とマトリクスの形状、すなわち有姿かホモジナイズ済みか)が対応する MOR 試験と同一であれば、別の冷凍庫を用いて異なる日に開始された冷凍保存安定性試験は許容可能だろう。

6. 不安定である、あるいは揮発性であると知られている、あるいは疑われている残留物のもととなる農薬については、MOR 試験に先立ち、MOR 試料を保存する前提として、適切な保存条件と最大保存期間とを決めるために、残留の定義に含まれる全ての成分を使用した凍結保存安定性試験を検討すべきである。

試験手順

導入

7. 凍結保存安定性試験では、保存期間中に起こるいかなる減少も観察また定量可能とするために、残留物濃度が十分に高い十分な量の初期試料を用いなければならない。試料は、圃場で農薬に処理され、そのことによる残留(インカード残留)のある作物(あるいは家畜)から調製することも、(農薬が投与されていない)コントロールの農産品に残留の定義に含まれる各成分を既知量で添加することにより調製することもできる。保存条件あるいは保存期間による減少分と、分析操作によって失われた分とを区別するために、保存した試料(インカード試料あるいは添加試料)を分析する各時点において、別途保存しておいたコントロール試料に添加し調製した新鮮な添加試料を分析しなければならない。操作回収(率)を求めるために使用されるコントロール試料は同一の農産品とすべきである一方、添加し保存した、凍結保存安定性試験のための試験試料と同一のバッチである必要はない。インカード残留の場合には、保存 0 時間での残留濃度を定量するために、収穫後可能な限り短い期間中に試料を分析しなければならない。

試験物質

8. 一般に、凍結保存条件下に置かれた収穫された作物における残留成分の安定性には、農薬の剤型は顕著な役割を果たさないと期待される。しかし、万が一に備えて、申請者は冷凍保存安定性の結果の妥当性に関する理論的根拠を提供すべきである。凍結保存安定性試験においてインカード残留が使用されるのであれば、MOR 試料中に残留の定義に含まれるすべての成分がいかなる減少でも観察することを可能にする十分な濃度で含まれていることを確実にしなければならない。

9. 試験所において、農薬を投与していない農産品に試験物質が添加される場合には、通常は、有効成分並びに/あるいはその有効成分に由来する特定の代謝物が添加される。残留の定義に 1 つ以上の成分が含まれている場合には、各成分の安定性を検証できるように、試験を設計する必要がある。結果的に、ある成分がほかの成分に代わっても分からなくなる可能性があるため、混合溶液を添加に使用することは推奨されない。そのため、冷凍保存安定性試験は、各農産品に残留の定義に含まれる個別の成分を添加して実施しなければならない。

分析法

10. 冷凍保存された農産品は、対応する MOR 試験に採用された妥当性確認された分析法と同一の分析法を用いて分析されなければならない。異なる分析法が使用された場合には、MOR 試験で用いられた分析法と同様に、完全なバリデーションを実施すべきである。

11. 共通部分を標的とする分析法は、残留の定義に含まれる個別成分のそれぞれの安定性を検証する目的で使用することができない。加えて、ある場合においては、共通部分を標的とする分析法は、共通部分を含みはするが残留の定義には含まれていない化合物も検出してしまう可能性がある。このことは、残留物の減少が起こってしようといまいと、その事実を隠してしまう。そのため、通常は共通部分を標的とする分析法を凍結保存安定性試験において使用すべきではない。しかし、例外的な状況並びに正当化の根拠がある場合には、共通部分を標的とする分析法を使用することになるかもしれない。例えば、MOR 試験において、残留物を定量するために共通部分を標的とする分析法が使用されており、そのためにその分析法が保存期間中の残留物の安定性の検証に使用されるということはある。

添加濃度

12. 凍結保存条件下での残留物の安定性を適切に検証するために、各アナライต์について分析法の定量限界(LOQ)の 10 倍に相当する濃度で添加を行う。このことで、回収が大きくばらつき残留物の安定性の検証の妨げになるような事態がより少なくなるだろう。これはモデル試験であり、示されている分析法の範囲に併せて最適化されるべきである。添加の方法は、分析法の妥当性確認(例えば、回収データを得るための試験)で用いられた添加試料の調製法と同一にすべきである。このようにできない場合には、データを利用するための完全な理由付け/正当化が提供されるべきである。

