

水稻用除草剤イプフェンカルバゾンの薬効薬害および
作用機作に関する研究

2019年1月

笠原 達矢

水稻用除草剤イプフェンカルバゾンの薬効薬害および
作用機作に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士(農学)学位論文

笠原 達矢

目次

緒言	1
第1章 イプフェンカルバゾンの除草効果および水稲安全性に対する環境要因の影響	7
1-1 供試薬剤および栽培条件	10
1-2 温度条件別のノビエに対する除草効果および水稲薬害	10
1-3 土壌別のノビエに対する除草効果および水稲薬害	14
1-4 漏水条件別のノビエに対する除草効果および水稲薬害	19
1-5 異なるオーバーフロー(田面水流亡)条件別のノビエに対する除草効果	23
1-6 湛水深別のノビエに対する除草効果および水稲薬害	27
1-7 落水処理後、再湛水するまでの時間別の水稲薬害	29
1-8 考察	31
第2章 イプフェンカルバゾンの超長鎖脂肪酸(VLCFA)生合成に及ぼす影響	37
2-1 供試薬剤および供試植物	41
2-2 イネおよびタイヌビエの生育に及ぼす影響	41
2-3 植物の VLCFA elongase (VLCFAE)に及ぼす影響	46
2-4 植物の VLCFAE に対する阻害様式の検討	51
2-5 考察	56

第 3 章 総合考察	61
摘要	67
謝辞	70
引用文献	71

略語一覧

ACCCase : アセチル-CoA カルボキシラーゼ

a.i. : 有効成分(active ingredient)

ALS : アセト乳酸合成酵素

2,4-D : 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

BSA : ウシ血清アルブミン

DDT : ジクロロジフェニルトリクロロエタン

DTT : ジチオスレイトール

DMSO : ジメチルスルホキシド

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

FAS : 脂肪酸合成酵素

GST : グルタチオン S 転移フェラーゼ

HEPES : 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン-1-スルホン酸

LCFA : 長鎖脂肪酸

NADH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADPH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

PCP : ペンタクロロフェノール

PMSF : フェニルメチルスルホニルフルオリド

PVPP : ポリビニルポリピロリドン

SU : スルホニルウレア

VLCFA : 超長鎖脂肪酸

緒言

現在、世界人口は 70 億人を超え、今後も発展途上国を中心に人口増加が続き、2050 年には 90 億人を超えると予測されている(1)。この人口増加に伴い、増し続ける食糧需要を満たすためには、2012 年水準比で 50%の食糧および飼料の増産が必要と推計されている(2)。一方、農業用地は 1965 年から 2015 年までの 50 年間でわずか 8%しか増加しておらず(3)、今後も農業用地の急激な増加は期待できない。さらに、近年の温暖化等の気候変動によって、将来、現在の農業用地の一部が消失するとの推測がなされていることも踏まえると(4)、将来に向けて、単位面積当たりの収量、生産効率の向上が急務と言える。

収量、生産効率の向上に向けて、全世界で、人工光型植物工場の開発、徐放性肥料等の新規化学肥料の開発、農地集約や農業機械の導入などによる生産活動の効率化、「緑の革命」に代表される高収量品種の育成および遺伝子組換え作物の導入などが取り組まれているが、農薬による病害虫・雑草の防除が、依然として、品質・収量の安定化に重要な役割を担っている。例えば、(一財)日本植物防疫協会(5)が実施した農薬を使わずに作物・果樹類を栽培管理試験において、農薬を使用した栽培管理に比べ、水稻作で平均 24%の減収、果樹類のリンゴについては平均 97%も減収してしまったことが報告されている。また、(公財)日本植物調節剤研究協会によると、水稻作において収穫時まで雑草防除を全く行わなかった場合、平均 41%の減収を招いたことが報告(6)されており、安定的な収量を確保するためには、農薬による病害虫・雑草防除が非常に重要であることが明らかとなっている。

農薬は、1938 年にジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)が開発されて以降、現在も、活性の向上および低薬量化、作物や人体に対

する安全性の向上、周辺環境等への残留性の低減を目的とした新規原体の創成研究が進められている。日本国内における除草剤の歴史に焦点をあててみると、1950年に初めて日本国内初の除草剤登録を取得した2,4-Dは、広葉雑草に対して高い殺草活性を示す一方で、強害雑草であるノビエ類に対する活性が低かったため、依然として手取り除草が欠かせず、除草作業時間の低減にはつながらなかった。これらの課題を解決すべく、1960年にペンタクロロフェノール(PCP)、1969年にベンチオカーブといったノビエに対しても高い除草活性を示す除草剤が開発され、1980年にはオモダカ、ウリカワといった多年生雑草に対しても高い除草活性を有するピラゾレート等が開発され、除草剤のスペクトラムの拡大、高性能化が進んだ。また、投下薬量についても、1960年代に開発されたベンチオカーブを始めとするカーバメート系除草剤は1500～3000 g a.i.(active ingredients)/ha必要であったのに対し、1984年に登録されたクロロアセトアミド系除草剤のプレチラクロールは240～600 g a.i./ha、2000年に登録されたテトラゾリノン系除草剤のフェントラザミドは200～300 g a.i./haと低薬量化が進み、特に、1970年代に登場したベンスルフロンメチルを始めとするスルホニルウレア(SU)系除草剤にいたっては、標準処理薬量が10 g a.i./ha以下となり、1960年代の剤と比べ、薬量はおよそ1/100になり、自然環境中への残留リスクの低減につながった。さらに、副次的な効果として、薬量が少なくなったことにより製剤処方技術の改良が促進され、1993年には、当時の主流であった「3キロ粒剤」から10aあたりの処理量が1/3になる「1キロ粒剤」が開発され、近年においては、「豆粒剤」や「ジャンボ剤」などの処理量がより少なくなかつ簡便で省労力な散布が可能な製剤の開発にもつながった。また、1950年から60年代初頭

えば、上記、PCPは魚毒性が高く、水田に散布したPCPの一部が周辺の河川に流出し、魚介類へ多大な損害を与えた事例が発生し大きな社会問題となった。これらの諸問題が発生した反省を生かし、農薬原体メーカーは、低毒性の農薬原体の開発を進め、今般、農薬登録を有する原体は、農薬取締法の改正による種々の毒性試験の義務化および厳格化もあいまって、人体や自然環境に対する安全性が十分に担保されたものとなっている。

以上の農薬原体メーカーの多岐に渡る研究開発の結果、様々な除草剤が開発、農薬登録され、日本の水稻栽培における除草作業に要する時間は、2,4-Dが登録される直前の1949年で10a当たり50.6時間要していたが、薬剤散布回数および防除にかかわる作業時間は減少していき、2010年には10a当り1.4時間で済むまでとなり(6)、水稻栽培における生産効率の向上に多大な貢献を果たした。

一方で、近年、特定の作用機序を持つ除草剤に対して抵抗性を示す雑草の出現が世界的に報告されている。日本国内においても、1980年に光合成阻害剤であるパラコートに対して抵抗性を示すハルジオンが確認されて以降、各種除草剤に抵抗性を示す雑草種の報告事例が増加し続け、現在、SU剤(アセト乳酸合成酵素(ALS)阻害剤)抵抗性を中心に6種類の作用機序に対し、36種の雑草で抵抗性の発生が確認(7)されており、新たな作用機序を持つ新規成分の開発が求められている。

また、日本国内においては、近年、農業従事者の減少および高齢化という新たな課題が生まれている。農水省は、1960年にはおよそ1454万人いた農業従事者が、2015年には209万人とおおよそ1/7にまで減少したと報告している(8)。農業従事者の平均年齢についても、農業就業者に占める65歳以上の比率は2000年には50%を超え、現在、66%まで比率が高まり、高齢化が深刻化している。このような状況下で、新

規若手就農者を増大するべく、農業機械購入の助成金や新規就農者を対象とした奨励金制度の拡充を推し進めている。しかしながら、新規就農者へのアンケートにおいて、参入1～2年目で経営上困っていることの第1位に「所得の少なさ」を挙げる方が30.8%と、依然として、農業就農者の更なる拡大に対して、所得の向上、安定化など経済面の改善が課題となっている。この課題を解決するため、農薬メーカーには、農薬資材費用の低減はもとより、人件費等の低減化を目的に、更なる高性能な農薬、より簡便かつ省労力な処理方法の開発が求められている。

これらの要望を受けて、新たな省労力農薬施用方法の一つとして、「田植同時処理」技術の開発、普及が進んでいる。田植同時処理は、田植機に専用の散布機械を取り付け、移植と同時に薬剤処理する方法である。この処理方法は、別途、雑草防除作業にかける時間を軽減することができ、省労力化かつ人件費の低減につながる。また、田植同時処理散布機は、田植機の走行速度に連動して一定間隔で薬剤を散布するため、均一散布を簡便に行うことができる。さらに、移植した苗の株元付近に薬剤が散布されるため、周辺圃場、作物へのドリフトリスクも非常に小さくなるといった特長がある。一方で、実際に田植同時処理を実施した圃場において、栽培期間後半に雑草の後発生や、移植水稻に対する甚大な薬害が散見され、田植同時処理が問題視される事態も発生した。そのため、本処理方法の普及が進み、使用面積が拡大するに伴い、雑草に対して長い残効性を示すと共に、雑草と水稻の間で高い選択性を持つ新規成分の開発がより望まれるようになった。

こういった社会的背景の下、北興化学工業株式会社は、水稻作における強害雑草の一つであるノビエ類に対し、低薬量で高い除草活性を示すと同時に、田植同時処理で使用した際にも水稻に対して高い安全

性を示す新規除草剤の創成に取り組み、イプフェンカルバゾン(1-(2,4-dichlorophenyl)-2',4'-difluoro-1,5-dihydro-*N*-isopropyl-5-oxo-4*H*-1,2,4-triazole-4-carboxanilide)(商品名：ファイター)を見出した(Fig.0-1)。

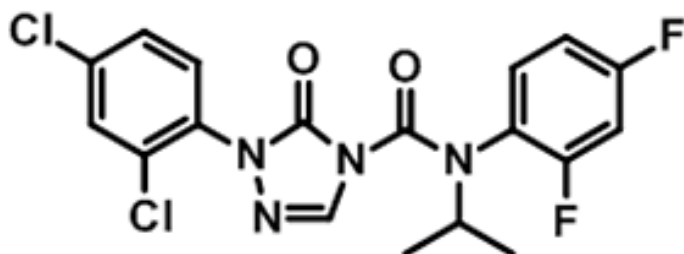
本論文では、イプフェンカルバゾンの新規水稲用除草剤としての特長を詳細に把握することを目的に、本剤のノビエ類に対する除草効果および水稲に対する薬害安全性に対して、実使用場面において想定される環境要因が与える影響を評価し、本剤の特長を最大限発揮させる適切な使用方法および使用に際して注意すべき要因について検討を行った。さらに、本剤の作用機構および作用点に対する阻害様式について詳細な検討を行い、本剤の特長の一つである水稲とノビエ類の間で高い選択性を示す要因について解析した。

Common name (ISO name): Ipfencarbazone

Chemical name:

1-(2,4-dichlorophenyl)-2',4'-difluoro-1,5-dihydro-*N*-isopropyl-5-oxo-4*H*-1,2,4-triazole-4-carboxanilide

Chemical structure:



Molecular formula: $C_{18}H_{14}Cl_2F_2N_4O_2$

Molecular weight: 427.23

Appearance (physical state, form and color): Solid, Fine powder, white to off-white

Melting point: 133.8-137.3°C

Vapor pressure: 9.8×10^{-8} Pa

Water solubility: 0.515 mg/L (20°C)

Partition Coefficient: Log Pow; 3.0 (25°C)

Fig. 0-1 Chemical properties of ipfencarbazone.

*Source: A novel herbicide, ipfencarbazone. (HOK-201) (22)

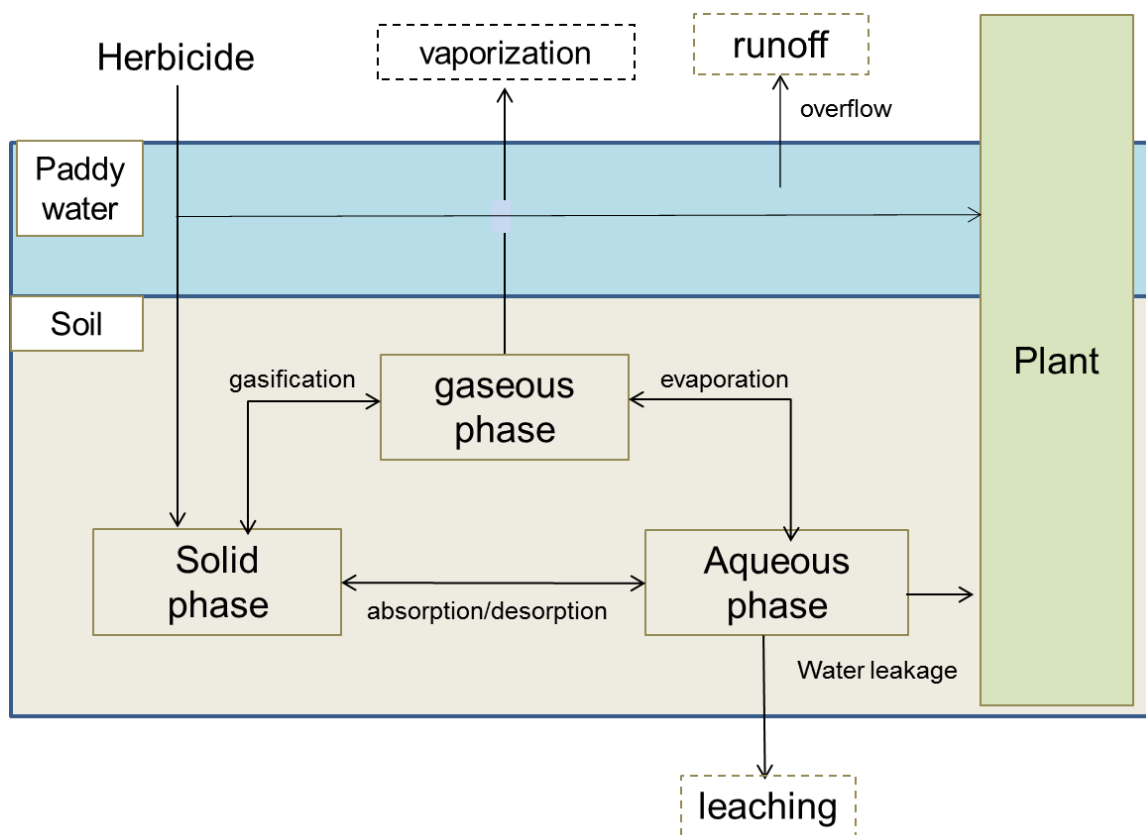
第1章 イプフェンカルバゾンの除草効果および水稻安全性に対する環境要因の影響

イプフェンカルバゾンは、2013年に移植水稻を対象に農薬登録を取得した土壌処理型除草剤である。本剤は、250 g a.i./haの薬量で、ノビエを始め、アゼナ類やコナギ等の一年生広葉雑草、タマガヤツリ等の一年生カヤツリグサ、イヌホタルイやミズガヤツリといった多年生雑草に対して除草効果を示す(9)。特に、ノビエに対しては、発生前から3葉期までの生育が進んだ個体にまで高い除草効果を示す。さらに、圃場試験において、本剤はノビエの発生を60日以上抑制し続けたことが報告されており(10)、残効性にも優れている。一方で、本剤は、水稻が活着する前の移植直後処理においても、水稻の生育をほとんど抑制せず、水稻に対して高い安全性を示したことが報告されている(9)。これらの特長は、2008年より委託を開始した(公財)日本植物調節剤研究協会の公的試験を始め、日本各地の実圃場において確認されており、2018年には初中期一発剤の混合母剤として、約18万haの水田で使用するまでに至っている。

一般に、除草剤の効果は、植物との相互作用によって発現するため、植物の生育ステージや状態、除草剤に対する吸収能および解毒・代謝能などの生理特性によって変動すると考えられている。また、除草剤の施用方法として、対象とする雑草に直接施用する「茎葉処理」と土壌を介して施用する「土壌処理」の2種類に大別されるが、「土壌処理」は、土壌に薬剤が施用された後、対象とする雑草に吸収されるまで、土壌表面からの揮散、土壌粒子への吸着、土壌水もしくは土壌粒子の流出に伴う系外への流亡などの作用を受ける(11)(Fig. 1-1)。これらの作用は、土壌粒径や有機物含量等の土壌組成に加え、薬剤自身の水溶解

度や腐植質等の土壤有機物に対する吸着性などの物理化学的特性が影響するため、雑草と作物の吸収部位の位置を変えることで、薬剤の吸収能の差を物理的に生み出し、選択性を示している薬剤によっては、特定の条件、環境下において、効果不足あるいは薬害の発生といった問題が発生することが報告されている(12,13,14)。

本章では、多くの土壤処理型除草剤の薬効薬害に影響を及ぼすことが報告されている温度(12)、土性(13)、漏水(13)、オーバーフロー(14)が、イプフェンカルバゾンのノビエに対する除草効果および移植水稻への薬害安全性に与える影響について検討し、本剤の環境要因に対する特性について解析した。さらに、近年、普及面積が拡大している田植同時処理に対する適用性評価を目的に、田植同時処理が通常薬剤処理と異なり、薬剤処理前後で湛水深が大きく変動することに着目し、湛水深の影響および薬剤処理後、再湛水するまでの時間が本剤のノビエに対する除草効果ならびに移植水稻に対する薬害安全性に及ぼす影響についても検討した。



*Kobayashi(12), partially modified.

