

フミン酸添加による毒性緩和試験の是非について（案）

1. 経緯

フミン酸の添加による毒性緩和試験が実施された場合には毒性緩和係数を毒性値に乗じることにより、基準値を緩和することが認められており（農薬生態毒性評価手法検討調査報告書（平成16年3月環境省））、農薬取締法テストガイドラインにおいて試験方法「魚類急性毒性・ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験（2-7-3）」が定められている。

緩和試験を実施できる農薬の範囲は、農薬取締法テストガイドラインには特段記載がなく、農薬生態毒性評価手法検討調査報告書（平成16年3月環境省）においても「カチオン性の化学物質のようなフミン酸と著しい相互作用が推定される農薬に対してのみ有効と考えられる」とされているだけである。

平成28年10月12日水産検討会（第4回）、同年11月11日農薬小委員会（第54回）での「銅」の審議に際して、塩基性塩化銅及び塩基性硫酸銅の二つの原体の甲殻類試験において、フミン酸を用いた試験の提出があり、これらの原体についてそれぞれ毒性緩和係数を適用して基準値が設定された。

しかしながら、審議の過程において、キレート作用により毒性が緩和される無機金属イオンに本試験を適用することに疑問が示され、その妥当性について、改めて検討する必要があるとされた。

2. 方針（案）

フミン酸を用いた毒性緩和試験は、以下の理由により、実環境中の有機物による金属へのキレート作用を調べるには適切とは言えないため、キレート作用により毒性が緩和される可能性のある農薬として、無機金属殺菌剤等については、今後、フミン酸添加による毒性緩和試験の採用を認めないこととする。

このため、フミン酸添加による毒性緩和試験を認める農薬は、「カチオン性の化学物質その他のフミン酸と著しい相互作用が推定される農薬（ただし、金属へのキレート作用により毒性が緩和される農薬（無機金属殺菌剤等）を除く。）」とする。

なお、キレート作用に関与しない非金属のカチオン性物質への溶存有機物による緩和効果については、溶存有機物の化合物の組成よりも炭素量に依存するため、緩和試験における溶存有機物の炭素量が環境水中の濃度を基にして設定されている限りにおいては問題がないため、引き続きフミン酸添加による毒性緩和試験を認める。

＜無機金属殺菌剤におけるフミン酸添加による毒性緩和試験が不適切な理由＞

- ① フミン酸によるキレート作用により金属イオンのバイオアベイラビリティが低下して毒性が下がることは科学的に妥当だが、毒性緩和試験において使用されるフミン酸と河川、湖沼等自然の水系に存在する有機物質（フルボ酸及びフミン酸が9：1

程度の混合物¹⁾とは組成が大きく異なるため、毒性緩和試験におけるキレート作用の大きさが環境中と大きく異なると想定されるため。

- ② また、試薬として市販されているフミン酸は、一般的に、褐炭（不純物を多く含む低品位な石炭）から抽出されており²⁾、土壌や水由来のフミン酸とは異なる上、その性質もロットによってばらつくことが報告されており³⁾、加えて、不純物として金属を含むことが多いため。

<金属元素を含有するその他の農薬等について>

有機銅殺菌剤（オキシ銅、DBEDC 及びノニルフェノールスルホン酸銅）、有機硫黄殺菌剤（※）の一部（ジラム（亜鉛）、プロピネブ（亜鉛）、マンゼブ（亜鉛及びマンガ）及びマンネブ（マンガ））、リン化亜鉛、リン化アルミニウム、ホセチル（アルミニウム）等の金属元素を含有するその他の農薬や新規農薬については、環境中における有機物のキレート作用がどの程度毒性の緩和に關与するかは現時点では明らかではないため、これらの農薬でフミン酸添加による毒性緩和試験が提出された場合には、その都度毒性の緩和にキレート作用がどの程度關与するかを検討の上、個別に毒性緩和試験の採否を判断することとしたい。

※ 有機硫黄殺菌剤の作用機構（農薬ハンドブック2016）

- ・SH酵素阻害と考えられており、エチレンビスジチオカーバメートが分解して生ずるイソチオシアネートがSH基と反応するとする説が支持されている。また、病原菌体内の微量金属を本剤が捕捉するために起こる金属欠乏も一因と考えられる。
- ・菌体内で生成したジメチルジチオカルバミン酸銅塩が金属酵素やSH酵素と反応してその働きを阻害するとされている。

¹⁾ 今井章雄（2004）水環境における腐植物質の役割と分析法の進歩. 水環境学会誌, 27, 76-81.