13. 圃場で農薬を投与した農産品から検出可能な残留物が発見されない場合、あるいは、残留物の濃度が分析法の LOQ に近接している場合には、インカード残留よりも、むしろコントロールとなる農産品に添加した試料を冷凍保存安定性試験において採用すべきである。

試料の形態

14. 例えば、ホモジネート、粗切り、有姿の農産品、抽出物といった、凍結保存安定性試験における農産品の形態については、可能な限り、対応する MOR 試験における形態と同一にすべきである。ある場合においては、凍結保存試験において、上記の試料形態のうち 1 つ以上を用いる必要があるかもしれない。例えば、MOR 試験において、数か月間保存されたホモジネートから抽出され、そしてその抽出物が分析前の数週間保存されたとするならば、凍結保存安定性試験における試料の取り扱いも同一にしなければならない。

15. MOR 試料は有姿の状態では保存されている一方で、均質に添加することを確実にするために、凍結保存安定性検証用の試料はホモジネートとして保存されている場合がある。残留物が安定であることが分かっている限り、有姿の農産品を用いることに比べて、ホモジネートを使う事はワーストケースを代表するだろうと考えられるため、通常そのような試験は許容することができる。

16. 凍結保存安定性試験において保存される農産品の形態が抽出物ではなく、そのことで最終測定にかけられる前の MOR 試料の分析用抽出物の保存を反映していないのであれば、試験全体を繰り返す必要は無い。農薬を投与されていない試料からの抽出物に添加したものを、対応する MOR 試料の抽出物と同一の保存条件で同一の期間保存することを許容することは可能であろう。その後、保存された抽出物を分析し、抽出物中での残留物の安定性が検証される。この付加的な試験を避けるために、その試験所が、抽出物が得られた当日に分析することを基本としていない限り、申請者には、抽出物中での安定性の検証をルーチンとして凍結保存安定性試験に取り入れることが助言される。抽出物中での残留物の安定性に関する情報は、例えば分析法の妥当性確認試験あるいは代謝試験といった他の試験からも入手することが可能であろう。

保存条件

17. ほぼ全ての場合において、MOR 試料を圃場から試験所に輸送することが必要であり、分析可能になるまでの期間は試験所において保存されることになる。例えば、輸送する間も、ドライアイスと同封するなどして試料を可能な限り冷却するように努力されるべきであり、輸送期間も可能な限り短くするよう努力されるべきである。そして冷凍保存安定性試験においては、例えば分析するまでの期間 MOR 試料を試験所において保存する際に使用される温度といった、実際の条件をシミュレートすべきである。保存時の温度は-18℃もしくはそれ以下の温度にすべきであり、可能性のある光化学反応を避けるために、農産品は暗所に保つべきである。不安定であることが分かっている農薬については、MOR 試料中での不安定性を低下させるためのオプションとして、より低い温度で保存することあるいは溶媒中で抽出物を凍結保存することが含まれる。さらに、MOR 試験で得られた試料は、ホモジナイズする間あるいは凍結粉碎する間、酸あるいはアルカリを添加することで安定化することもできる。これらの追加的な工程は、冷凍保存安定性試験においても採用されるべきである。

18. 許容可能な保存温度が保たれていることを証明するために、保存条件は定期的にモニターされるべきである。例えば停電等によって、保存条件が顕著に変化

するようであれば、その完全な詳細が提供されるべきであり、試験の頑健性が維持されていたか判断するため、試験の様々な時点において得られたデータを検討すべきである。

19. 試料の保存容器は、可能な限り、MOR 試験に使用したものとデザイン並びに不活性な素材の点において同一としなければならない。しかし、そのようにすることが不可能な場合には、農薬が揮発性でない限り、異なった保存容器を使用したことのみによって、試験が棄却されるものではない。