Fig.1-1. Herbicide behavior in paddy field

1-1. 供試植物および供試薬剤

除草効果は、神奈川県厚木市内の水田で採取したノビエ(イヌビエ (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. var. *crus-galli*)、ヒメタイヌビエ (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. var. *formosensis* Ohwi)、タイヌビエ (*Echinochloa oryzicola* Vasing)の3種が混在)を用い、作物に対する安全性は、水稻(*Oryza sativa* (L.) cv. Nipponbare)を用いて評価を行った。イプフェンカルバゾンは1%の非イオン性界面活性剤(商品名：ハイテンパワー)を含む10%アセトン溶液にイプフェンカルバゾン原体(純度、99.5%)を使用当日に溶解させて用いた。また、記載のない限り、各試験は、ガラス温室内(自然光、最低気温/最高気温：13.6℃/32.1℃)にて行い3反復で行った。

1-2. 温度別のノビエに対する除草効果および水稻薬害

材料および試験方法

1/5000 a のワグネルポットに神奈川県厚木市の水田土壌(以下、厚木水田土壌)を充填し、代掻きした(土壌特性は Table 1-1 に記載した)。代掻き後、土壌表面に催芽したノビエを1ポット当たり20粒程度播種、もしくは2.1葉期の水稻(3本/株)を移植深度2cmで移植し、水深3cmとなるよう湛水した。次いで、これらのポットを日中気温/夜間気温を30℃/25℃、25℃/20℃、20℃/15℃(周期：日中；14時間、夜間；10時間)となるよう設定した人工気象室内に設置し、ノビエが3葉期に到達した時、もしくは水稻移植当日にイプフェンカルバゾン溶液を、250 g a.i./ha 相当量、田面水に滴下処理した。なお、ノビエは薬剤処理時まで、5本/ポットとなるよう間引いた。また、いずれのポット

も漏水処理は行わず、試験期間中、水深が 3 cm となるよう水管理した。

除草効果および水稻薬害は、薬剤処理 30 日後に植物体を抜き取り、茎葉部乾物重量を測定し、無処理区対比での抑制率を算出することで評価した。さらに、得られたデータは SPSS Statistic 24.0(IBM Japan Corp.)を用いて Tukey 法による多重検定比較を行い、 $p < 0.05$ の場合、有意差があるとみなした。

結果

30°C/25°C、25°C/20°Cの温度条件下において、イプフェンカルバゾンは、3 葉期のノビエを完全に枯殺した。20°C/15°C条件下においても、1 個体の残草が認められたものの、残草個体の生育は薬剤処理時とほぼ同じ状態で停止しており、統計上においても、温度条件間において、除草効果の有意差は認められなかった。また、本剤は 25°C/20°C、20°C/15°Cの温度条件下において、水稻に対して顕著な薬害症状等はなく、茎葉部乾物重量の減少も認められなかった。一方、30°C/25°Cの温度条件下において、茎葉部乾物重量の減少が認められたが、その減少率は 7.8%と軽微であり、統計上、温度条件の違いによる有意差も認められなかった(Fig. 1-2)

Table 1-1 Characteristic of tested soils.

location	Soil type	Particle size distribution (%)				Organic matter (%)	pH (H ₂ O)
		Coarse sand	Fine sand	Silt	Clay		
Atsugi	Light clay	18.9	25.7	29.4	26.0	2.57	6.8
Kasumigaura	Sandy loam	1.4	82.8	8.4	7.4	2.95	5.9

*The physical characteristics of the tested soils were analyzed by PALYNO SURVEY CO. Ltd., Japan.

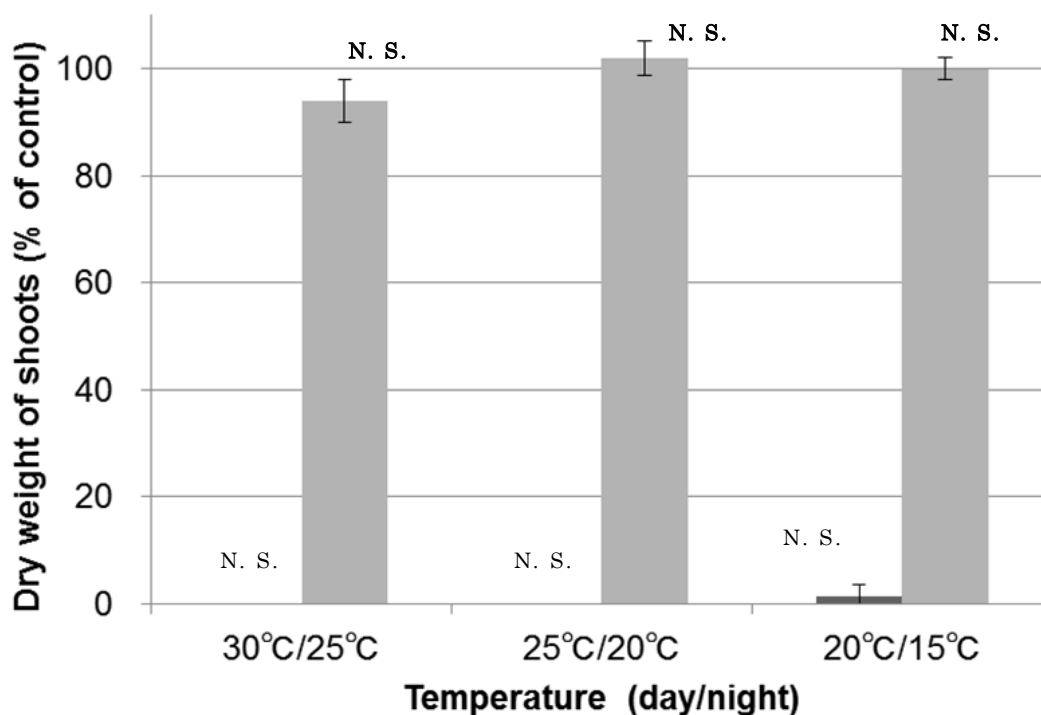


Fig. 1-2 Effects of temperature on herbicidal activity of ipfencarbazone against *Echinochloa* spp. (■) at the 3.0 leaf stage and its phytotoxicity to rice seedlings (■) just after transplanting at a dose of 250 g a.i./ha. Dry weight was measured 30 days after application. Vertical bars represent \pm standard deviation (SD).

1-3. 土壌別のノビエに対する除草効果および水稻薬害

材料および試験方法

供試土壌として、厚木水田土壌もしくは茨城県かすみがうら市の水田土壌を用いた(土壌特性は Table 1-1 に記載した)。1/5000 a ワグネルポットにこれらの土壌のいずれかを充填し、代掻きした。次いで、1-2の試験と同様の条件でノビエの播種、水稻の移植、イプフェンカルバゾン溶液の処理を行った。除草効果および水稻薬害は、薬剤処理 28 日後に各植物体を抜き取り、茎葉部乾物重量を測定し、抑制率を算出することで評価した。また、土壌間差について、1-2 と同様の統計解析を行い、評価した。

さらに、以下の方法でノビエに対する残効性を検討した。1/5000 a ワグネルポットに上記、2 種類の土壌のいずれかを充填し、代掻きした。次いで、土壌表面に催芽したノビエを 4~5 粒播種し、湛水深が 3 cm になるよう湛水した。播種翌日にイプフェンカルバゾン溶液を 250 g a.i./ha 相当量、田面水に滴下処理した。その後、薬剤処理後 7 日間隔で、土壌表面に催芽したノビエを 4~5 粒、播種地点が重ならないように播種し、播種 28 日後に茎葉部の生育を観察調査し、0(無影響)~100%(発生なし(完全枯死))の 101 段階にて抑制程度を評価した(Fig. 1-3)。なお、いずれの試験とも漏水処理は行わず、試験期間中、水深 3 cm を維持した。

結果

イプフェンカルバゾンは、両土壌条件とも 3 葉期のノビエに対して、枯死には至らないものの生育を完全に止める強い抑制効果が認められた。また、土壌条件間における茎葉部乾物重量の差はわずかであり、

統計上の有意差は認められなかった。移植水稻に対しても、両土壌とも茎葉部乾物重量の減少はわずかであり、土壌の違いによる有意差は認められなかった(Fig. 1-4)。

ノビエに対する残効性について、本剤は、いずれの土壌とも薬剤処理 56 日後までノビエの発生を完全に抑えた。薬剤処理 63 日以降、ノビエに対する抑制効果は、時間と共に低下する傾向を示したが、いずれの土壌とも薬剤処理 70 日後まで 90%を超える高い抑制効果が維持された。また、土壌間で各調査時期における残効性に違いは認められなかった(Fig. 1-5)。

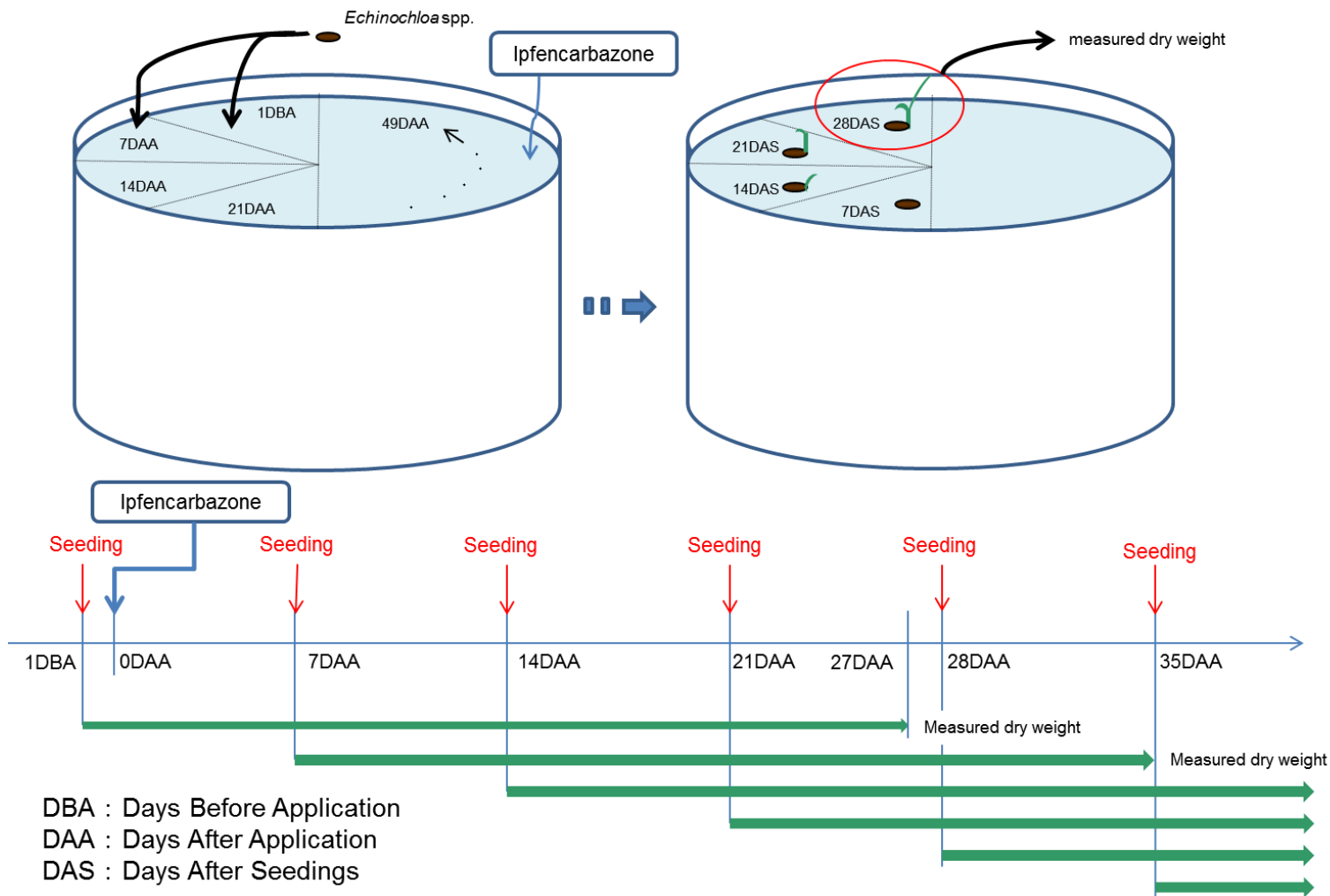


Fig. 1-3 The workflow of residual activity test.

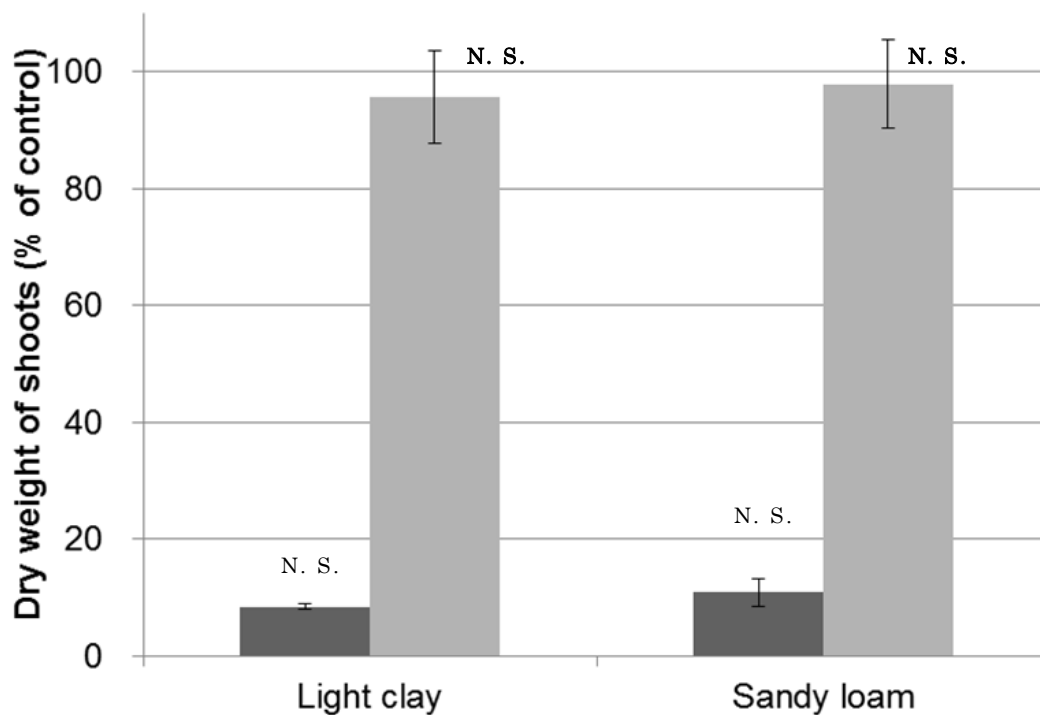


Fig.1-4 Effects of soil texture on herbicidal activity of ipfencarbazone against *Echinochloa* spp. (■) at the 3.0 leaf stage and its phytotoxicity to rice seedlings (■) just after transplanting at a dose of 250 g a.i./ha. Dry weight was measured 28 days after application. Vertical bars represent \pm SD.

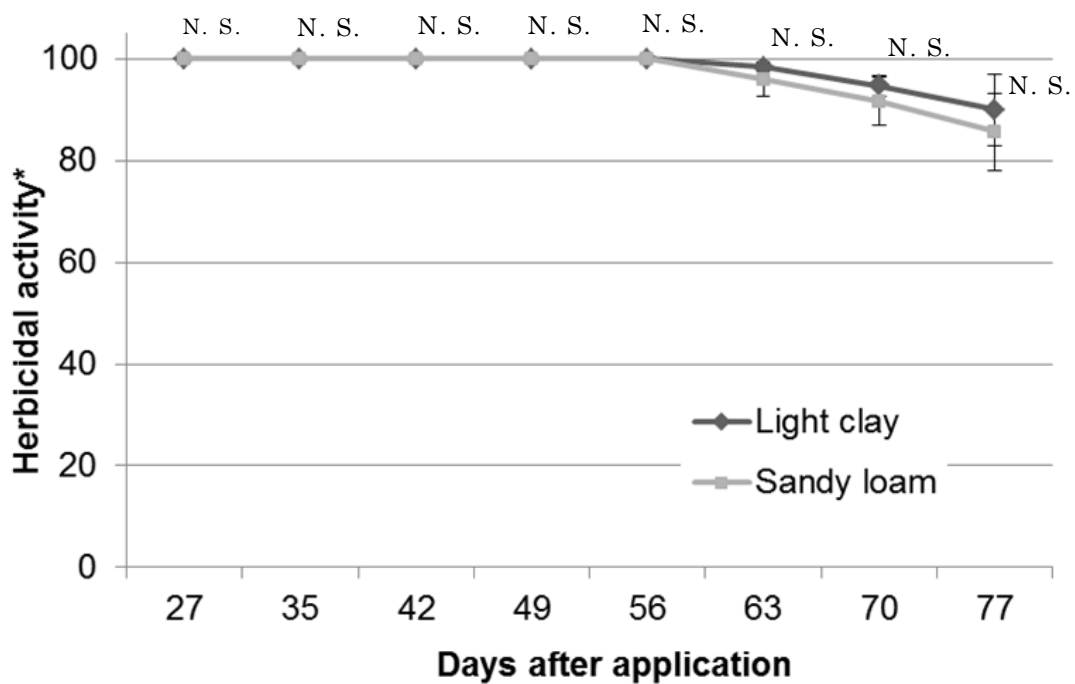


Fig. 1-5 Effect of soil texture on the residual activity of ipfencarbazone against pre-emergent *Echinochloa* spp. at a dose of 250 g a.i./ha. Herbicidal activity was evaluated visually 28 days after sowing. Vertical bars represent \pm SD. *Rating scale, 0% (no weed control) to 100% (complete inhibition)

1-4. 漏水条件別のノビエに対する除草効果および水稻薬害

材料および試験方法

1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填し、土壌の代掻きをした後、1-2 と同様の方法で、ノビエの播種、水稻の移植、薬剤処理を行った。漏水操作として、薬剤処理翌日から 5 日間、2 cm/日相当の水をポットの排水孔より自然排水した。なお、漏水操作中は、水深が 1 cm 以下になった際に、水深が 3 cm になるまで入水し、操作終了後は常時、水深 3 cm を維持した。除草効果および水稻薬害は、薬剤処理 28 日後に各植物体の茎葉部乾物重量を測定し、評価した。また、1-2 と同様の統計解析を行い、漏水条件間における有意差の有無を検討した。

また、ノビエに対する残効性は 1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填した後、1-3 の残効性試験と同様の方法で、土壌の代掻き、雑草の播種、薬剤処理、残効性の評価を行った。漏水操作は、薬剤処理翌日より 5 日間、1 cm/日、もしくは 2 cm/日相当の水を排水した。漏水操作の方法および操作後の水管理は上記と同様の管理を行った。