²⁾ 斉藤拓巳（2004）腐食物質への金属イオン結合挙動のモデル化：離散のおよび連続的親和定数分布モデルの比較. 日本原子力学会和文論文誌, 3, 215-232.

³⁾ Malcolm, R.L. et al. (1986) Limitations in the Use of Commercial Humic Acids in Water and Soil Research. Environmental Science & Technology, 20, 904-911.

表 金属を含有する農薬の作用機構と基準値設定の状況

	有効成分名	水産基準値 (急性)	作用機構 (特に記載が無い場合は、農薬小委員会資料より抜粋)	フミン酸 添加試験
無機金属殺菌剤	塩基性塩化銅、塩基性硫酸銅、無水硫酸銅、硫酸銅五水和物及び水酸化第二銅	設定済 (平成29年3月16日告示)	銅は、無機殺菌剤であり、その作用機構は、可溶性の銅が病原菌体に吸着、透過し、原形質のSH化合物と反応することにより、タンパク質などのSH基をブロックし、酵素系の阻害などを引き起こすものである。	採用 (塩基性塩化銅及び塩基性硫酸銅のみ)
	金属銀	曝露のおそれがないとして設定不要 (平成24年2月2日農薬小委員会了承)	本剤の作用機構は、微量の銀イオンが養液中に溶出し、一連の作用の結果、銀と酸化銀や塩化銀の間で反応が起こり、その際にOHラジカルが形成されることによることと、根に付着した銀と遊走子に付着した銀との相互関係により、遊走子が根に接近できないことによる。(農薬ハンドブック2016年版)	実施していない
有機銅殺菌剤	オキシシン銅 又は有機銅	設定済 (平成26年4月7日告示)	オキシシン銅は、銅イオンがオキシシン(8-キノリノール)とキレート結合した構造の殺菌剤であり、その作用機構は脱水素酵素のSH基の阻害である。	実施していない
	DBEDC	設定済 (平成29年11月20日)	DBEDCはドデシルベンゼンスルホン酸の銅錯塩を有効成分とする殺虫殺菌剤であり、病害菌に対する作用機構は、孢子又は菌糸に吸着し、菌のSH系酵素と反応してその作用を阻害することで、物質代謝における酸化還元系に異常を生じさせ、菌を死滅させるものと考えられている。また、害虫に対する作用機構は、虫体に直接散布することで気門を封鎖し、窒息死させるものと考えられている。	実施していない

	ノニルフェ ノールスル ホン酸銅	未設定（既 登録）	無機銅剤、有機銅剤と比較して銅含有量は少ないが、界面活性が強いため浸透性があり、殺菌力が強く、植物体内の病原菌にも防除作用が認められている。果実や花、葉を汚すことが少ないことも特長となっているが、親水性が強いため雨水で流れやすい。（農薬ハンドブック 2016年版）	—
そ の 他	エトフェン プロックス	設定済 （平成21年2 月18日告示）	エトフェンプロックスは、ピレスロイド系の殺虫剤であり、本邦での初回登録は1987年である。	採用

【参考資料】銅に係る評価書：平成28年11月11日農薬小委員会（第54回）資料2
（抄）

③ 塩基性塩化銅・ミジンコ類急性遊泳阻害試験 [ii]（オオミジンコ）

オオミジンコを用いたミジンコ類急性遊泳阻害試験が実施され、 $48hEC_{50} = 61 \mu g/L$ であった。

ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験の結果得られた毒性緩和係数 47 を乗じて $48hEC_{50} = 2,870 \mu g/L$ であった。

表 13 ミジンコ類急性遊泳阻害試験結果

被験物質	原体								
供試生物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 20 頭/群								
暴露方法	半止水式（暴露開始 24 時間後に換水）								
暴露期間	48h								
設定濃度 ($\mu g/L$) (銅換算値)	0	5.8	18.7	58.3	187	583	1,870	5,830	
実測濃度 ($\mu g/L$) (時間加重平均値、 銅換算値)	0	2.6	8.0	22.9	58.9	157	491	1,370	
遊泳阻害数/供試 生物数 (48hr 後 ; 頭)	1/20	1/20	1/20	1/20	13/20	13/20	20/20	20/20	
助剤	硬化ヒマシ油 100mg/L								
EC_{50} ($\mu g/L$)	61 (95%信頼限界 40.2–94.6) (実測濃度 (銅換算値) に基づく)								

ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験（オオミジンコ）

オオミジンコを用いたミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験が実施され、毒性緩和係数は47であった。

表14 ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験結果

被験物質	原体			
供試生物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 20頭/群			
暴露方法	半止水式（暴露開始24時間後に換水）			
暴露期間	48h			
フミン酸 (HA) 設定濃度 (mg/L)	0	2.5	5	10
全有機炭素 (TOC) 実測濃度 (mg/L)	0	0.52	1.24	2.75
被験物質設定濃度 (μ g/L)	HA0	0、10、32、100、320、1,000、3,200、10,000		
	HA2.5 ~ 10	0、10、32、100、320、1,000、3,200、10,000、32,000、100,000		
助剤	なし			
EC ₅₀ (μ g/L)	HA0	108 (95%信頼限界 32 - 320)		
	HA2.5	2,980 (95%信頼限界 2,070 - 4,290)		
	HA5	5,060 (95%信頼限界 3,300 - 8,140)		
	HA10	7,150 (95%信頼限界 4,840 - 10,600)		
毒性緩和係数	5,060 (μ g/L) (EC ₅₀ (TOC1.5mg/L)) / 108 (μ g/L) (EC ₅₀ (HA0)) ≒47			

HA0 : フミン酸 0 mg/L

HA2.5 : フミン酸 2.5 mg/L

HA5 : フミン酸 5 mg/L

HA10 : フミン酸 10 mg/L

④塩基性硫酸銅・ミジンコ類急性遊泳阻害試験 [iv]（オオミジンコ）

オオミジンコを用いたミジンコ類急性遊泳阻害試験が実施され、48hEC₅₀ = 9.0 $\mu\text{g/L}$ であった。

ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験の結果得られた毒性緩和係数 6.8 を乗じて 48hEC₅₀ = 61.2 $\mu\text{g/L}$ であった。

表 16 ミジンコ類急性遊泳阻害試験結果

被験物質	原体					
供試生物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 20 頭/群					
暴露方法	半止水式 (暴露開始 24 時間後に換水)					
暴露期間	48h					
設定濃度 ($\mu\text{g/L}$) (銅換算値)	0	1.6	3.1	6.2	12.5	25.0
実測濃度 ($\mu\text{g/L}$) (時間加重平均値、 銅換算値)	0	1.4	2.8	5.5	10.4	20.0
遊泳阻害数/供試生物 数 (48hr 後 ; 頭)	0/20	0/20	0/20	4/20	10/20	20/20
助剤	硬化ヒマシ油 100mg/L					
EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	9.0 (95%信頼限界 7.5–11.0) (実測濃度 (銅換算値) に基づく)					

ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験（オオミジンコ）

オオミジンコを用いたミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験が実施され、毒性緩和係数は6.8であった。

表17 ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験結果

被験物質	原体			
供試生物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 20頭/群			
暴露方法	半止水式（暴露開始24時間後に換水）			
暴露期間	48h			
フミン酸（HA） 設定濃度 （mg/L）	0	2.5	5	10
全有機炭素 （TOC） 実測濃度 （mg/L）	0	0.67	1.36	2.82
被験物質設定濃度 （ μ g/L）	HA0	0、5.00、8.90、16.0、28.0、50.0		
	HA2.5 ~ 10	50.0、110、230、500、1,100、2,300、 5,000		
助剤	なし			
EC ₅₀ （ μ g/L）	HA0	25.7（95%信頼限界 22.3 - 29.6）		
	HA2.5	94.0（95%信頼限界 77.7 - 111）		
	HA5	172（95%信頼限界 110 - 230）		
	HA10	293（95%信頼限界 230 - 500）		
毒性緩和係数	176（ μ g/L）（EC ₅₀ （TOC1.5mg/L）） / 25.7（ μ g/L）（EC ₅₀ （HA0）） ≒6.8			

HA0 : フミン酸 0 mg/L

HA2.5 : フミン酸 2.5 mg/L

HA5 : フミン酸 5 mg/L

HA10 : フミン酸 10 mg/L