サンプリングの頻度と期間

20. MOR 試料の保存期間を網羅し十分な時点で分析することを可能にするために、試験の開始時には、各農産物を十分な数小分けにして、冷凍庫で保存すべきであると助言される。問題が発生した場合や繰り返し分析が必要とされた場合に備えて、あるいは予想された期間に比べて長期に亘り保存しなければならない場合に備えて、予備的な試料を保存しておくことも推奨される。全ての場合において、試料の保存が開始された時点における残留物の濃度を明らかにしそして確認するために、サンプリングのタイミングにはゼロ時点を含めるべきである。残留物の安定性並びに MOR 試料の最大保存期間に応じて、サンプリングするタイミングの最小数は変わりうる。

21. 申請者はサンプリングのタイミングとして 2 点のみを選択するかも知れない。それはゼロ時点と、例えば、12 ヶ月あるいは 24 ヶ月後である。しかし、この場合には減衰率を明らかにすることができないため、また観察した期間を超えた外挿が不可能になるかも知れないため、結果として MOR 試験の信用を落とすこととなり、申請者のリスクとなる。残留物が安定であると考えられる場合には、典型的なサンプリングの間隔を 0、1、3、6、12 ヶ月とすることが推奨されるが、MOR 試料が例えば 2 年以上のより長期に亘って保存される場合には、延長されるべきかも知れない。対照的に、残留物が相対的に急速に減少することが疑われる場合には、サンプリングの間隔を 0、2、4、8、16 週とすることが考えられる。事前情報が無い場合には、上記のサンプリングの間隔を組み合わせることになる。

22. 全ての時点で、残留の定義に含まれる全ての成分について、全ての農産品の二重試料を分析することが必要である。しかし、ある 1 点の時点で分析した二重試料に対する分析結果が顕著に(20%よりも大きく)違っていたならば、その時点で保存しておいた追加試料の分析を検討し判断しなければならない。同一の

試料を複数回分析するか否かは、申請者により思慮深く判断されるべきである。残留物以外の物質あるいは試験物質のコンタミネーションによる影響を明らかにし、その結果として、ある場合には試験を繰り返す必要があるかを明らかにするために、添加前の農産品の事前分析が助言される。

23. 申請者は残留の定義に含まれる全ての成分について凍結保存安定性が証明されている期間中に、全ての MOR 試料が分析されることを確実にしなければならない。しかし、これに相当しない場合においては、MOR データの使用について必ずしも妥協しない。例外として、観察可能な残留物の減少がない場合には、保存間隔によってカバーされていない時点への外挿が可能かもしれない。ただし、外挿の程度については、ケースバイケースで規制当局者と議論しなければならない。

24. 作物農産品が含まれる試験の場合には、特定の農産品のカテゴリに含まれる農産品間の外挿の原則が勧告され、その農産品のカテゴリは、以下の通りである。水分含量の高い農産品、酸性度の高い農産品、油分含量の高い農産品、タンパク質含量の高い農産品、デンプン質含量の高い農産品。農産品の中には、1つ以上のカテゴリに当てはまる農産品があることが認識されているが、これらをモデルとして、そのような農産品は最も代表的なカテゴリに分類されている。

25. 試験された全ての農産品において残留物が安定であることが示されている場合には、5つの農産品のカテゴリのそれぞれから1つの農産品を選んで行われた試験を許容することができる。そのような場合、その他全ての農産品(別添1)における残留物は、同じ保存条件下で同じ期間だけ安定であると想定される。

26. 5つの農産品のカテゴリのうち、ただ1つのカテゴリにおいてのみ農薬が使用されると考えられている場合には、そのカテゴリに含まれる1つ以上の代表的な農産品を用いて得られた残留物の凍結保存安定性のデータが必要とされるだろう(このガイドラインを尊重し、唯一1つの農産品のタイプをもつ高タンパク質のカテゴリに関しては例外)。対応するカテゴリに含まれる農産品を対象とした試験が、以下に従って行われる。