結果

イプフェンカルバゾンには、漏水の有無に関わらず 3 葉期のノビエに対して、95%を超える高い除草効果が認められ、漏水条件間における有意差も認められなかった。移植水稻に対する薬害も同様に、地上部乾物重量の減少は漏水条件に関わらず軽微であり、漏水条件間の有意差も認められなかった。(Fig. 1-6)

ノビエに対する残効性について、本剤は、薬剤処理 56 日後まで漏水

量に関わらずノビエの発生を完全に抑制した。薬剤処理 63 日後以降、1 日あたりの漏水量が増加するに従い、抑制効果の低下も大きくなる傾向が認められた。しかし、いずれの漏水条件とも、薬剤処理 70 日後まで、90%を超える抑草効果が認められた。さらに、漏水条件間で各調査時期における抑制程度の有意差も認められなかった。(Fig. 1-7)

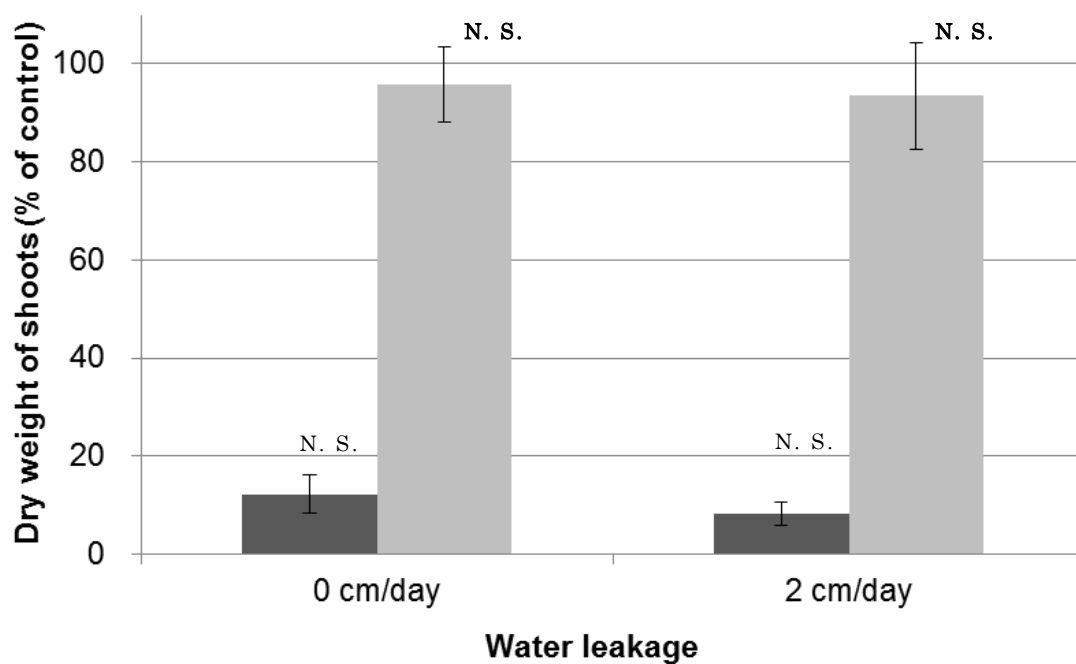


Fig. 1-6 Effects of water leakage on the herbicidal activity of ipfencarbazone against *Echinochloa* spp. (■) at the 3.0 leaf stage and its phytotoxicity against rice seedling (■) just after transplanting at a dose of 250 g a.i./ha. Dry weight was measured 28 days after application. Vertical bars represent \pm SD.

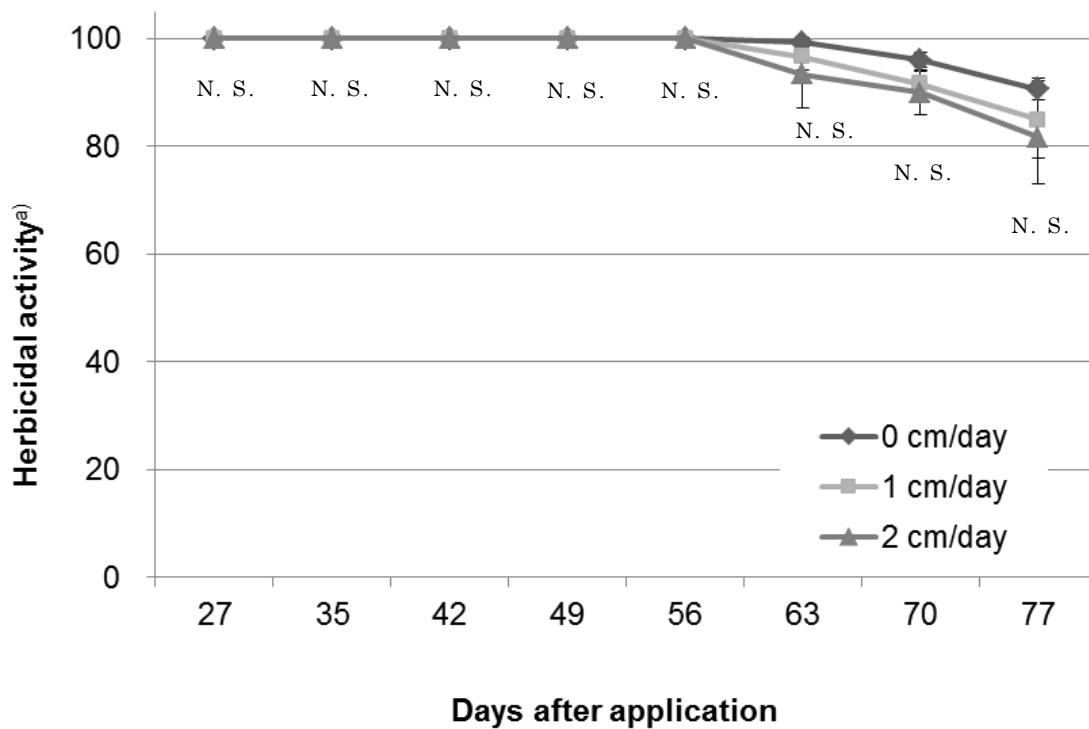


Fig. 1-7 Effect of water leakage on residual activity of ipfencarbazone against pre-emergent *Echinochloa* spp. at a dose of 250 g a.i./ha. Herbicidal activity was evaluated visually 28 days after sowing. Vertical bars represent \pm SD. *Rating scale, 0% (no weed control) to 100% (complete inhibition)

1-5. 異なるオーバーフロー(田面水流亡)条件別のノビエに対する 除草効果

材料および試験方法

1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填し、湛水、代掻きした。次に、1-2 と同様の方法で、ノビエの播種、薬剤処理を行った。オーバーフローについては、薬剤処理後、急激な降雨によって田面水が圃場外に流亡した条件を想定し、森田ら(15)の方法に準拠し、薬剤処理 3 時間後、6 時間後、24 時間後に 100 mm 降雨相当の田面水を水道水と交換した。除草効果は、薬剤処理 31 日後にノビエの茎葉部乾物重量を測定し、評価した。また、1-2 と同様の統計解析を行い、オーバーフロー条件における有意差の有無を検討した。

また、ノビエに対する残効性は、1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填した後、1-3 の残効性評価試験と同様の方法で、土壌の代掻き、ノビエの播種、薬剤処理を行い、評価した。オーバーフロー操作は上記と同様の方法を用い、薬剤処理 6 時間後に 50 mm もしくは 100 mm 降雨相当の田面水を水道水と交換した。なお、いずれの試験とも漏水処理を行わず、試験期間中、水深 3 cm を維持した。

結果

薬剤処理 3 時間後の田面水交換条件において、3 葉期のノビエに対するイプフェンカルバゾンの生育抑制効果が弱く、ノビエの茎葉部乾物重量の増加が認められた。しかし、薬剤処理 6、24 時間後の田面水交換条件では、無交換条件と同等の生育抑制効果が認められ、無交換条件との間で有意差は認められなかった。(Fig. 1-8)

ノビエに対する残効性に対して、本剤は、田面水の交換水量に関わら

ず、薬剤処理 56 日後までノビエの発生を完全に抑制した。薬剤処理 63 日後よりノビエの発生が認められ、交換する水量が多くなるにつれて、ノビエの発生を抑制する期間が短くなる傾向が認められたが、条件間で、各調査時期の抑制程度に差は認められなかった。(Fig. 1-9)

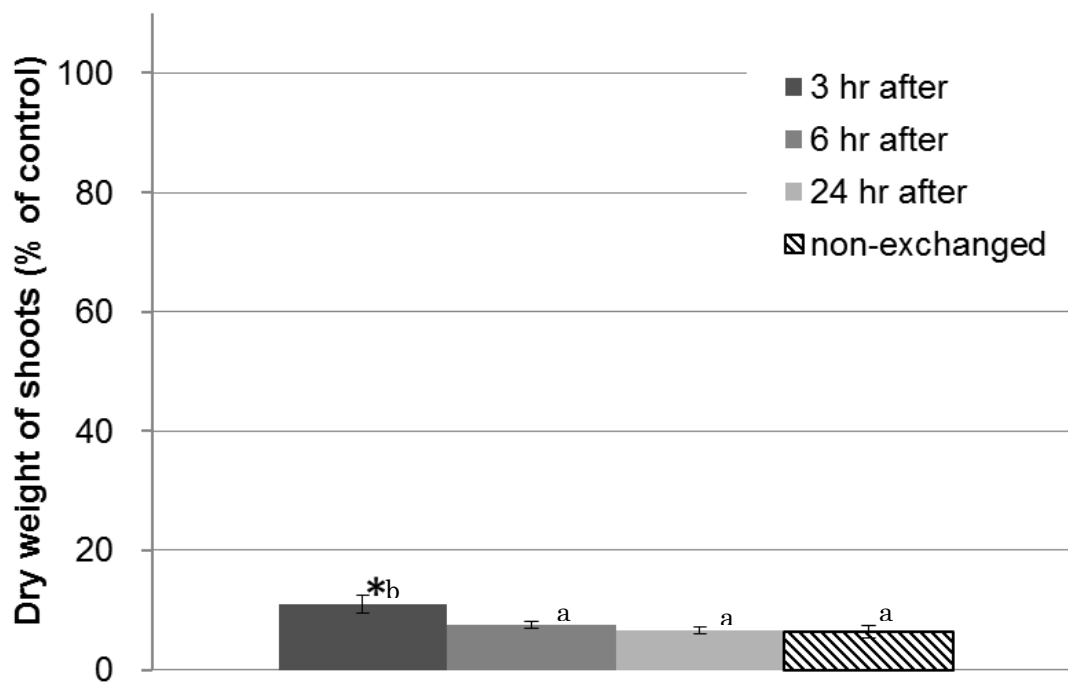


Fig. 1-8 Effect of exchanged paddy water on the herbicidal activity of ipfencarbazone against *Echinochloa* spp. at the 3.0 leaf stage at a dose of 250 g a.i./ha. Dry weight was measured 31 days after application. Vertical bars represent \pm SD. The asterisk (*) indicates that a significant difference was observed among the conditions with no-exchanging of paddy water.

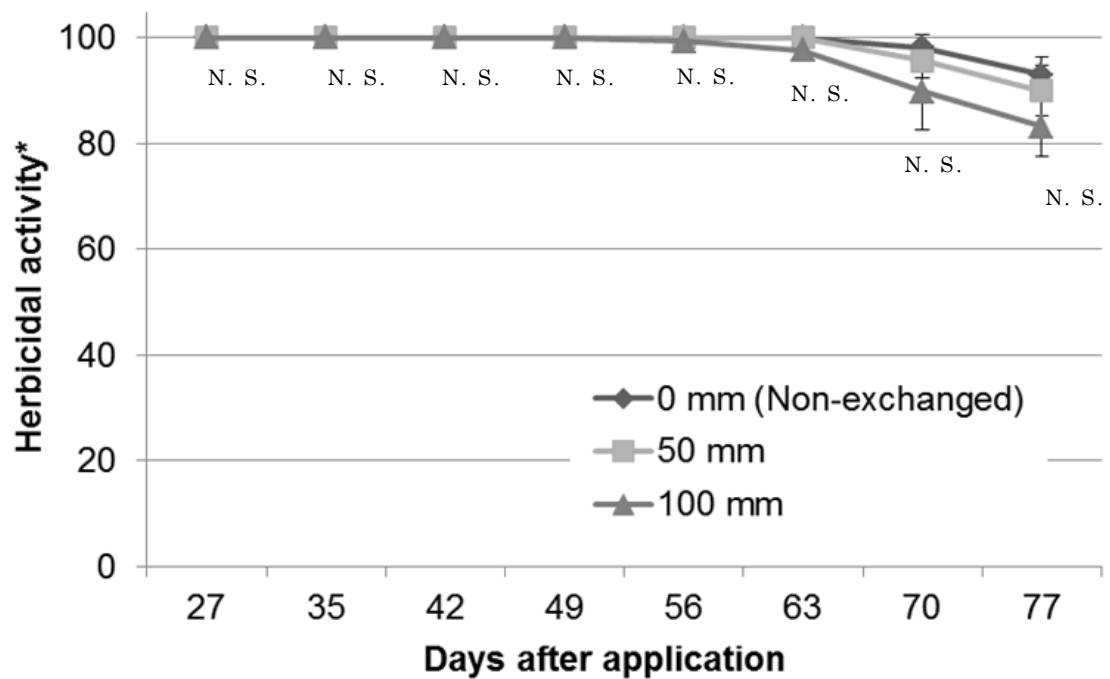


Fig. 1-9 Effect of exchanged paddy water on the residual activity of ipfencarbazone against pre-emergence *Echinochloa* spp. at a dose of 250 g a.i./ha. Herbicidal activity was evaluated visually 28 days after sowing. Vertical bars represent \pm SD. *Rating scale, 0% (no weed control) to 100% (complete inhibition)

1-6. 湛水深別のノビエに対する除草効果および水稻安全性

材料および試験方法

1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填し、代掻きした。次に、1-2 に記載されている方法と同様に、雑草の播種、水稻の移植、薬剤処理を行った。薬剤処理時の湛水深は 1 cm、3 cm、8 cm のいずれかに調整した。除草効果および水稻薬害は薬剤処理 30 日後に各植物を抜き取り、茎葉部乾物重量を測定し、抑制率を算出することで評価した。また、1-2 と同様の統計解析を行い、湛水深条件間における有意差の有無を検討した。なお、試験期間中、漏水処理は行わず、薬剤処理時の水深を維持した。

結果

イプフェンカルバゾン は、3 葉期のノビエに対して、いずれの湛水深条件においても 90% を超える高い除草効果が認められ、湛水深条件間における有意差も認められなかった。また、水稻薬害についても同様に、移植水稻の茎葉部乾物重量の減少は、湛水深条件に関わらず、いずれも極わずかであり、湛水深条件の違いによる有意差も認められなかった。(Fig. 1-10)

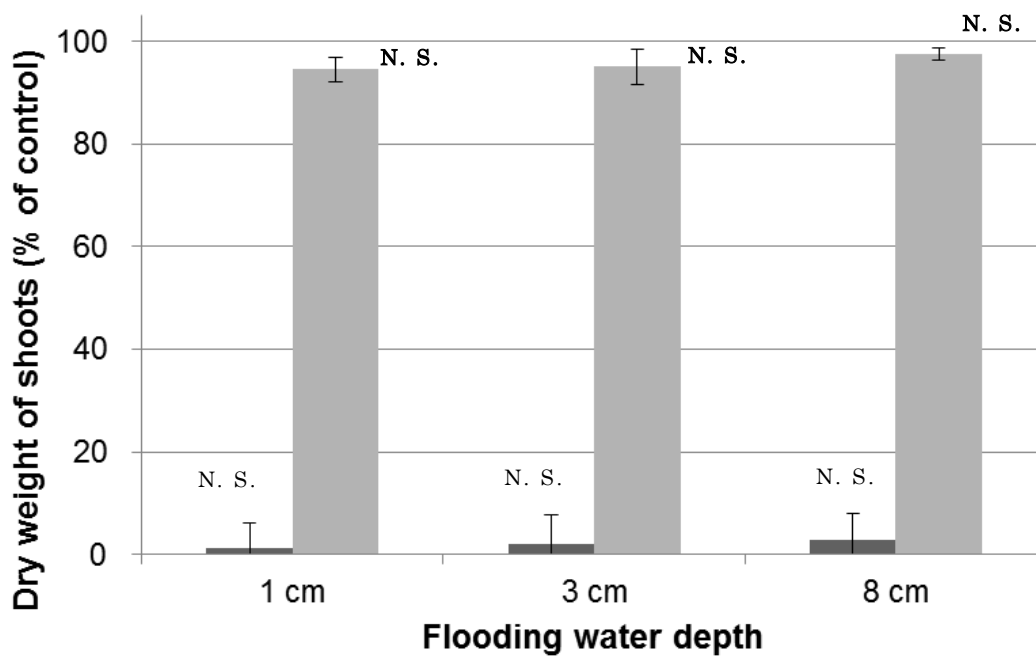


Fig. 1-10 Effects of flooding water depth on the herbicidal activity of ipfencarbazone against *Echinochloa* spp. (■) at the 3.0 leaf stage and its phytotoxicity against rice seedlings (■) just after transplanting at a dose of 250g a.i./ha. Dry weight was measured 30 days after application. Vertical bars represent \pm SD.

1-7. 落水処理後、再湛水するまでの時間別の水稻薬害

材料および試験方法

1/5000 a のワグネルポットに厚木水田土壌を充填し、代掻きした。次に、2.1 葉期の水稻(3本/株)を移植深度 2 cm で移植した。その後、土壌表面が完全に露出するまで田面水を除去し、水稻の株元から凡そ 2 cm 離れた地点にイプフェンカルバゾン溶液を 250 g a.i./ha 相当量、土壌処理した。薬剤処理 3 時間後、6 時間後、24 時間後に湛水深が 3 cm となる様に入水し、その後、試験期間中、湛水深 3 cm を維持した。なお、試験期間中、漏水処理を行わなかった。水稻薬害は、薬剤処理 30 日後に植物体を抜き取り、茎葉部乾物重量を測定し、抑制率を算出することで評価し、再湛水するまでの時間の条件間における有意差については、1-2 と同様の統計解析を行うことで検討した。

結果

薬剤処理から再湛水するまでの時間の間隔が空くにつれて、移植水稻の乾物重量の減少が大きくなる傾向が認められた。しかしながら、本剤処理 3 時間もしくは 6 時間後に再湛水した条件において、移植水稻の茎葉部乾物重量の減少は 5% 以下であり、薬害症状も認められなかった。また、薬剤処理 24 時間後に再湛水した条件下では、他の条件に比べ、茎葉部乾物重量の減少がやや大きかったものの、統計上、薬剤処理から再湛水までの時間の違いによる有意な効果差は認められなかった。(Fig. 1-11)

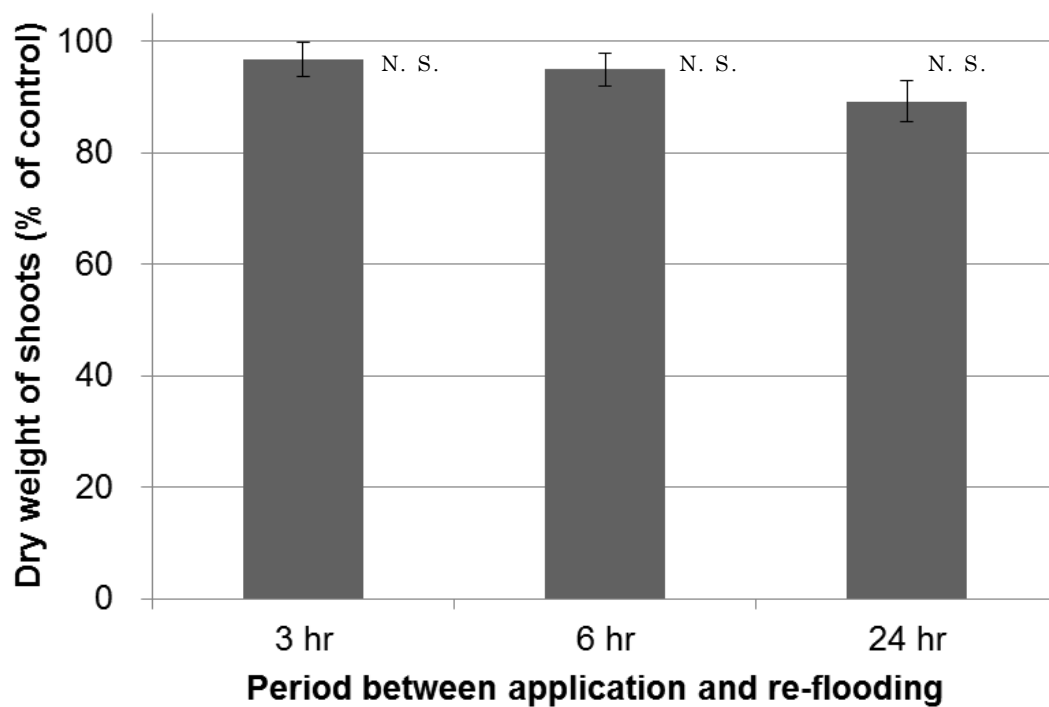


Fig. 1-11 Effect of the period from herbicide application to reflooding on the phytotoxicity of ipfencarbazone against rice seedlings at just after transplanting at a dose of 250 g a.i./ha. Dry weight was measured 30 days after application. Vertical bars represent \pm SD.

1-8 考察

本章では、イプフェンカルバゾンのノビエに対する除草効果および移植水稻に対する安全性に対して、実使用場面において想定される様々な環境変動要因が与える影響を検討した。

本剤のノビエに対する除草効果および水稻安全性について、日本国内の水稻移植時に想定される温度条件間で有意差は認められなかった (Fig. 1-2)。温度は植物の生育に大きな影響を与えることから、多くの除草剤の薬効に対して、温度が与える影響について研究、解析が行われており、一部の除草剤において、低温条件下での除草効果の低下、もしくは、高温条件下で薬害が助長されたことが報告(16,17)されている。温度が除草剤の薬効薬害に影響を与えるメカニズムについては、これまで多くの考察がなされている。たとえば、Currierらは、温度変化に伴い、薬剤の溶解度などの物理化学的特性が変化する、もしくは、植物体内の原形質流動および師部内輸送の活発化といった植物の生理特性が変化するためと考察しており(18)、2,4-Dの植物体内の移行性について、温度上昇に伴い、薬剤処理した葉身から他の組織への師管輸送が促進されたとの報告もなされている(19)。また、Schneiderらは、高温条件下では植物体内での蒸散、代謝が活発化し、薬剤の取込み量が増大し、その結果、除草剤の効果向上もしくは薬害の助長が発生すると考察している(20)。その他にも、Muzikらは、温度変化に伴い、植物体自身の感受性が変化するといった報告をしており(21)、温度の影響は、これらの要素が複合的に作用した結果であると考えられる。本剤の薬効薬害に対する温度の影響が軽微となったメカニズムの詳細については不明だが、本剤は土壌中の移動性が非常に小さく、土壌表層から深度 1 cm 以内にほとんどが局在する点(22)、通常、移植水稻場面

において、イプフェンカルバゾンの吸収部位である根部および葉鞘基部(23)は、本剤が局在する土壌表層よりかなり下方に移植される点を踏まえると、温度条件に関わらず、植物体の吸収部位に到達するイプフェンカルバゾンは極めて少ないことが予想される。この場合、温度変化によって水稻の吸収能、感受性が変化したとしても、吸収されるイプフェンカルバゾンは変わらず極少量となるため、抑制程度に差が生じなかったと推察した。一方で、ノビエに対する除草効果については、本剤の活性が非常に高く、低温による吸収能および感受性の低下が、極端な効果変動につながらなかった可能性が考えられるが、この点については、更なる研究が必要である。

土性の違いや漏水の有無によるイプフェンカルバゾンの除草効果および水稻への安全性への影響は認められなかった(Fig. 1-4,1-6)。土壌処理型除草剤の除草効果は、土壌の性質、特に土壌への吸着量によって変動することが知られている。例えば、ピリダジン系除草剤、クレダジン(24)や有機リン系除草剤、ピペロホス(25)の除草効果を複数の土壌間で比較したところ、土壌吸着量が多い土壌ほど除草効果が低下したことが報告されている。一般に、土壌への除草剤の吸着量は、土壌中の有機物含量や粘土質含量に比例して大きくなる傾向がある(26,27)。したがって、粘土質の割合が低い砂壤土では、他の土壌に比べて除草剤に対する吸着能が弱く、吸着量が少なくなることに加えて、土壌中の移動性も高くなり、土壌中における除草剤が存在する層、いわゆる、「除草剤処理層」は表層から広範囲にわたって形成される。このような土壌では、除草剤の吸収部位が、「除草剤処理層」より下方に位置する様に移植し、除草剤の取込みを物理的に低減させることによって、雑草一作物間の選択性を生んでいる除草剤にとっては、薬剤が作物に取り込まれ易くなるため、薬害が発生しやすくなる。イプフェンカル

バズンは、土壌の種類、漏水条件に関わらず、土壌表層から 1 cm 以内に留まることが報告(22)されている。本試験結果は、この特性により、イプフェンカルバズンはノビエ、移植水稻の吸収部位と本剤の土壌中における存在する位置関係が、様々な自然環境条件下において、ほとんど変わらないため、本剤が安定した薬効および水稻安全性を示すことを示唆している。

オーバーフローの影響について、薬剤処理 6、24 時間後にオーバーフロー操作を行った場合、イプフェンカルバズンの除草効果への影響は、ほとんど認められなかった(Fig. 1-8,1-9)。先行研究において、水溶解度の高い除草剤は低いものに比べ、オーバーフローによる除草効果の変動が大きくなると共に影響を受ける期間が長期にわたる傾向にあった事が報告されており、この理由を、各薬剤の土壌への吸着性の差によるものと考察している(28)。一般に、農薬の土壌吸着性は、水溶解度が低く、脂溶性の高いものほど土壌吸着性が強く、水中から速やかに土壌粒子に吸着される傾向にある(26,27)。イプフェンカルバズンの水溶解度は 0.515 ppm であり(Fig.0-1)、先行研究において、オーバーフローの影響を受けにくかった薬剤と同様に低いため、本剤は、薬剤処理後速やかに田面水中から土壌へ吸着されたことが予想される。その結果、処理 6 時間以降では、田面水中のイプフェンカルバズンの存在量は極少量であり、田面水の系外への流出による本剤の流亡、すなわち、除草効果の低下がほとんど生じなかったと推察した。一方で、薬剤処理 3 時間後にオーバーフロー操作を行った条件では、他のオーバーフロー条件と比較して、ノビエの地上部乾物重量の有意な増加が認められた。これは、薬剤処理から 3 時間の段階では土壌への吸着が完了しておらず、他条件に比べて流亡量が多かったことを示唆している。したがって、イプフェンカルバズンの除草効果を最大限に発揮さ

せるためには、処理後間もない田面水の流亡は避けることが望ましいと考えられた。

近年、省労力な農薬散布技術の一つとして普及が拡大している田植同時処理は、通常の散布と薬剤処理前後の水管理条件が大きく異なる。すなわち、通常、水稻を機械移植する際には、浮き苗の防止や植え付け精度の向上等を目的に、田面水のほとんどを排出してしまう。そのため、田植同時処理は極浅水ないし落水条件下で薬剤処理されることになり、通常の薬剤処理に比べて水中濃度は高くなる。さらに、田植作業終了後、圃場に水を入れ、湛水状態にさせるが、圃場の給水能力、作業上の都合などによっては、落水状態が長期間続くことが想定される。この場合、水中濃度が長期間、高濃度の状態で存在することに加えて、圃場内の高低差による田面の露出、土壌表面の乾燥具合によって、薬剤の圃場内への拡散が不均一となり、効果不足もしくは薬害が局地的に発生する事が危惧される。今回、湛水深が 1 cm から 8 cm の条件下において、イプフェンカルバゾンのノビエに対する除草効果および移植水稻に対する生育抑制に有意な差は認められなかった (Fig. 1-10)。また、田植同時処理を想定した極浅水条件下で薬剤処理し、その後再湛水するまでの時間について検討した結果、再湛水するまでの時間が 3~24 時間内において水稻に対する有意な効果差は認められなかった (Fig. 1-11)。湛水深の影響について、特定の除草剤が薬剤処理時の水深によって除草効果および水稻に対する安全性が変化することが報告されており (29,30,31)、小笠原ら (31) は、これらが土壌中および田面水中濃度の変化によるものと考察している。今回の結果は、一般的な圃場で想定される湛水深の範囲内における水中濃度の変化は、イプフェンカルバゾンの薬効薬害に影響を及ぼさないことを示唆している。一方で、有意ではないものの、薬剤処理から再湛水するまでの間

隔が長くなるつれ、水稻の地上部乾物重量が減少する傾向が認められている点を踏まえ、実際の使用場面において、薬剤処理後速やかに入水をする事が望ましいと思われる。

作物を栽培するにあたり、安定的に収量を確保するためには、長期にわたって作物を雑草害から守る必要がある。そもそも、雑草害は作物と雑草間における水・光・養分の競合の結果であり、発生する雑草種、水稻の葉齢進展速度などの生育特性、栽植密度などの栽培条件などによって雑草防除が必要となる期間は変化する(32)。雑草防除が必要となる期間について、鈴木ら(33)は、移植時期に関わらず移植後 40 日間雑草防除した場合、雑草害が認められず、徹底防除した時と同等の収量が確保できたことを報告している。また、橘(34)は、生育特性の異なる水稻品種間で必要なタイムピエの除草期間を検討した結果、24~27 日程度発生を抑制すれば、収量への影響がほとんどなくなることに加え、次年度の発生源増加の防止にもつながる可能性が高いことを報告している。本研究で、イプフェンカルバゾンには、漏水、土性、オーバーフローの影響下でも、薬剤処理から 56 日以上ノピエの発生を完全に抑制することが明らかにした(Fig. 1-5,1-7,1-9)。この結果は、本剤を田植同時処理で使用した場合においても、十分な残効性を有することを強く示唆している。また、実際の検証は必要であるが、近年、広がりつつある粗植栽培といった栽培環境が変化した際にも十分な残効性を担保する余力を保持していると考えられた。

以上をまとめると、イプフェンカルバゾンは、温度、漏水、土性、オーバーフロー、湛水深の影響を受けにくく、様々な環境条件下で付される日本の水稻栽培においても、安定的に高い除草効果および水稻安全性を示すと考えられた。さらに、ノピエに対しては、上記、環境変動を受けた条件下でも 50 日を超える安定した長期残効性を示し

たことから田植同時処理に適した薬剤であると同時に、本剤を使用することによって、ノビエの防除に関わる除草剤散布回数の低減によるコストの削減ならびに除草剤の追加散布による環境負荷の低減が可能であると考えられた。

第2章 イプフェンカルバゾンの超長鎖脂肪酸生合成に及ぼす影響

第1章では、イプフェンカルバゾンの特長であるノビエ類に対する高い除草効果および水稲に対する高い安全性に対して、自然環境中において想定される変動要因(温度、土性、減水深、オーバーフロー、湛水深)が与える影響を評価し、本剤がこれらの影響を受けにくく、自然環境中においても、安定したノビエ類に対して高い除草効果ならびに水稲に対して高い安全性を示すことを明らかにした。

一般に、除草剤の選択性は、処理方法や生育ステージ、吸収部位の位置等を作物－雑草間で差をつけることによって、物理的に薬剤の取込み量を調節する「物理的」選択性と除草剤に対する植物の吸収能や代謝能、作用点に対する親和性の差などの除草剤の作用機構に基づいた、「生理・生化学的」選択性によって成り立っている。作用点に対する親和性の差による選択性獲得の代表例として、シクロヘキサンジオン系(ジム)除草剤やアリールオキシフェノキシプロピオン系(ホップ)除草剤などに代表されるアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)阻害剤がある。一般に、植物体内のACCaseには真核型と原核型の2種類が存在するが、例外的に、イネ科植物は葉緑体内に真核型を有していることが明らかになっている。既存のACCase阻害剤は、真核型のACCaseを選択的に阻害するために、イネ科雑草のみを枯殺させる(35)。また、解毒代謝による生理的な選択性を示す薬剤の例として、SU系除草剤に代表されるALS阻害剤やプレチラクロールが挙げられ、前者はシトクロムP450、後者は、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)による薬剤の不活化能の種間差が選択性の要因となっている(36,37)。

イプフェンカルバゾンの作用機構については、①Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)でK3に分類される超長鎖脂肪酸(VLCFA)生合

成阻害剤として分類されているテトラゾリノン系除草剤、フェントラザミドと構造的類似性が高いことに加え、本剤の創成研究において、K3に分類されているカフェンストロールをリード化合物としていること(38)、②本剤を処理したタイヌビエがK3に分類されているクロロアセトアミド系除草剤と同様に、展開中の新葉の濃緑化を伴う捻転、出すくみといった殺草症状を示すこと(22)、③近藤ら(39)が、本剤を処理したタイヌビエ中の炭素数20以上のVLCFA含有量が顕著に低下した事を報告していることから、本剤はVLCFA生合成阻害剤であると推定されている。しかしながら、これまでの研究において、VLCFA生合成系における本剤の作用点について明らかにされておらず、作用機構に関して不明な点が残されている。

植物では、細胞質にて合成されたアセチル CoA を出発原料として VLCFA 合成が開始される。まず、葉緑体内において、アセチル-CoA から ACCase によりマロニル-CoA が合成される。次いで、アセチル-CoA にマロニル-CoA が縮合し、還元、脱水、縮合の連続反応を経て炭素数が 2 つ伸長したアシル-CoA が合成される。その後、上記、連続反応を繰り返しながら、炭素鎖を 2 つずつ伸長させ、最終的に炭素数 16 ないし 18 の長鎖脂肪酸(LCFA)が合成される。次に、合成された LCFA は、小胞体へと輸送され、上記同様、縮合、還元、脱水、縮合の 4 つの反応を繰り返しながら炭素鎖の伸長がさらに行われ、炭素数 20 以上の VLCFA が合成され、植物表皮のクチクラワックス等の形成に利用される (Fig.2-1)。クチクラワックスは、乾燥や紫外線などのストレスからの組織保護、病原菌の侵入を防ぐ機能を有している(40,41)。また、クチクラワックスが欠損したシロイヌナズナの変異体は、組織の合着や形態形成異常が引き起こすことから(42-44)、植物の生長、器官形成に大きな役割を担っていることが明らかになっている。そのため、VLCFA

阻害型除草剤は、VLCFA 合成を阻害することによって、クチクラワックスの合成を阻害し、植物の生長を間接的に阻害させることで枯死させると考えられている。

VLCFA 合成阻害型除草剤の作用点について、Böger ら(45)は、西洋ネギの幼苗を用いた実験で、メタザクロールを処理することにより、アラキジン酸(C20:0)、ベヘン酸(C22:0)、リグノセリン酸(C24:0)への¹⁴C-マロニル-CoA の取り込みが阻害されたことを報告し、これらの知見に基づき、同じクロロアセトアミド系除草剤であるアラクロールやテニルクロールについて脂肪酸へのマロニル CoA の取込み阻害効果を調べた結果、これらの除草剤はメタザクロールと同様に低濃度でマロニル CoA の取込みを阻害したことから、クロロアセトアミド系除草剤の一次作用点は超長鎖脂肪酸伸長酵素(very long chain fatty acid elongase:VLCFAE)である事を明らかにした。その後、類似の殺草症状を示すカフエンストロール等の異なる化合物群に属する脂肪酸合成阻害剤も同様の検討を行い、VLCFAE を作用点とする阻害剤であることが明らかとなった(46)。

本章では、作用機構の解析を目的に、本剤のVLCFAEに対する阻害効果ならびに阻害様式について検討した。さらに、イプフェンカルバゾンの特長であるイネーヒエ間の高い選択性の要因、特に「生理・生化学的」選択性の関与を解析することを目的に、イネとタイヌビエ、両植物の生育およびVLCFAEに対する阻害効果について比較した。