高水分含量のカテゴリ：

このカテゴリに含まれる3つの多様な農産品における試験物質の安定性が確認されているならば、このカテゴリに属する他の作物を用いた更なる検証は不要である。

高油含量のカテゴリー：

このカテゴリーに含まれる 2 つの多様な農産品における試験物質の安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の作物を用いた更なる検証は不要である。

高タンパク質含量のカテゴリー：

乾燥した豆 (legume/pulses)において試験物質の安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の農産品を用いた更なる検証は不要である。

高デンプン質含量のカテゴリー：

このカテゴリーに含まれる 2 つの多様な農産品における試験物質の安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の作物を用いた更なる検証は不要である。

酸性度の高いカテゴリー：

このカテゴリーに含まれる 2 つの多様な農産品における試験物質の安定性が確認されているならば、このカテゴリーに属する他の作物を用いた更なる検証は不要である。

27. 異なる 5 つの農産品のカテゴリーの範囲をまたいで、残留物の減少が観察されない場合には、加工食品を対象とした特異的な冷凍保存安定性のデータは必要とされないだろう。しかし、一定の保存期間後に不安定になることが示されている場合には、申請者はいかなる農産品(RACあるいは加工農産品)であっても、安定に保存できることが示されている期間内に分析されることを確実にしなければならない。

28. 代表農産品に関するガイダンスは、全ての農産品のカテゴリーに適用されるであろう農薬に対して指示されている。多くの農薬は、これらのカテゴリーのうち一部分にしか適用されない。2つ以上のカテゴリーでの使用が考えられているが、残留物の凍結保存安定性に関するデータが 5 つのカテゴリーの全てについて得られていない場合には、代表農産品に必要とされる数は、カテゴリーと各カテゴリーに属する作物のいくつに農薬が使用されるかとの組み合わせに依存して決まるだろう。農薬処理されるかも知れない農産品の可能な組み合わせの全てについてガイダンスを提供することは不可能である。申請者は凍結保存安定性試験において使用する代表農産品について、よく見極める必要がある。一例をここに示す。農薬が種実類(高油含量のカテゴリーに属す)並びに核果(高水分含量のカテゴリーに属す)にのみ使用される場合には、冷凍保存安定性のデータは、例えばくるみ、アーモンドといった少なくとも 1 つの種実農産品並びに例えば桃やチェリーといった少なくとも 1 つの核果農産品に対して提供されるべきで

ある。この農薬の使用が後に、葉菜やウリ科野菜のような高水分含量のカテゴリーに属するその他の作物に拡大される場合には、このカテゴリーにおける 3 つの多様な農産品に対する必要性和矛盾のない、これら 2 つのタイプの農産品に対するデータが必要とされるだろう。そのことで、高水分含量のカテゴリーに属する全ての農産品に対しての凍結保存安定性が証明されたことになる。

29. 5 つのカテゴリーのそれぞれにおいて代表的な農産品を対象に、凍結保存安定性の試験が利用可能な場合には、そのことで 1 つ以上の農産品を含む作物(例えば、穀粒、藁、フォレージを含む穀物類)を網羅することになる。しかし、穀物類を対象とした農薬の使用だけが支持されている場合には、穀粒とフォレージの両方(作物の側面として、高デンプン質並びに高水分含量を代表する)を使ったデータが網羅されていなければならない。

30. 凍結保存安定性を試験するために使用する農産品は、放射性ラベルされた物質を使用した作物代謝試験からも得ることができる。その場合、残留の定義による残留物を、MOR 試験で採用された残留物分析法若しくはその他の妥当性確認された分析法に記載されている抽出手順を用いて抽出した後、検討するアナライトを対象とする適切な放射性化学の検出技術を組み合わせて定量すべきである。言い換えれば、凍結保存安定性のデータは単純に総放射活性量の計測に基づくべきではない(注記：この段落での議論は、別の場所で網羅されている代謝試験を支持するために必要な残留物の凍結保存安定性データを引用するものではない)