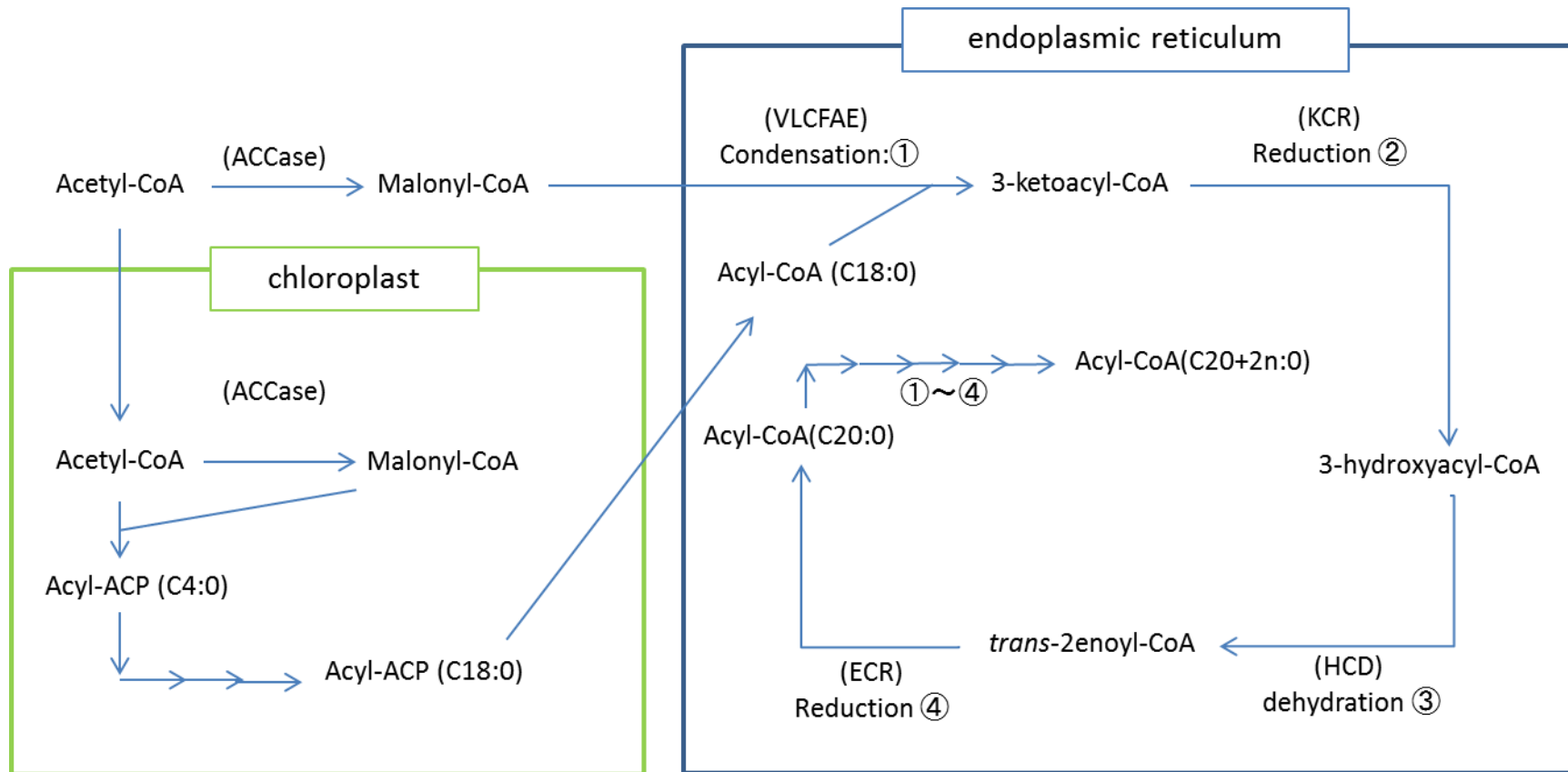


Fig.2-1. Biosynthetic pathway of very long chain fatty acids in plants.

*ACCase:Acetyl-CoA carboxylase, ACP:acyl carrier proteins, VLCFAE : Very long chain fatty acid elongase, KCR:3-Ketoacyl-CoA reductase, HCD:3-Hydroxyacyl-CoA dehydratase, ECR:Enoyl-CoA reductase

2-1. 供試薬剤および供試植物

イプフェンカルバゾン（純度 99.5%）は、北興化学工業株式会社（東京、日本）によって提供された。他の供試化合物は、特に記載のない限り、全て和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。供試除草剤は、原体もしくは標準品をアセトンに溶解させ 10^{-2} M 溶液を調整した後、使用直前に 1%のジメチルスルホキシド(DMSO)を含む 10%アセトン溶液で所定濃度まで希釈させて用いた。

検定植物としてイネ(*Oryza sativa* (L) cv. Nipponbare) とタイヌビエ(*Echinochloa oryzicola* Vasing.) を用いた。イネ種子は、70%エタノールに 5 分間、10%過酸化水素水に 10 分間浸漬して殺菌した。その後、蒸留水に浸し、30℃の恒温器内にて 2 日間、催芽させた。タイヌビエ種子は蒸留水に浸し、10 分間、減圧下で吸水させた後、30℃の恒温器内にて 2 日間、催芽させた。

2-2. イネおよびタイヌビエの生育に及ぼす影響

材料および試験方法

催芽したイネおよびタイヌビエをステンレス製の金網上に播種し、グローブチャンバー内(昼 25℃/夜 20℃、それぞれ 12 時間)にて水耕法により 2 葉期まで生育させた。水耕液は 1/2 強度の修正春日井水耕液を用いた。(Table 2-1) 次に、2 葉期まで生育させた植物体の根部および葉茎基部を、0.005 μ M、0.05 μ M、0.5 μ M、5 μ M の供試除草剤を含む修正春日井水耕液中に 48 時間浸漬させた。なお、溶液中のアセトン濃度は 0.1%以下となる様に調整した。浸漬後、蒸留水で浸漬部位を洗浄し、除草剤を含まない修正春日井水耕液中にて 15 日間栽培した。なお、

無処理区には、除草剤を含まない 1% DMSO を含む 10% アセトン溶液を除草剤処理区と同様に添加した。浸漬 5、10、15 日後に根長および葉身長を、浸漬 15 日後に新鮮重をそれぞれ測定し、抑制率を算出することで植物の生育への影響を評価した。また、浸漬 15 日後における植物の葉身および根部生長、そして、植物体全体の新鮮重量に対する EC₅₀ を Probit 法により求めた。得られた結果については、SPSS Statistic 24.0 (IBM Japan Corp.)を用いて統計解析を実施し、Tukey 法による検定の結果、P<0.05 の場合、有意差があるとみなした。試験は、各濃度 3 連で行った。

結果

イプフェンカルバゾンには、0.5 μM 以上の薬量でタイヌビエの第 3 葉の生長を有意に抑制し、第 4 葉の出葉を完全に抑制した (Fig. 2-2Aa)。一方、イネに対しては、5 μM の薬量においてのみ、第 3 葉の有意な生長抑制が認められた。さらに、第 4 葉に対しては、5 μM の薬量において有意な生長抑制が認められたが、タイヌビエと異なり出葉の抑制はいずれの薬量でも認められなかった。(Fig. 2-2Ba)。また、タイヌビエ、イネ、両植物の根部に対して、有意な生長抑制効果は認められなかった (Fig. 2-2Ab, Bb)。本剤は、タイヌビエの新鮮重をイネよりも強く減少させる傾向を示し、タイヌビエに対しては 0.05 μM 以上で、イネに対しては 0.5 μM 以上で有意な抑制効果が認められた (Fig. 2-2C)。また、タイヌビエおよびイネの新鮮重に対する EC₅₀ 値は、それぞれ 0.16 μM、2.12 μM であった (Table 2-2)。

Table 2-1 Composition of the nutrient solution.

Element	Chemical	Concentration (mg/L)	Concentration (mg/L)	Concentration (mg/L)
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	73.4	NH ₄ -N	40
P	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	201.7	P ₂ O ₅	40
K	KCl	64.2	K ₂ O	40
Mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O	61.1	MgO	10
Ca	CaCl ₂ · 2H ₂ O	105	CaO	40
Fe	EDTA-Fe	26.41	Fe ₂ O ₃	7
Mn	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.809	Mn	0.5
B	H ₃ BO ₃	0.286	B	0.05
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.092	Mo	0.05
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0786	Cu	0.02
Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2197	Zn	0.05

*Chemicals were dissolved in distilled water and pH was adjusted at 6.0 with HCl.

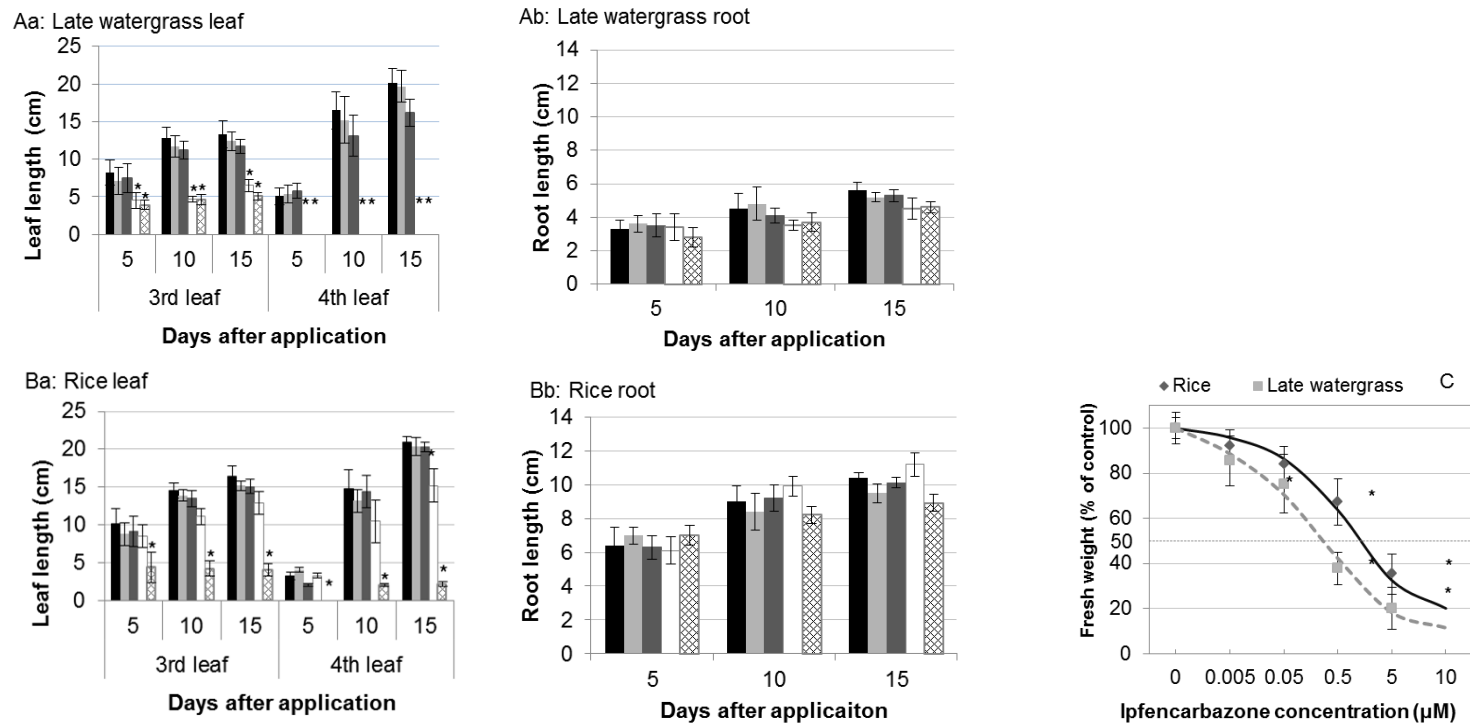


Fig. 2-2 Effect of ipfencarbazone on leaf (a) and root (b) length of late watergrass (A) and rice (B) seedlings at 5, 10, and 15 days after treatment, and effect of ipfencarbazone on the total fresh weight (FW) of late watergrass and rice seedlings 15 days after treatment (C). FW is the sum of four plants. Vertical bars represent SE of the means. FW of untreated control was 3.05 ± 0.35 g/four plants for rice and 0.56 ± 0.02 g/four plants for late watergrass. The patterns of bar show the concentration of ipfencarbazone as follows: ■; 0 μM, ▒; 0.005 μM, ▓; 0.05 μM, □; 0.5 μM, ⊠; 5 μM. * indicates significant difference from untreated control. ($P < 0.05$).

Table 2.2 Inhibition of growth of plants by ipfencarbazone.

Plant	EC ₅₀ (μM)
Rice	2.12
Late watergrass	0.16

*The 50% effective concentration (EC₅₀) for growth inhibition were calculated by the probit method.

2-3. 植物 VLCFAE に及ぼす影響

材料および試験方法

ミクロソームの抽出および脂肪酸伸長反応阻害試験は Takahashi ら (46)の方法を参考に行った。催芽したイネおよびタイヌビエをステレンス製の金網上に播種し、グロースチャンバー内(暗条件、25°C/20°C, それぞれ 12 時間)にて水耕法により 2 葉期まで生育させた。その後、イネおよびタイヌビエの茎葉部 4 g(新鮮重)を採取し、40 ml の 320 mM スクロース、10 mM ジチオスレイトール(DTT)、2 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)(カリウム塩)、1 g(植物試料の 25%)のポリビニルポリピロリドン(PVPP)、0.3 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)を含む 100mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン-1-スルホン酸(HEPES)/KOH バッファー(pH 7.2)に加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてすりつぶし、3重にしたミラクロスでろ過した。次いで、ろ液を 10,000×g で 20 分間遠心し、遠心上澄をさらに 105,000×g で 60 分間遠心し、沈殿画分を得た。沈殿画分は、2ml の 0.1% Triton X-100、1 mM DTT、1 mM MgCl₂ を含む 100mM HEPES / KOH バッファー (pH 7.2)中で、テフロンホモジナイザーを用いて丁寧にすりつぶし、ミクロソーム画分溶液とし、実験で使用するまで-80°Cにて、小分け保存した。なお、上記、抽出作業は 4°Cの冷蔵室もしくは氷上にて行った。また、ミクロソーム画分溶液中のタンパク質濃度はウシ血清アルブミン(BSA)を基準物質としたブラッドフォード法により定量した。

脂肪酸伸長活性は前駆体(アシル-CoA)への[2-¹⁴C]マロニル CoA の取り込み量より求めた。ステアロイル-CoA (C18:0) 及びアラキドイル-CoA (C20:0) は Sigma-Aldrich 社より購入した。[2-¹⁴C]マロニル

-CoA(2.035 GBq/mmol)は American Radiolabeled Chemicals 社から購入した。ミクロソーム画分溶液 30 μ l(タンパク濃度: 864 μ g/ml)に 20 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH) 5 μ l、20 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADPH) 5 μ l、2mM アシル CoA 5 μ l、100mM HEPES-KOH buffer (pH7.2) 7 μ l、所定の濃度の除草剤溶液 3 μ l を加えて 30°Cで 10 分間、プレインキュベーションを行った。なお、対照区には、除草剤溶液の代わりに 1% DMSO を含む 10%アセトン溶液を 3 μ l 加えた。プレインキュベーション後、0.2 mM [2-¹⁴C] マロニル CoA 5 μ l を添加して、伸長反応を開始させた。30°Cで 30 分間、反応させた後、60% KOH 水溶液を 40 μ l 加えて伸長反応を停止させ、80°Cで 30 分間加熱した。その溶液に 6% HCl、280 μ l を加え、脂肪酸を遊離させた後に 1080 μ l のアセトン/ヘキサン混合溶媒(4:3, v/v)を加え、脂肪酸を抽出した。次に、この有機相に 6% HCl、200 μ l を加え、未反応のマロニル-CoA を除去した。除去後、液体シンチレーションカウンター (Hitachi Aloka Medical, Ltd., AccuFLEX-LSC LSC-7200)を用い、有機相内の放射活性を測定した。薬剤の脂肪酸伸長阻害活性は、無処理区に対する阻害率を算出することで定量化し、50% 阻害濃度(IC₅₀)は Probit 法により求めた。

結果

イプフェンカルバゾン、タイヌビエおよびイネミクロソーム中の VLCFA 炭素鎖伸長反応(C18:0→C20:0 および C20:0→C22:0)を濃度依存的に阻害した(Fig. 2-3A, 3B)。本剤は、タイヌビエ、イネの両植物の C20:0→C22:0 の反応を C18:0→C20:0 の反応よりも強く抑制する傾向が認められ、反応ごとに阻害活性が異なった。また、既知の VLCFAE 阻害剤であるカフェンストロールと阻害活性を比較した結果、イプフ

エンカルバゾンは、タイヌビエおよびイネの VLCFA 炭素鎖伸長反応 (C18:0→C20:0 および C20:0→C22:0)をカフェンストロールよりも強く抑制する傾向が認められた。特に、C20:0→C22:0 の反応に対しては、供試したいずれの薬量(0.05、0.5、5、50 μM)においても有意な効果差が認められた。さらに、タイヌビエとイネの VLCFA 炭素鎖伸長反応 (C18:0→C20:0および C20:0→C22:0)に対する阻害活性を比較した結果、カフェンストロールではタイヌビエとイネの間における阻害活性に有意な差が認められなかったが、本剤はタイヌビエの伸長反応をイネよりも強く抑制する傾向が認められた。特に、C18:0 から C20:0 への脂肪酸伸長において、本剤のタイヌビエの伸長反応に対する IC₅₀ 値はイネの IC₅₀ 値に比べ約 3 倍低かった。同様に、C20:0 から C22:0 の脂肪酸伸長反応において、本剤のタイヌビエの伸長反応に対する IC₅₀ 値はイネの IC₅₀ 値に比べ約 7 倍低かった。(Table 2-3)

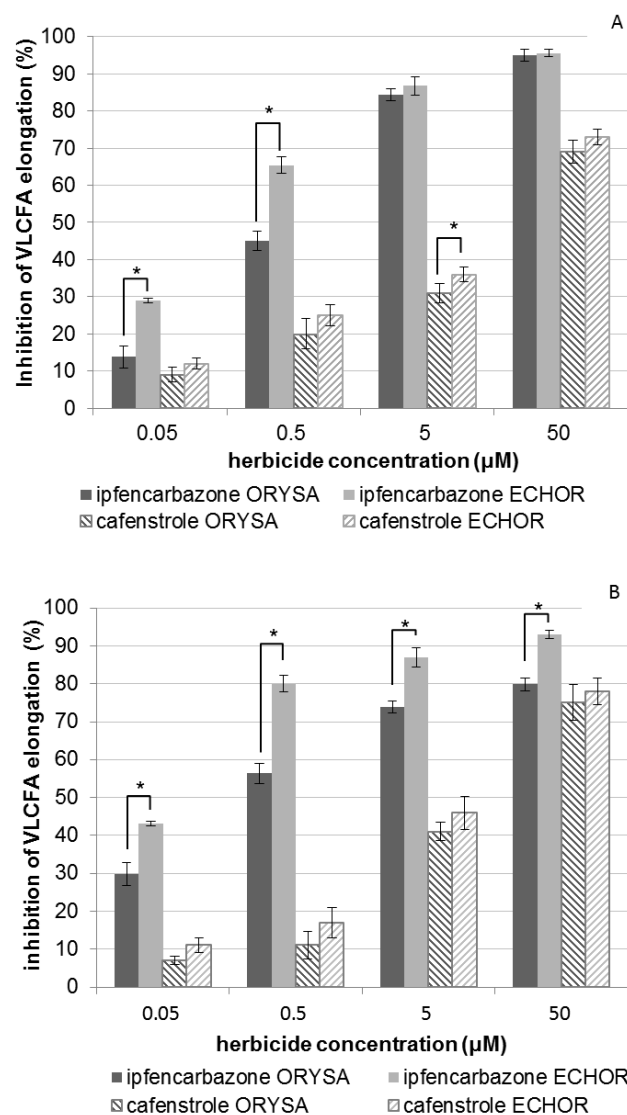


Fig. 2-3 Effect of herbicides on C18:0 to 20:0 (A) and C20:0 to 22:0 (B) fatty acid elongations in rice (ORYSA) and late watergrass (ECHOR) microsomes. Vertical bars represent SE of the means. * indicates significant difference between ORYSA and ECHOR ($p < 0.05$). VLCFAE-specific activities of late watergrass catalysis of elongation were 0.10 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for C18:0 to C20:0 and 0.05 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for C20:0 to C22:0 in rice and 0.09 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for C18:0 to C20:0 and 0.08 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for C20:0 to C22:0 in late watergrass.