分析すべき動物性農産品

31. 例えば、家畜飼養試験あるいは皮膚投与試験のような動物性農産品が関与する試験の場合には、家畜に応じて下記を選択すべきである。

- ・ 筋肉組織—例えば牛並びに/あるいは家禽
- ・ 肝臓—例えば牛並びに/あるいは家禽
- ・ 乳
- ・ 卵

32. 試験された全ての動物性農産品において残留物が安定であることが示されている場合には、上記動物性農産品のそれぞれを用いた試験を許容することができる。そのような場合において、その他の動物性農産品の全てにおいて残留物は同じ保存条件下で同じ期間だけ安定であると想定される。申請者は、上記の動物性農産品において安定性が示された期間よりも短い期間のうちに、動物性農

製品の全ての MOR 試料が分析されることを確実にすべきである。

更なるデータの考慮

33. 冷凍保存安定性試験の間、分析時の操作回収が良好であったことを示すために、熟成/保存された凍結保存安定性試験用の試料が分析のために保存場所から取り出されるその度毎に、新しく添加を行ったコントロール試料を分析すべきである。このようにすることで、分析時の回収が異なる分析の時点に亘って変動する場合に、残留物に起こりうる可能性のある現象について適切な解釈が可能になる。そのようにして、操作による回収が 100%に近い値を示し、一方で保存された農産品からの回収が低かった場合には、そのことが、保存による残留物の減少を示唆している。保存された農産品からの回収と操作の回収の両方が同程度に低かった場合には、保存による残留物の減少が無かったかも知れないと示唆される。

34. 凍結保存安定性試験において得られたデータが残留物の限定された減少を示している場合、必ずしも、それにより MOR データの使用について妥協しない。残留物の減少が限定的であることを取り上げること並びにその現象が許容可能であるか否かを宣言することは適切でない。示唆されるいかなる減少もその重要性も、そこに含まれる可能性のあるいくつかの要素に依存するだろう。それらの要素は以下の通り。減少の比率と一定の状態に達するか否か(平衡)；リスク評価；操作回収の変動、それと同じく、凍結保存安定性試験に使用された農産品と MOR 試験で使用された作物との類似の程度。総じて、試験の許容可能性は、上記の要素を考慮してケースバイケースで検討されることになるだろう。

35. 残留物の減少を測定することができ、適切なグラフを描画するために十分なデータポイントを利用することができる場合、ある時点における減少を決定するために内挿の原則が適用される。いかなる減少についても、保存された農産品における未補正の残留物と操作回収とを考慮すべきである。残留物の減少が示されている場合には、申請者は、農産品における対象となる残留物の安定性が示されている期間中に、全ての MOR 試料が分析されていることを確実にしなければならない。

データ報告に関する考慮

36. 凍結保存安定性試験の報告では、以下について詳細に記述しなければならない。

- ・ 保存した農産品(RAC あるいは加工農産品)

- ・試験した化合物
- ・実験計画
- ・凍結温度、保存期間、保存容器の種類といった保存条件
- ・残留物分析法と使用機器
- ・凍結保存安定性の結果

また、以下を含めなければならない。

- ・データ、統計解析

さらに、試験の実施の妥当性を確実なものとするために、行われた品質管理の手順/注意。これには、上記各工程がいつ行われたかの情報を含む。

例えば、粗切されたのか、ホモジナイズされたのか、保存する前に水若しくはバッファーが加えられたのかといった内容の、MOR 試料の調製について記述することが、申請者にとって重要である。

37. 多種類の農産品がある特定のタイミングで分析されている場合には、全ての農産品と操作回収について、ただ平均を報告するのではなく、個々の農産品ごとの回収の値を報告すべきである。分析の結果は、mg/kg を単位とする絶対値として報告すべきであり、回収による補正、名目上の添加量の%による補正はすべきでない。ゼロ時点での最初の試料を含む全ての試料について、操作回収の個々の値と平均値が報告されるべきである。ゼロ時点での試料からの回収は、初期の操作回収と同じである。凍結保存安定性試験の結果を報告するために提案される様式、並びに観察された事項の注記を加えた例を別添 2 に示す。

材料

(i) 試験物質

(A) 農産品への添加が行われるのであれば、試験物質に関して記載する。名称；化学物質名、共通名、実験場の名称、CAS 名。純度；残留の定義に含まれる全ての成分について。標準溶液の調製。

分析証明書を提供する。

(B) インカード試料(農薬投与に由来する残留のある試料)が使用される場合には、ゼロ時点での試料における残留の定義に含まれる全ての成分の存在とその量を確認する(凍結保存安定性試験の開始時とする)。

(C) 凍結保存安定性試験において使用した試験物質の完全かつ徹底した記述並びに特定のために、申請者が適切かつ該当すると考えた、内容を限らない全ての追加情報。

(ii) 試験農産品

- (A)個別農産品の同定。可能な場合には、作物名、分類名、品種名、植物学上の名前を含む。
- (B)作物の生育段階、例えば、農産品の状態として、未熟(**immature, green**)/成熟(**mature, ripe**)、生鮮/乾燥、その大きさ。
- (C)凍結保存安定性試験に先立ち、全ての農産品を対象に行われたサンプリングの手順の記載。試料のトリミング、クリーニング、不要な部位を除くその他の手段、コンポジットの調製、サブサンプリング、細切、そして抽出といったステップごとの記載。
- (D)インカード試料については、**MOR** 試料の由来、作物残留試験を特定するための番号、コントロール試料あるいはインカード試料、コード付け並びにラベル情報等。これらは、収穫時に決められたコードやラベルのついた試料と同一、若しくは相互参照されるべきである。
- (E)農産品の完全かつ徹底した記述にとって適切かつ該当すると申請者が考えた、内容を限らない全ての追加情報。

方法

(iii)実験計画を記述する。例えば以下の様な内容を含む。試験する農産品の数。試験する物質の数。試験する濃度の値とその数。1つの濃度と試験物質とに対して複製する試料の数。冷凍庫から抜き取る間隔(サンプリングの間隔)の数。

(iv)試験手順

- (A)もし行う場合には、添加の方法。試験化合物を試験物質に加えるための方法の詳細。
- (B)保存条件。温度、光、容器のタイプ/大きさ、農産品の形態(抽出物/浸潤させた状態のもの/等)、試料の数(サンプルサイズ)/重量、期間、等を記述しなければならない。
- (C)サンプリング。ゼロ時点とそれ以後定期的に行われるサンプリングの手順を記述する。
- (D)試料調製(浸潤させる/抽出する等)の日時、“添加”あるいは(ゼロ時点における)インカード残留のタイプ/量の規定、定期的なサンプリングの間隔、凍結保存の完了時期、そして残留分析について記述する。
- (E)残留分析の方法。下記の日時/情報を凍結保存安定性試験の報告書に含めるべきである。あるいは、分析法の完全で詳細な報告を凍結保存安定性試験報告書の別添として付属させる。

(1)分析法の名称/指定/来歴を提出すべきである。凍結保存安定性試験において使用された分析法が、**MOR** 試験において使用された方法と同一であ

る場合には、相互参照すれば十分である。

(2)作物残留試験あるいは加工農産品の試験において使用された分析法からの、試薬、手順、機器、測定条件等に関するいかなる変更についても議論する。

(3)分析法の原理、並びに抽出、精製、誘導体化、定量等の手順について、変更の全て、定量された化学種、使用された確認技術等と同様に、詳細を記載する。

(4)メーカー/モデル、タイプ/検出器の特異性、カラム(充填剤、サイズ)、キャリアーガス、流速、温度、電圧、定量限界と感度、検量の方法等といった、機器や使用条件について記述すべきである。

(5)安全性あるいは健康に関するハザードを避けるために、試薬や手順に必要とされる特別な注意について説明すべきである。

(6)残留物濃度や、回収率を計算するための手順を報告すべきである。

(7)分析の方法論や残留濃度の計算方法に関して、申請者が提供するの適切かつ該当すると考えたその他の追加情報もまた漏らさず提供すべきである。

結果/議論

(v)残留の結果：生データ、必要な希釈の詳細、ピーク高さ/面積、操作回収(%）、使用した計算式/検量線、試料における残留物の濃度(mg/kg)、回収、(観察されている場合には)ゼロ時点に対する保存期間の長さで比較した減少率、凍結保存安定性試験の長さに関する適切さ等について報告すべきである。