Table 2-3 Inhibition of VLCFA elongation by ipfencarbazone.

	IC ₅₀ (μM)	
	C 18:0 to C 20:0	C 20:0 to C 22:0
ORYSA ^{a)}	0.65	0.39
ECHOR ^{b)}	0.21	0.06
Ratio (ORYSA/ECHOR)	3.16	6.88

^{a)}ORYSA, *Oryza sativa* cv. Nipponbare; ^{b)}ECHOR, *Echinochloa oryzicola* Vasing.

2-4. 植物 VLCFAE に対する阻害様式の検討

材料および試験方法

上記、ミクロソーム画分溶液 30 μ l に 20 mM NADH 5 μ l、20 mM NADPH 5 μ l、2 mM アラキドイル-CoA 5 μ l、100 mM HEPES-KOH バッファー (pH7.2) 7 μ l、所定の濃度の除草剤溶液 3 μ l を加えて 30°C で所定の時間、プレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後、[2-¹⁴C]マロニル-CoA を 5 μ l 添加し、伸長反応を開始させ、脂肪酸へのマロニル-CoA の取込みへの影響を評価した。なお、反応時間、脂肪酸の抽出、放射活性の測定は上記と同様の方法で行った。

さらに、VLCFAE に対する本剤の阻害機構の可逆性を評価する事を目的として、以下の試験を実施した。ミクロソーム画分溶液 60 μ l に、10 μ M のイプフェンカルバゾン溶液(最終濃度 0.5 μ M)もしくは 0.1% DMSO を含む 10%アセトン溶液 6 μ l を加え、30°C で 10 分間プレインキュベーションを行った。次に、この溶液を 2 つに分割し、一方を 0.1% Triton X-100、1 mM DTT、1 mM MgCl₂ を含む 100 mM HEPES / KOH buffer (pH 7.2) で 10 倍に希釈し、さらに 30°C で 10 分間反応させた。その後、希釈した溶液もしくは希釈していない溶液 30 μ l に 20 mM NADH 5 μ l、20 mM NADPH 5 μ l、2 mM アラキドイル-CoA 5 μ l、100 mM HEPES-KOH buffer (pH7.2) 7 μ l、0.2 mM [2-¹⁴C]マロニル-CoA 5 μ l を加え、伸長反応を開始させた。伸長反応は 30°C で 20 分間、30 分間、45 分間の 3 条件で行った。酵素反応の停止、脂肪酸の抽出および分析は 2-3 章記載の方法で行った。

結果

まず、イプフェンカルバゾン非存在下におけるプレインキュベーシ

インキュベーション時間の変更に伴う、VLCFAE の伸長酵素活性の失活の有無について検討した結果、プレインキュベーション時間が 0、5、10 分後までは時間と共に、取込み量が増加し、それ以降は、時間と共に取込み量は緩やかに減少する傾向を示した。しかしながら、60 分以内であれば、統計上、ほぼ同等の活性を維持していると考えられた。(Fig. 2-4)

イプフェンカルバゾンの VLCFAE に対する阻害程度は、イネ、タイヌビエともにプレインキュベーション時間に比例して阻害程度が強くなる傾向が認められ、イネ VLCFAE に対してはプレインキュベーション 20 分でほぼ定常状態になり、タイヌビエ VLCFAE に対しては 10 分でほぼ定常状態になった。(Fig. 2-5) さらに、マイクロソーム-イプフェンカルバゾン混合溶液の希釈による阻害活性への影響を検討した結果、10 倍希釈した混合溶液の VLCFA 伸長阻害は、イネ、タイヌビエいずれも希釈を行わなかった溶液とほぼ同等の活性が認められた。(Fig. 2-6)

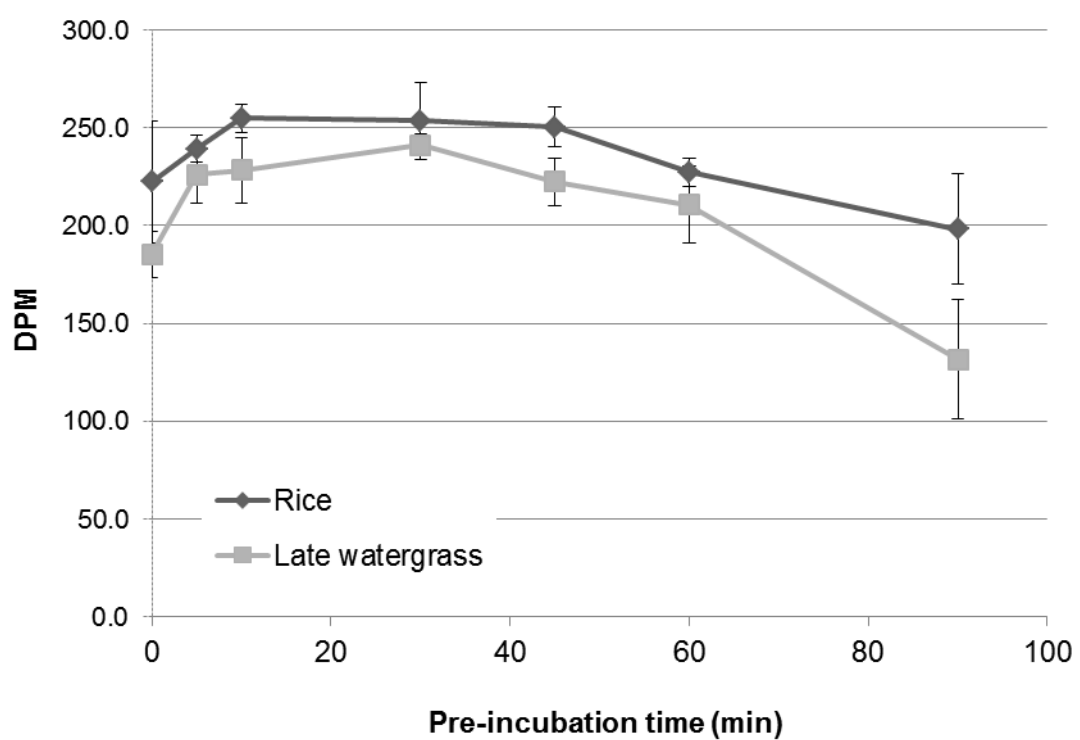


Fig. 2-4 Effect of pre-incubation time for elongation of arachidoyl-CoA in rice and late water grass microsomes. Elongation was carried out 30 mins. Vertical bars represent \pm SE of the means.

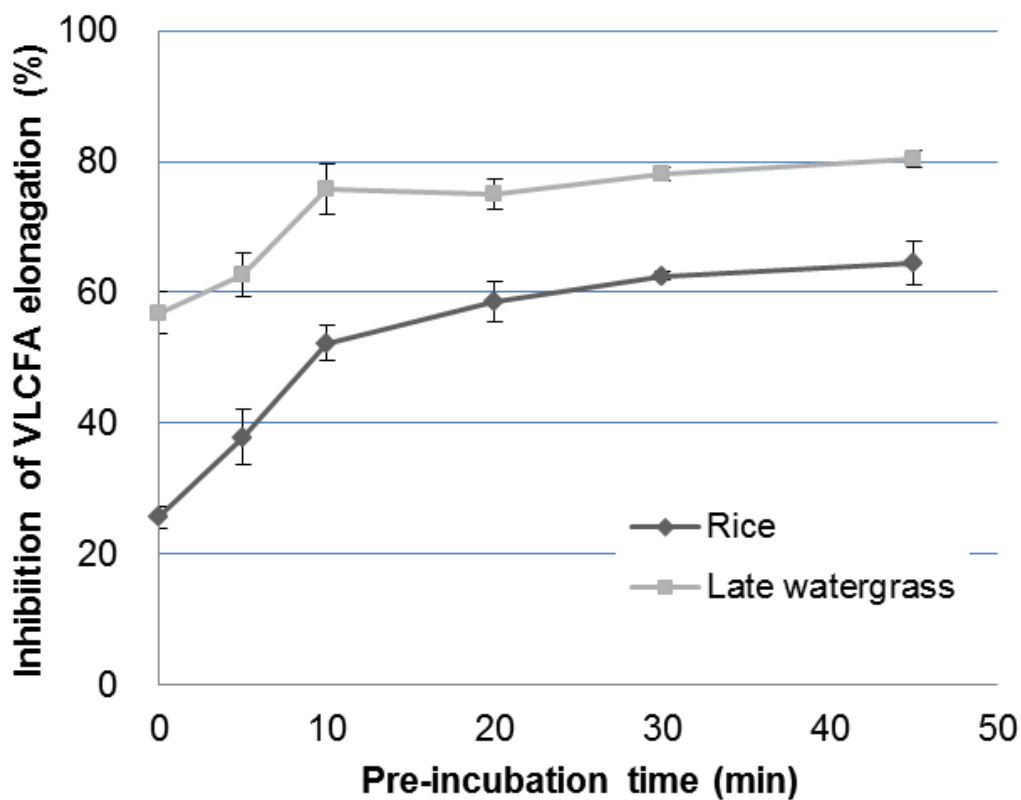


Fig. 2-5 Effects of pre-incubation period on inhibition of C20:0 to C22:0 VLCFA elongation in rice and late watergrass by 0.5 μ M ipfencarbazone. Vertical bars represent SE of the means. The VLCFAE activities catalyzing elongation from C20:0 to C22:0 were 0.07 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for rice and 0.11 pmol/30 min/ μ g of microsomal protein for late watergrass.

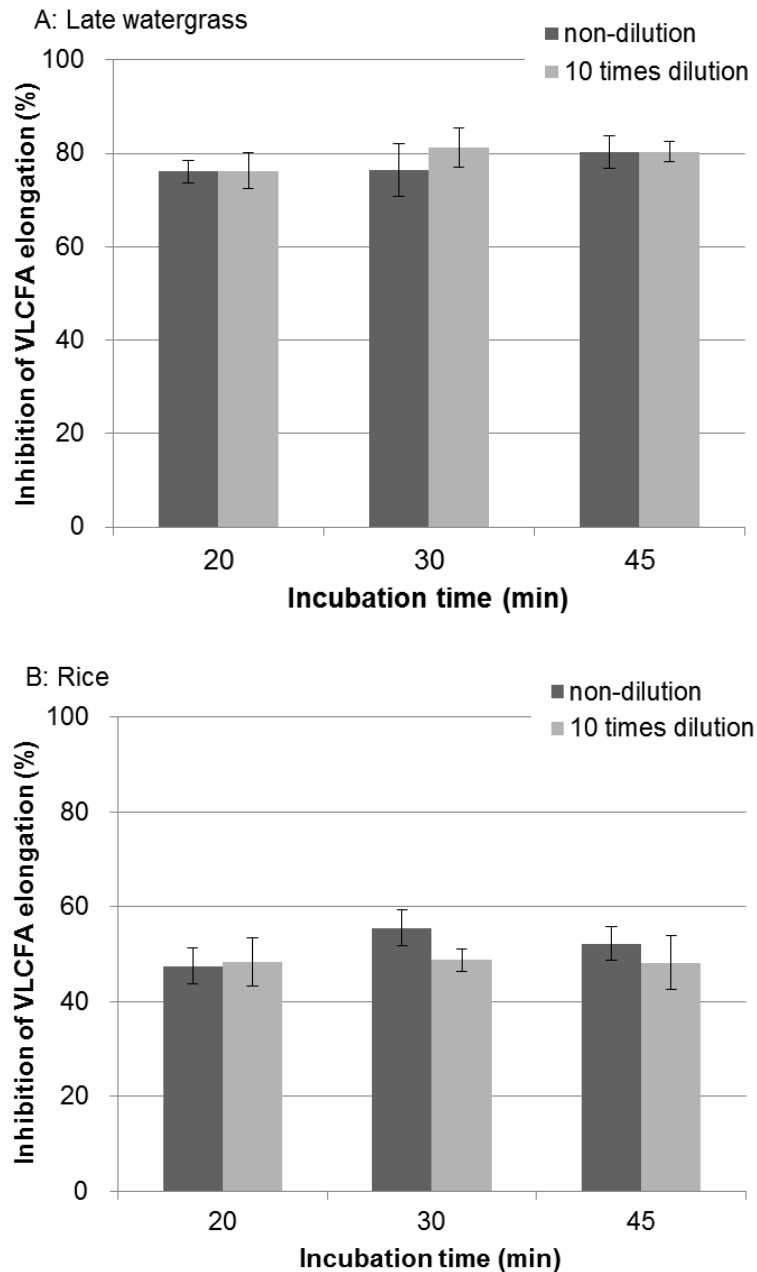


Fig.2-6 Effects of ipfencarbazone-microsome complex dilution on inhibition of C20:0 to C22:0 VLCFAE elongation by 0.5 μ M ipfencarbazone in late watergrass (A) and rice (B). Pre-incubation was conducted for 10 min. Vertical bars represent SE of the means. The VLCFAE activities catalyzing elongation from C20:0 to C22:0 were 0.08 pmol/30 min/ μ g microsomal protein for rice and 0.10 pmol/30 min/ μ g microsomal protein for late watergrass.

2-5 考察

本章では、イプフェンカルバゾンの特長であるイネとタイヌビエ間における高い選択性の要因を解析するために作用機構面から検討を行った。まず、土壌を介した「位置選択性」が働かない水耕法にて、イプフェンカルバゾンがイネおよびタイヌビエの生育に与える影響について器官別に比較検討した。その結果、本剤は、葉部の生長を低濃度で有意に抑制した一方で、根部に対する有意な生長抑制は、タイヌビエ、イネの両植物とも認められず、器官ごとに本剤に対する感受性が異なることが明らかとなった(Fig. 2-2Aa, Ba)。葉部と根部の間で感受性差が認められた点について、詳細なメカニズムについては不明だが、植物の根には、葉部の様な VLCFA を原料とするクチクラワックスが発達していないことを踏まえると、VLCFA は根部生長に対して葉部生長ほど影響を及ぼさないことが示唆され、この差が、器官ごとの感受性差につながったと推察した。

また、タイヌビエとイネの生育に対する影響を比較した所、タイヌビエの葉部の生育を $0.5 \mu\text{M}$ 以上の薬量で有意に抑制したが、イネに対しては、5 割の薬量でのみ有意な抑制が認められ、感受性差が認められた。さらに、植物体全体の新鮮重に対する EC_{50} を比較した所、タイヌビエはイネに比べ約 12.5 倍低かった。これらの結果から、イネとタイヌビエの間には本剤に対する生理学的もしくは生化学的選択性が存在することが示唆された。

次に、脂肪酸合成系に対する作用点を検討するために、イネおよびタイヌビエミクロソームにおけるステアロイル-CoA およびアラキドイル-CoA へのマロニル-CoA の取込み阻害効果を検討した結果、イプフェンカルバゾンは、対照剤の VLCFAE 阻害剤カフェンストロールと

同様に、低濃度でマロニル-CoA の取込みを強く阻害した。この結果から、本剤の一次作用点は VLCFAE であることが強く示唆された。また、本剤は、C18:0→C20:0 よりも C20:0→C22:0 の伸長反応をカフェンストロールよりも強く阻害する傾向が認められるとともに、伸長反応ごとに阻害程度が異なることがわかった。この阻害活性差の要因について、カフェンストロールは植物体中の炭素数 24 以上の超長鎖脂肪酸含有量を有意に減少させる一方で、炭素数 20 の超長鎖脂肪酸含有量に対しては有意な減少を示さないことが報告されている(47)ことを踏まえると、本剤とカフェンストロールの高い阻害活性を示す VLCFAE はそれぞれ異なる事を示唆しており、その違いが活性差につながったと推定した。また、シロイヌナズナの葉部と根部中の LCFA、VLCFA の構成比、含有量が異なるという報告(48)から、タイヌビエおよびイネの葉部および根部において合成されている VLCFA の種類、量がそれぞれ異なることが予想されることを踏まえると、上記、水耕試験で認められた器官ごとの感受性差は、伸長反応ごとの阻害程度差も関与している可能性が考えられた。

VLCFAE に対する阻害活性を両植物間で比較した結果、タイヌビエ VLCFAE 活性を C18:0 から C20:0 の反応では約 3.0 倍、C20:0 から C22:0 の反応では約 7.0 倍、イネ VLCFAE よりも強く阻害した(Table 2-2)。このことから、本剤の両植物の VLCFAE に対する阻害活性がそれぞれ異なることが明らかとなると同時に、水耕試験で認められたイネとタイヌビエ間の感受性差は、この VLCFAE に対する阻害活性の差が要因の一つとなっていることが示唆された。

なお、高等植物の小胞体中には、VLCFAE が複数存在しており、一つの炭素鎖伸長反応に対して、複数の VLCFAE が触媒することが分かっている(49-51)。Trenkamp(51)らは、VLCFAE 阻害型除草剤は、それ

ぞれ異なる VLCFAE を阻害したことを報告しており、例えば、カフェンストロールは供試した VLCFAE すべてに阻害反応を示したことを報告している。また、Tanetani(52)は、ミクロソーム中における脂肪酸伸長反応に対する阻害活性は、ミクロソーム中に含まれる複数の VLCFAE 酵素群に対する阻害活性の総和であり、VLCFAE 阻害剤の阻害活性を詳細に解析するためには、VLCFAE を個別に分けて検証する必要があると考察している。本章におけるイプフェンカルバゾンの阻害活性は、複数の VLCFAE に対する阻害活性の総和であり、植物体内において行われている脂肪酸伸長反応の一部(C18:0 から C20:0 および C20:0 から C22:0)に対する阻害活性を評価したものである。イプフェンカルバゾンにのみタイヌビエとイネの間で感受性差が認められたのは、阻害活性を示す VLCFAE がカフェンストロールと異なるためと推察した。したがって、今後、C22:0 以降の脂肪酸伸長反応に対する阻害活性はもとより、複数存在する VLCFAE に対する親和性を個別に分けて比較することによって、本剤の作用機構および作用点レベルで認められたタイヌビエーイネ間における感受性差の要因をより詳細に解析することが可能となると共に、上述の葉部、根部間で抑制効果は大きく異なった要因についても明らかになると考えられる。

VLCFAE 阻害剤の阻害様式については、議論の余地が残されている。一般的に酵素阻害の阻害様式は、可逆的阻害と不可逆的阻害に分けられ、さらに、可逆的阻害については、標的酵素に対する結合様式およびその反応性に基づき、さらに細分化される(Fig.2-7)。これまでの通説として、従来の VLCFAE 阻害型除草剤は求電子性の高い炭素原子を有していることから、VLCFAE 活性中心に存在するシステイン残基中の SH 基と共有結合を形成することによって、不可逆的な阻害様式を示すと推定されている(44,53)。このような不可逆阻害の場合、酵素と

薬剤のプレインキュベーション時間に比例して阻害が強くなる(53,54)。しかし、Tanetani ら(55)は、新規 VLCFAE 阻害剤のピロキサスルホンおよび既存の VLCFAE 阻害型除草剤がシロイヌナズナの VLCFAE に対して、プレインキュベーション時間に依存した阻害活性様式を示した一方で、ネズミムギの VLCFAE に対しては、プレインキュベーション時間に依存しない阻害様式を示し、雑草種によって阻害様式が異なることを報告した。この結果について、彼らは、これら VLCFAE 阻害剤は、酵素との結合が非常に緩やかに進行し、結合-脱離反応が平衡化するまでに時間を要する「slow-binding inhibitor」である可能性を指摘している(55,56)。本剤のタイヌビエおよびイネの VLCFAE に対する阻害様式を検討した結果、イネ、タイヌビエの両植物とも、プレインキュベーション時間に依存して増加する傾向が認められるとともに、平衡状態に達するまでに要する時間も大きくは変わらなかった(Fig. 2-5)。さらに、イプフェンカルバゾンとミクロソームの混合溶液の希釈による脱離反応の有無について検討した結果、阻害活性の変化は見られなかった(Fig. 2-6)。以上の結果は、イプフェンカルバゾンは、イネおよびタイヌビエ VLCFAE に対して、いずれも「slow-binding inhibitor」であることを示唆すると共に、VLCFAE に対して強固で解離しにくい結合、すなわち不可逆的な阻害様式を示すことを示唆している。さらに、本剤は、既存の VLCFAE 阻害剤と同様に、求電子性の高い炭素(カルバモイル炭素)を含んでいることから、VLCFAE の活性中心に存在するシステイン基との間で共有結合を形成することが推察された。

なお、両植物間において、阻害様式および結合速度に大きな違いは認められなかったことから、タイヌビエおよびイネの VLCFAE に対する親和性の差は阻害様式の違いによるものではないと考えられた。

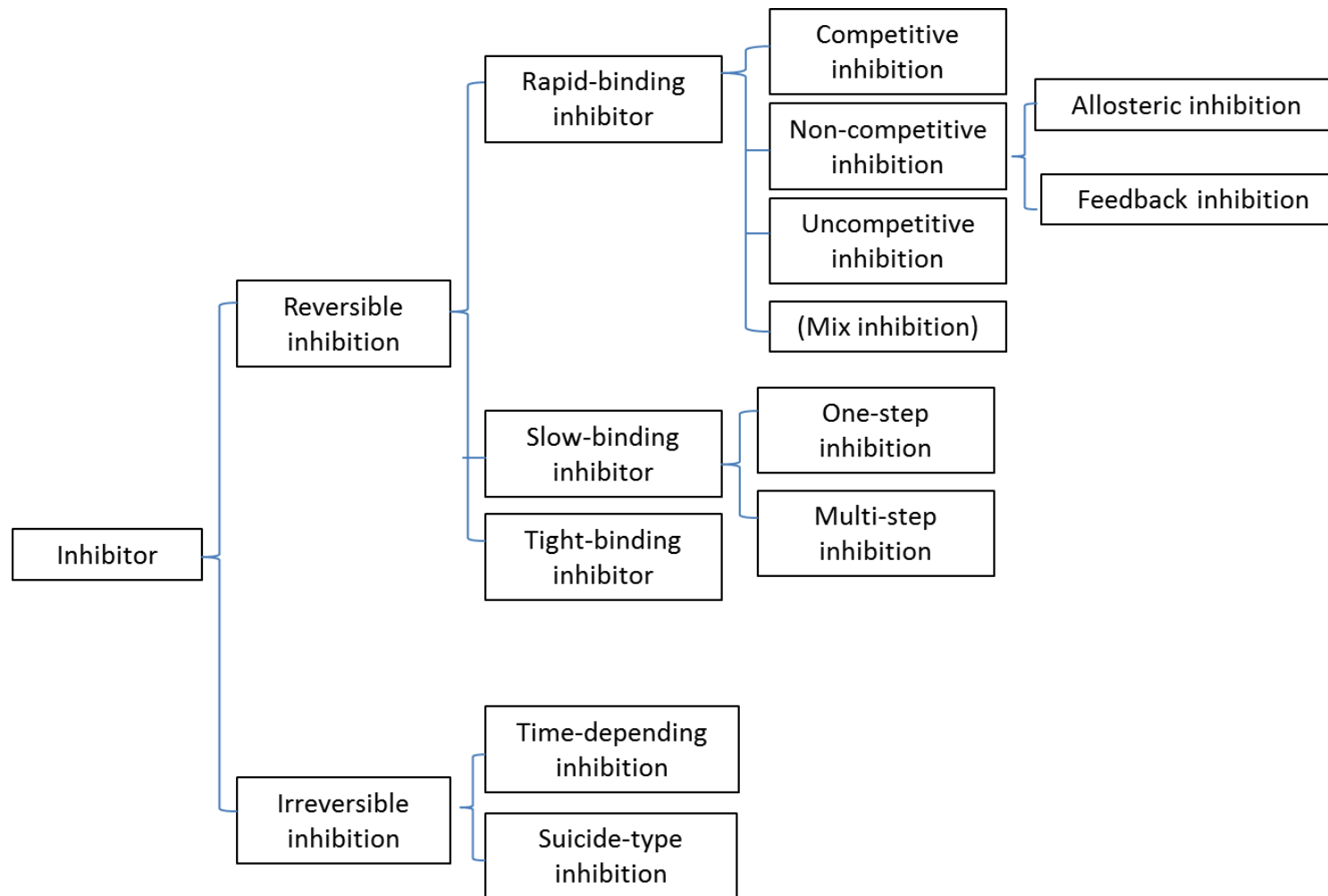


Fig. 2-7 Inhibition mechanism of enzyme-inhibitors.

第3章 総合考察

農薬は安定的な食糧生産には必要不可欠な資材であり、今後、予想される更なる人口増加に対して食糧生産および供給を維持するために、更なる高性能化を計る必要がある。一方で、過去、一部の薬剤において、人畜に対する毒性もしくは環境への残留性から多くの問題が発生していることから、農薬自体の低毒性、低残留性化はもとより、その用途、目的に応じて、適切に使用されなければならない。さらには、近年、同じ作用機作を持つ薬剤を連用することによって、それらの薬剤に耐性を持つ雑草・病害虫が確認されている。実際に、農薬として登録され、実現場にて使用される新規化合物を発見する確率は、現在では数万分の一と言われており、仮に、有用な新規化合物を発見、選抜できたとしても、農薬として登録され、使用されるまで10年以上もの長い時間を要することから、既存の薬剤を長期にわたり安定的に使用し続ける様努めなければならない。そのためには、現地の状況を鑑みながら、処理薬量や使用時期、使用回数、散布方法などについて、精査し続ける必要がある。

本論文は、新規除草剤イプフェンカルバゾンの薬効薬害に対して実使用場面で想定される環境変動要因が与える影響および本剤の作用機構について研究を行ったものである。実使用場面において、本剤の薬効薬害がどのような影響を受け、変動するかを詳細に把握する事は、本剤の性能を最大限に発揮する処理方法を農業従事者などに提案できることに加え、薬剤の過剰な使用を抑制することにつながり、その結果、環境への負荷を最小限にするとともに抵抗性雑草の出現、発達を抑制する事にもつながる。また、作用機構について、その詳細を把握することは、単なる抵抗性雑草対策となるだけでなく、今後、新たな

農薬原体を創成する上で、重要な情報を得ることにもなりえる。

第1章では、除草剤研究において、土壌処理型除草剤の薬効薬害に対して影響を及ぼすことが報告されている環境要因に対して、イプフェンカルバゾンがどのような影響を受けるかについて検討した。その結果、本剤は、日本国内で想定される温度、土性、漏水、オーバーフロー、湛水深条件の違いによる除草効果および水稲に対する安全性の変動が小さいことが明らかとなるとともに、日本国内の水稲栽培場面において、安定した除草効果および水稲に対する安全性を発揮する可能性が高いことが示唆された。一般に、土壌処理型除草剤は、土壌を介して、雑草に吸収され除草効果を発揮することから、土壌特性の影響を強く受ける。除草効果と土壌特性との間の詳細なメカニズムについて、いまだ不明な部分が残されているが、小林(11)は、土壌中における農薬の存在形態、特に土壌水中における溶存体量が、土壌間において認められる除草効果の差につながっていると提唱しており、クロロアセトアミド系除草剤のテニルクロール(57)やテトラゾリノン系除草剤のフェントラザミド(58)について、複数の土壌水中の溶存体濃度とその土壌における除草効果との間に高い相関性が認められたことを報告している。このことは、土壌吸着性が低い方が除草効果を発揮するうえでは有利である一方で、除草剤は土壌中を土壌水の移動に伴って移動することを踏まえると、土壌吸着性が高い方が系外への流亡が少なく、除草剤の長期残効性ならびに周辺環境への影響面では有利であることを示唆している。イプフェンカルバゾンは、土壌カラムによるモデル試験結果(22)から、土性に関わらず、土壌吸着性が非常に強く、土壌移動性が小さいことが明らかになっている。第1章でも考察したが、本剤の薬効薬害に対して各種変動要因に対する影響が小さかったのは、本剤が実使用場面において想定されるいずれの条件下において

も土壌表層に強固な「土壌処理層」を形成し、それが長期にわたり維持されたためと推測される。言い換えれば、本剤のノビエに対する高い除草効果および水稲に対する高い安全性を最大限に発揮させるためには、土壌への吸着が速やかに行われ、吸着体が安定化するよう、薬剤処理、圃場整備を行う必要がある。

土壌への除草剤の吸着は土壌中の粘土鉱物および土壌有機物との間の理化学的作用であり、土壌粒径が細くなるほど、すなわち、粘土の比率が高くなるほど表面積が大きくなるため、土壌の吸着能は強くなる(59)。したがって、実使用場面においては、稲刈り後の荒起こしや春先の耕起、代掻きを丁寧に行い、土壌粒径がなるべく細かく、均一化する様努めることにより、土壌への吸着が速やかに進み、本剤の特長を最大限に引き出されると共に、系外への流亡リスクを最小限に止めることにつながると考えられる。一方で、本剤の土壌への強い吸着性は土壌中の横方向への拡散性が乏しいことも示唆しており、局所的な散布を行った場合、効果不足もしくは局所的な薬害を誘発する恐れがある。したがって、均一な散布を心がけることも重要と考えられる。

以上をまとめると、イプフェンカルバゾンの使用にあたっては、処理後間もないうちのオーバーフローによる系外への流亡は避けること、田植同時処理を行う場合は、速やかに圃場を再湛水させることが望ましいと判断される。さらに、本剤の特長をより安定的に得やすくするために、圃場の代掻きを丁寧に行い、土壌への速やかな吸着を促すとともに圃場全体に均一となる様、散布を行うことが望まれる。

第2章では、本剤の作用機構に関する検討を行い、本剤の一次作用点が VLCFAE であることに加え、本剤が少なくとも2つの炭素鎖伸長反応に対して低濃度で強い阻害活性を示すことから、本剤の作用点が

複数存在することが示唆された。この結果は、本剤に対して抵抗性を獲得した雑草の発生がしにくいことを示唆しており、本剤は抵抗性対策の面で有利な特性を有していると考えられる。また、本剤は VLCFAE に対して強固で不可逆的な阻害を示す可能性が認められた。このことは、本剤の阻害が長期間持続することを示唆しており、この特性が、実現場や第 1 章の試験で認められているノビエに対する長期残効性にもつながっている可能性が考えられる。この点については、更なる研究が必要である。

イプフェンカルバゾンのイネーヒエ間における高い選択性について、一般的な土壌処理型除草剤と同様に、本剤の強い土壌吸着性に基づく土壌表層への局在性とイネを土中深くに移植することによりヒエと吸収部位の位置を変え、薬剤の吸収量に差をつけることでイネに対する安全性を維持させる「位置選択性」が働いていると考えられており、第 1 章において、様々な自然環境条件下においても、「位置選択性」が強く維持されていることを示唆する結果が得られた。さらに、第 2 章において、「位置選択性」が発現しない水耕条件においても本剤に対する種間差が認められると共に、作用点である VLCFAE に対しても同様に種間差が認められ、「生化学的選択性」の存在が示唆された (Fig.2-2,2-3)。この結果について、本剤は、現在、日本国内において、「田植同時処理」の登録を有する VLCFAE を作用点とする除草剤の中で、初めて「生化学的選択性」の存在が示唆された剤である。2 章における水耕試験において、イネ、タイヌビエのいずれの植物に対しても、本剤は比較的低濃度で生育抑制効果を示した点を踏まえると、本剤の選択性は、「位置選択性」が占める割合が大きいと考えられるが、このことは、環境要因によって「位置選択性」が発現しにくい条件下においても選択性が維持されることを示唆しており、第 1 章で稲に対

する薬害の助長が認められなかった点や、移植深度が「除草剤処理層」付近となる条件下においても、水稻への生育抑制が比較的軽微であった点(2)、田植同時処理を想定した水稻根部付近への薬剤の練り込み条件下において、顕著な薬害助長が認められていない点(60)にも寄与していると考えられる。

これまでの除草剤研究において除草剤が対象とする雑草に作用するまでには、上記の自然環境による吸着、分解作用、植物による作用点までの吸収・移行ならびに代謝・排泄等の生理作用を受ける(61-63)。そのため、農薬の作物と雑草間における選択性は、1章で述べた位置選択性などによる「物理的选择性」や植物体の生育ステージ差を利用した「時間的选择性」、第2章で述べた作用点に対する親和性差や代謝能の違いによる「生理生化学的选择性」が総合的に組み合わせることによって成り立っている。第2章の VLCFAE に対する阻害試験で確認された種間差は、水耕試験において確認された種間差に比べて小さくなる傾向が認められている。このことは、本剤が作用点である VLCFAE に到達するまでの吸収移行能、もしくは、植物体内における解毒代謝能の差によって選択性を生み出している可能性があることを示している。したがって、今後、本剤のタイヌビエーヒエ間の選択性をより詳細に解析するために、植物体内への吸収移行および解毒代謝機構に関する研究が必要と考えられる。