(vi)統計学的な取扱：生データに適用した検定の詳細を記述する。

(vii)その他：結果の完全かつ十分な記述に当たり、申請者が適切かつ該当すると考えた、いかなる追加情報も報告する。

結論

(viii)保存期間との関数としての試験農産品における試験化合物の安定性に関して、また内挿と外挿に関するデータの使用に関して記載されるだろう結論について議論する。

認証

(ix)試験責任者による真正であることの認証(署名、記名、職名、提携、住所、電話番号、日付を含む)を提供しなければならない。

(x)指名された事務官による GLP に適合していることの宣言(署名、記名、職名、提携、住所、電話番号、日付を含む)を提供しなければならない。

図表

- (xi)凍結保存安定性試験により得られた各種データの表、並びに農産品と保存期間の関数として、保存試料における残留濃度を要約した表を提出すべきである。
- (xii)該当するグラフ、図、フローチャート、等を含めるべきである。

別添

- (xiii)代表的なクロマトグラムを提供すべきである。

(xiv)全てのデータ提出のどこかで別に報告されるのであれば相互参照で十分であるが、もしそうでなければ参照する分析法とその他の試験の複製を提供しなければならない。

(xv)その他：この報告書の他の項のどこにも適してはいないが、該当する資料があれば含めるべきである。

文献

- (1) U.S. Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 860.1380, 1996, Residue Chemistry.
- (2) EU (1997).Guidance document Appendix H Storage Stability of Residues Samples 7032/VI/95 rev.5 22/7/97.
- (3) United Nations Food and Agricultural Organization (FAO). (1994). Stability of Pesticide Residues in Stored Analytical Samples. 1994 draft prepared by Codex Committee on Pesticide Residues Working Group on Methods of Analysis and Sampling.
- (4) United Nations Food and Agricultural Organization (FAO) (1986). Guidelines on Pesticide Residue Trials to Provide Data for the Registration of Pesticides and the Establishment of Maximum Residue Limits - Part 1 – Crops and Crop Products.
- (5) Canadian Pest Management Regulatory Agency. (1998). Regulatory Directive 98-02. Residue Chemistry Guidelines.

TG506 別添 1

保存された作物農産品における農薬残留物の安定性検証を目的とした農産品のカテゴリー

同一のカテゴリーに含まれる別の農産品に外挿するための試験のために、代表的な農産品を選択する際には、例えば、油を含む農産品のある範囲の代表になるかを試験するために、スパイスやホップのみを選択することが不適切になりえるといった、判定を実施する必要があるだろう。

農産品のカテゴリー	このカテゴリーに含まれる農産品	典型的な代表農産品
高水分含量	仁果類 核果類 鱗茎菜 果菜類/ウリ科野菜 菜 アブラナ科野菜 葉菜と新鮮なハーブ類 茎野菜 フォレージ/フォダー作物 新鮮なマメ科野菜 根菜類の葉 サトウキビ 新鮮な緑茶葉 キノコ類	リンゴ、洋なし アプリコット、チェリー、桃 タマネギ トマト、ペッパー、キウリ、メロン カリフラワー、芽キャベツ、キャベツ レタス、ほうれん草 リーキ、セロリ、アスパラガス 小麦と大麦のフォレージ、アルファルファ 新鮮なエンドウ豆(鞘付き)、スナックエンドウ、ソラマメ、ベニバナインゲン、サヤインゲン てんさい、フォダーとするビーツの地上部
高油含量	種実類 油糧種子 オリーブ アボガド ホップ カカオ豆 コーヒー豆 スパイス類	クルミ、ヘーゼルナッツ、くり 菜種の搾油用種子、ひまわりの種子、綿花の種子、大豆、ピーナッツ
高タンパク	乾燥したマメ科野	ソラマメ、乾燥ソラマメ、インゲン豆(黄色、白/ネ