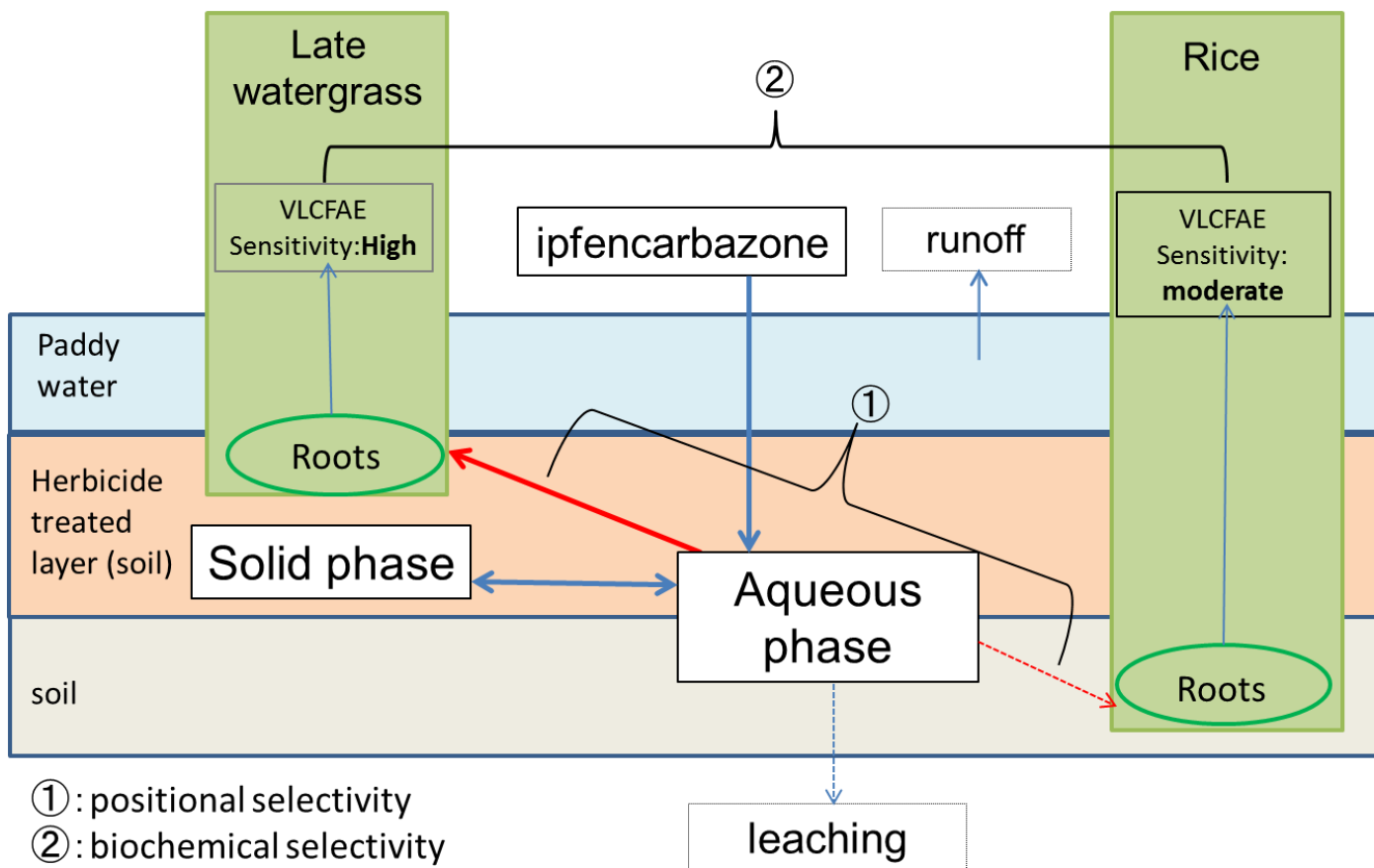


Fig. 3-1 The selectivity of ipfencarbazono

摘要

イプフェンカルバゾンにはノビエ類に対して高い除草効果を示すと同時に、水稲に対して高い選択性を示す新規除草剤である。本研究では、本剤の適正な使用方法および使用に際し、注意すべき変動要因を解析する事を目的に、実際の使用場面で想定される様々な条件下で本剤の薬効薬害を評価した。さらに、本剤のノビエとイネの間における選択性についての要因解析を目的に、作用機構およびその阻害様式について検討した。

まず、様々な温度、土性、減水深、湛水深、オーバーフロー(田面水流亡)条件下において、イプフェンカルバゾンのノビエ類に対する除草効果および移植水稲に対する薬害を評価した。その結果、温度、土性、漏水、湛水深を変えた条件下においても、イプフェンカルバゾンはノビエ類に対し高い除草効果を示すと同時に移植水稲に対する薬害も認められなかった。一方、オーバーフローに対しては、薬剤処理3時間後に流亡が起こった場合、ノビエ類に対する効果が若干低下したが、6時間以降の条件下では、効果は安定していた。さらに、近年、普及が進んでいる省労力技術の一つである田植同時処理を想定した落水処理から再湛水させるまでの時間の影響を検討した結果、再湛水させるまでの時間が長くなるにつれて、水稲の生育抑制が強くなる傾向が認められたが、24時間以内に再入水させる限りにおいて、水稲に対する薬害は軽微であった。以上の結果から、本剤は様々な環境変動要因に対して、非常に安定的であり、実使用場面において安定した効果を発揮することが示唆された。なお、これらの変動条件に対し、安定的であった要因として、本剤の低い水溶解度(0.515 ppm)に加え、土壌中における下方移行性が漏水、土性などの条件に関わらず、非常に小さいと

いう物理的特性によるものと推察した。

次に、作用機構の解析として、水耕条件下で、イプフェンカルバゾンのイネおよびタイヌビエの生育におよぼす影響を検討した結果、両植物とも展開中の新葉の生長抑制が認められた。一方で、根部に対しては、生育抑制がほとんど認められず、器官ごとに影響がそれぞれ異なることが明らかとなった。さらに、新鮮重の抑制程度を比較した所、タイヌビエに対する抑制はイネよりも強く、両植物間に生理生化学的選択性が存在する可能性が明らかとなった。そこで、この選択性の要因を解析するために、超長鎖脂肪酸伸長反応に対する効果を検討した結果、本剤は低濃度で超長鎖脂肪酸伸長酵素(VLCFAE)阻害剤であるカフエンストロールと同様に、C18:0 から C20:0、C20:0 から C22:0 への脂肪酸の伸長反応を阻害した。このことから、本剤の一次作用点は VLCFAE であることが強く示唆された。また、イネとタイヌビエの間で阻害程度を比較した結果、タイヌビエに対する阻害程度は、イネに比べておよそ 7 倍強く、水耕試験で認められた両植物間の感受性差が、作用点レベルにおいても存在することが明らかになると共に、本剤の両植物間の選択性は作用点に対する親和性が一要因となっていることが示唆された。

最後に、VLCFAE に対する阻害様式について検討した結果、本剤と酵素の反応時間(プレインキュベーション)が長くなるにつれて、その阻害程度が強くなる傾向が認められた。さらに、VLCFAE-イプフェンカルバゾン複合体の希釈の影響を検討した結果、阻害程度に変化は認められず脱離が起こりにくい結合であることが示唆された。以上の結果に加え、本剤の化学構造から本剤は不可逆的な阻害を示すことが示唆された。また、両植物の VLCFAE に対し、いずれも不可逆的な阻害様式を示したことから、作用点レベルでの選択性は、阻害様式の違

いに由来するものではないと考えられた。

まとめとして、本剤は、処理後まもないオーバーフローや田植同時処理における再入水の遅延を避けることにより、本剤のノビエに対する高い除草効果および水稲に対する安全性がより発揮されることが考えられた。また、本剤のノビエ - イネ間の選択性は、本剤の物理的特性に基づく土壌中の局在性と両植物の吸収部位の位置の違いを利用した選択性、いわゆる、「位置選択性」に加え、両植物間の作用点レベルでの感受性差、「生化学的選択性」も関与し、高い水稲安全性を生み出していると考えられた。

謝辞

本論文をまとめるに当たり、終始熱心なご指導とご校閲を賜りました筑波大学生命環境系教授 松本宏博士に深く感謝し、御礼申し上げます。

また、本論文の査読を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科教 戒能洋一博士、筑波大学生命環境系准教 吉田滋樹博士、筑波大学生命環境系講師 春原由香里博士に謹んで感謝申し上げます。

その他、本研究を行うにあたり、実験方法のご指導および多岐にわたるご助言を頂きました京都大学農学部農学研究科助教 岩上哲史博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科准教 山口拓也博士に厚く御礼申し上げます。

さらには、本研究の機会を賜りました北興化学工業株式会社、中島喜勝代表取締役社長、小川裕二顧問、森田健顧問、早川伸一製品企画部長、北興化学工業株式会社開発研究所、安村昌也開発研究所長には心より感謝の意を表します。また、本研究を遂行するに当たり、多大な支援、ご協力いただきました齋藤泰彦氏、竹内崇氏、を始めとする北興化学工業株式会社、製品企画部の皆様には深く感謝いたします。そして、小山公平氏、長谷川久和氏、久津間誠一氏をはじめとする北興化学工業開発研究所の皆様には、研究内容の取りまとめ等、多岐に渡り多大な助言、ご協力を頂きました。ここに改めて、深く感謝いたします。

引用文献(Reference)

- 1) United Nations, Department of Economic and Social Affairs: World Population Prospects, The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables (2017)

https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf

- 2) FAO: The future of food and agriculture – Trends and challenges (2017)

<http://www.fao.org/3/a-i6881e.pdf>

- 3) FAO: Statistical Databases (2017) <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

- 4) FAO: The State of Food and Agriculture 2016 (2016)

- 5) 日本植物防疫協会：病害虫と雑草による農作物の損失 (2008)

- 6) 日本植物調節剤研究協会：植調五十年史 (2014)

- 7) 日本雑草学会：これまでに日本で除草剤抵抗性が報告されている雑草(2017) <http://www.wssj.jp/~hr/weeds.html>

- 8) 農林水産省：農林業センサス/2015年農林業センサス確報第3巻 農林業経営体調査報告書 - 農林業経営体分類編 - (2016)

<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noucen/index.html>

< 第1章 >

- 9) 岡村充康、近藤智、本間百合子、竹内崇、武富巖、木戸康裕、沖田洋行、森田健：新規除草剤 HOK-201 に関する研究 第2報 水稲用除草剤としての作用特性，日本農薬学会第33回大会講演要旨集，**37** (2008)

- 10) 兼松慧、小山公平、菱池宣弘、高畑好之、竹内崇：新規除草剤イブフェンカルバゾンに関する研究 第7報 水稲用除草剤としての作用特性(5)，日本農薬学会第38回大会講演要旨集，**74** (2013)

- 11) 小林勝一郎：土壌中における除草剤の挙動と殺草作用発現，雑草研究 **47**(2)，**89-96** (2002)

- 12) 神崎充、鳥生和夫、大石博實、白川憲夫: 移植水稻に対するカフェンストロールの薬害発現要因, 雑草研究 46(3), **169-174** (2001)
- 13) 村上士明: 温室におけるプレチラクロールのイネとタイヌビエに対する除草活性の検討, 雑草研究 35(3), **155-163** (1990)
- 14) 神崎 充, 竹内 正毅, 白川 憲夫: カフェンストロールの水田条件下における除草効果変動要因, 雑草研究 46(3), **25-30** (2001)
- 15) 森田弘彦、江口末馬、中山壮一、宮原益次: 数種水田除草剤の連続降雨条件下での除草効果の変動, 雑草研究 34, **41-42** (1989)
- 16) 野田健児、茨城和典: 除草剤、主として prometryne の作用力の温度による変動要因の一考察、雑草研究 7, **105-109** (1968)
- 17) 野田健児、茨城和典、小沢啓男: 除草剤の作用力の温度による変動、雑草研究 4, **127-131** (1965)
- 18) Currier H. B. and Dybing C. D.: Foliar Penetration of Herbicides. Review and Present Status, Weeds 7(2), **195-213** (1959)
- 19) Barrier G. E. and Loomis W. E.: Absorption and translocation of 2,4-Dochlorophenoxyacetic acid and P32 by leaves, Plant. Physiol. 32, **225-231** (1957)
- 20) Schneider E. O. A: Discussion of the mode of action, tolerance and soil type effects of triazines, NEWCC Proc., 13, **416-420** (1959)
- 21) Muzik T. J. and Mauldin W. G.: Influence of environment on the response of plants to herbicides, Weeds 12(2), **142-145** (1964)
- 22) 竹内崇: 新規除草剤イプフェンカルバゾン(HOK-201), 植調誌 48, **132-137** (2014)
- 23) 兼松慧、秋山美佐紀、平松基弘: 日本農薬学会第 39 回大会講演要旨集, **75** (2014)
- 24) 竹内安智、近内誠登、竹松哲夫: 3-(2-methoxyphoxy)pyridazine の

- 土壌中における作用発現条件の解析, 雑草研究 14, **29-35** (1972)
- 25) Hata Y. and Isozaki Y.: The influence of soil properties in the adsorption and the phytotoxicity of piperophos, J. Pesticide Sci. 5, **23-27** (1980)
- 26) Peter C. J. and Weber J. B.: Adsorption, mobility, and efficacy of Metribuzin as influenced by soil properties, Weed Sci. 33, **868-873** (1985)
- 27) Peter C. J. and Weber J. B.: Adsorption, mobility, and efficacy of Alachlor and Metolachlor as influenced by soil properties, Weed Sci. 33, **874-881** (1985)
- 28) 一前宣正、米山弘一、近内誠登、竹松哲夫:数種水田除草剤におけるフロアブル剤と粒剤のタイヌビエ防除効果に及ぼす降雨に伴うオーバーフローの影響, 雑草研究 36, **334-337** (1995)
- 29) 一前宣正、竹内崇、重川弘宜、近内誠登、竹松哲夫:数種水田除草剤におけるフロアブル剤と粒剤の除草効果に及ぼす土壌の種類、湛水深、漏水および温度の影響, 雑草研究 36, **338-342** (1991)
- 30) 片岡孝義、古谷勝司:水稲稚苗移植栽培における除草剤の除草効果変動要因, 雑草研究 13, **54-57** (1972)
- 31) 小笠原勝、石川公広、近内誠登:数種 α -クロロアセトアニリド系除草剤の移植水稲薬害に及ぼす湛水深の影響, 雑草研究 35, **102-108** (1990)
- 32) 千坂英雄:水稲と雑草の競争, 雑草研究 5, **16-22** (1966)
- 33) 鈴木光喜、須藤孝久:水田雑草の発生生態 第3報 水稲稚苗移植田における雑草の発生消長と雑草害, 雑草研究 20, **114-117** (1975)
- 34) 橘雅明:寒冷地における水稲品種とタイヌビエとの競合関係の定量的評価に関する研究, 雑草研究 60, **1-4** (2015)

< 第 2 章 >

- 35) Konishi T. and Sasaki Y.: Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, **3598-3601** (1994)
- 36) Yun M. S., Shim, L. S. and Usui K.: Involvement of cytochrome P-450 enzyme activity in the selectivity and safening action of pyrazosulfuron-ethyl, *Pest Manag. Sci.* 57, **283-288** (2001)
- 37) Den, F., Usui K. and Ishizuka K.: Effect of pretilachlor and fenclorim on growth and glutathione *S*-transferase activity of rice and early watergrass, *Weed research JPN* 40, **163-171** (1995)
- 38) Kido T., Okita H., Okamura M., Takeuchi T. and Morita K.: Development of rice herbicide, ipfencarbazone, *J. Pestic. Sci.* 41(3), **113-119** (2016)
- 39) 近藤智、木戸庸裕、西田生郎、太田啓之:新規除草剤イプフェンカルバゾンに関する研究 第 8 報 イプフェンカルバゾンがタイヌビエの脂質に及ぼす影響, 日本農薬学会第 38 回大会講演要旨集, **104** (2013)
- 40) Bach L. and Faure J. D.: Role of very long chain fatty acids in plant development when chain length does matter, *C. R. Biologies* 333, **361-370** (2010)
- 41) Kunst L. and Samuels L.: Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, **721-727** (2009)
- 42) Sieber P., Scjorderet M., Ryser U., Buchala A., Kolattukudy P., Mettraux J. P. and Nawrath, C.: Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and post genital organ fusions, *Plant Cell* 12, **721-737** (2000)

- 43) Chen X., Goodwin S. M., Boroff V. L., Liu X. and Jenks M. A.: Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production, *Plant Cell* 15, **1170-1185** (2003)
- 44) Panikashvili D., Savaldi-Goldstein S., Mandel T., Yifhar T., Franke R. B., Höfer R., Schreiber, L., Chory, J. and Aharoni, A.: The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion, *Plant Physiol.* 145, **1345-1360** (2007)
- 45) Böger, P., Matthes, B. and Schmalfuß, J.: Towards the primary target of chloroacetamides –new findings pave the way. *Pest. Manage. Sci.* 56, **497-508** (2000)
- 46) Takahashi H., Ohki A., Kanzaki M., Tanaka A., Sato Y., Matthes B., Böger P. and Wakabayashi K.: Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis is inhibited by Cafenstrole, *N,N*-diethyl-3-mesitylsulfonyl-1*H*-1,2,4-triazole-1-carboxamide and its analogs, *Z. Naturforsch.* 56, **781–786** (2001)
- 47) 信澤岳:植物の器官生長における極長鎖脂肪酸の役割の解明, 博士論文, 奈良先端科学技術大学院大学(2012)
- 48) Millar A. A. and Kunst, L.: Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme, *Plant J.* 12, **121-131** (1997)
- 49) Lechelt-Kunze C., Meissner R. C., Drewes M. and Tietje K: Flufenacet herbicide treatment phenocopies the fiddlehead mutant in Arabidopsis thaliana, *Pest Manage. Sci.* 59, **847–856** (2003)
- 50) Blacklock B. J. and Jaworski J. G.: Substrate spencificity of Arabidopsis 3-keto-acyl-CoA synthases , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, **583–590** (2006)

- 51) Trenkamp S., Martin W. and Tietjen K.: Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, **11903-11908** (2004).
- 52) Tanetani Y.: Action mechanism of isoxazoline-type herbicides, *J. Pestic. Sci.* 37(3), **261-262** (2012).
- 53) Eckermann C., Matthes B., Nimtz M., Reiser V., Lederer B., Böger P. and Schröder J.: Covalent binding of chloroacetamide herbicides to the active site cysteine of plant type III polyketide synthases, *Phytochemistry* 64, **1045-1054** (2003)
- 54) Böger P.: Mode of action for chloroacetamides and functionally related compounds *J. Pestic. Sci.* 28, **324-329** (2003)
- 55) Tanetani Y., Fujioka T., Horita J., Kaku K. and Shimizu T.: Action of mechanism of a novel herbicide, fenoxasulfone, *J. Pestic. Sci.*, 36, **357-362** (2011)
- 56) 種谷良貴、藤岡智則、角 康一郎、清水 力：超長鎖脂肪酸伸長酵素阻害型除草剤，植物の生長調節 47, **120-126** (2012)
- < 第 3 章 >
- 57) 小林 勝一郎，尾上 雅英，杉山 浩：テニルクロールの殺草活性と土壤水中濃度，雑草研究 39(3), **160-164** (1994)
- 58) 尾上 雅英，小林 勝一郎，臼井 健二：フェントラザミドの残効性と土壤水中濃度の土壤間比較，雑草研究 45, **20-21** (2000)
- 59) Harper, S. S.: Sorption-desorption and herbicide behavior in soil, *Rev. Weed Sci.* 6, **207-225** (1994)
- 60) 笠原達矢、竹内崇、岡村充康、高畑好之：新規除草剤 HOK-201 (ipfencarbazone(ISO))に関する研究 第 5 報 水稲用除草剤としての

作用特性(3), 日本農薬学会第 36 回大会講演要旨集, **72** (2011)

- 61) 石塚 皓造: 除草剤の選択殺草作用機構に関する生理生化学的研究, 雑草研究 28(4), **229-242** (1983)
- 62) 臼井 健二: 植物の異物に対する認識とその解毒機構, 雑草研究 37(1), 15-27 (1998)
- 63) Usui K., Weed Biol. Manag.1(3) **128-132** (2001)