質含量	菜/マメ	イビー、茶、まだら)
高デンプン 質含量	穀類 根菜類の根 デンプン質な根野 菜	小麦、ライ麦、大麦、オーツ麦の穀粒 てんさい、フォダー用ビーツの根、にんじん ジャガイモ、サツマイモ
高酸性	柑橘類 ベリー類 カラント グレープ キウイフルーツ パイナップル ルバーブ	レモン、マンダリン、タンジェリン、オレンジ ストロベリー、ブルーベリー、ラズベリー クロカラント、アカカラント、シロカラント

重要事項：

上記の農産品のリストは、農産品/マトリクス of 包括的なリストではなく、その他の農産品を使用できる場合がある。申請者はその他の農産品の使用に関する助言を得るために、規制当局者に相談すべきである。

添加濃度を 0.1 mg/kg とした報告の例

農産品	分析対象	保存期間 (カ月間)	試料中での残 留物の濃度 (mg/kg)	試料中での残留物 (添加量に対する 割合%)(範囲並び に平均)	操作回収 (%)
小麦穀粒	代謝物 a	0	0.101, 0.121	101, 121 (111)	101, 121
小麦穀粒	代謝物 a	3	0.122, 0.115	122, 115 (119)	114, 90, 95
小麦穀粒	代謝物 a	6	0.104, 0.116	104, 116 (110)	99, 102, 95
小麦穀粒	代謝物 a	12	0.089, 0.091	89, 91 (90)	98, 100, 103
小麦穀粒	代謝物 a	18	0.080, 0.083	80, 83 (82)	77, 72, 78
小麦穀粒	代謝物 a	24	0.072, 0.069	72, 69 (71)*	75, 80, 79
りんご	代謝物 b	0	0.103, 0.096	103, 96 (100)	103, 96
りんご	代謝物 b	3	0.110, 0.102	110, 102 (107)	112, 98, 95
りんご	代謝物 b	6	0.096, 0.098	96, 98 (97)	100, 103, 95
りんご	代謝物 b	12	0.095, 0.107	95, 107 (101)	97, 62, 103
りんご	代謝物 b	18	0.083, 0.081	83, 81 (82)	104, 95, 99
りんご	代謝物 b	24	0.062, 0.064	62, 64 (63)**	98, 103, 92

*残留濃度は 30% 近く減少しているように見えるが、試験後期に得られている全ての操作回収が、試験初期に得られた操作回収に比べ低値となっているため、小麦の穀粒における残留物は、(ある程度の減少が観察されてはいるが)24 ヶ月を超えて凍結保存された場合でも十分に安定であると考えられる。

**逆に、リンゴにおける代謝物 b の残留は、18 ヶ月の凍結期間までしか安定であると言うことはできない。

表 1 2,4-D を対象とした現在の CXLs の設定状況

Commodity	CXL (mg/kg)	Year of Adoption	Symbol
Berries and other small fruits	0.1	2003	
Citrus fruits	1	2004	Po
Edible offal (mammalian)	5	2003	
Eggs	0.01	2001	(*)
Hay or fodder (dry) of grasses	400	2003	
Maize	0.05	2001	
Maize fodder (dry)	40	2001	
Meat (from mammals other than marine mammals)	0.2	2003	
Milks	0.01	2003	
Pome fruits	0.01	2003	(*)
Potato	0.2		
Poultry meat	0.05	2003	(*)
Poultry, edible offal of	0.05	2003	(*)
Rice straw and fodder, dry	10	2001	
Rice, husked	0.1	2001	
Rye	2	2001	
Sorghum	0.01	2003	(*)
Soya bean (dry)	0.01	2003	(*)
Soya bean fodder	0.01	2003	(*)
Stone fruits	0.05	2001	(*)
Sugar cane	0.05	2001	
Sweet corn (corn-on-the-cob)	0.05	2001	(*)
Tree nuts	0.2	2001	
Wheat	2	2001	
Wheat straw and fodder, dry	100	2001	

(*):現実的に達成可能な濃度として分析法の定量限界に基づき設定された値
Po:農産品へのポストハーベストによる使用を踏まえて設定された値