

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281050

研究課題名(和文) 個体レベルから生物群集レベルを網羅したネオニコチノイド殺虫剤の影響評価

研究課題名(英文) Effects of neonicotinoid insecticides on paddy organisms, covering from individuals to biocommunity level

研究代表者

関島 恒夫 (Sekijima, Tsuneo)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10300964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：群集および個体発生レベルで水稲用殺虫剤の影響を評価した。ネオニコチノイド系殺虫剤クロチアニジンは、水田生物群集に対し深刻な影響をもたらし、特に、ユスリカ類、ミジンコ類、トンボ類において著しい個体数減少が認められた。また、ネライストキシン系殺虫剤カルタップは、カエル類の初期発生に重篤な奇形をもたらし、その奇形発生プロセスには、形態形成や免疫に関わる遺伝子群の攪乱が影響していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of insecticides for paddy rice on paddy organisms were evaluated from individuals to biocommunity level. Neonicotinoid insecticide, Clothianidin, gave several negative effects to paddy biocommunity, and particularly caused a decrease of the amount of midges, dragonflies, and water fleas. Also, Nereistoxin insecticide, Cartap, induced several severe abnormalities on earlier development of frog embryo including *Xenopus*. The DNA microarray analysis suggested that disturbance of the genes expression related to morphogenesis and immune system was involved in teratogenic process of frogs.

研究分野：動物生態学、保全生物学、生理生態学

キーワード：ネオニコチノイド系殺虫剤 クロチアニジン カルタップ クロラントラリニプロール 水田メソコス ム 水田生物群集 DNAマイクロアレイ アフリカツメガエル

## 1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系殺虫剤は、今日において最も広範に用いられている殺虫剤の一群であり(Simon et al. 2015)、神経伝達機能を担うアセチルコリン受容体に対するアゴニスト作用によって、異常な興奮伝達をもたらし、殺虫効果を示す。本剤は、病害虫特異的な作用を有し、少量の施用によって継続的な殺虫効果を示すことから、「安全な殺虫剤」と謳われ、全世界的に急速に普及した。しかしながら、アセチルコリン受容体を介した神経伝達作用といった、ヒトを含めたあらゆる生物が有する普遍的な生理機能を標的にした殺虫剤による生態系への負の影響の懸念は拭い去れなく、さまざまな標的外生物への毒性が明らかとなってきた。

本研究では、ネオニコチノイド系殺虫剤の中でもとりわけ影響が懸念されるクロチアニジンと、ネオニコチノイド系殺虫剤の代替として挙げられていながらも、類似した作用機序をもつネライストキシン系殺虫剤カルタップ(Jinguji & Ueda, 2015)を対象に、群集・生態系レベルと個体発生レベルの2つの視点から本剤の影響を評価する。なお、個体発生レベルの評価には、ポストネオニコチノイド系殺虫剤として、最近、急速に施用が拡大している殺虫剤であるジアミド系殺虫剤クロラントラニプロールも加えて評価した。

## 2. 研究の目的

### (1) 水田メソコスムを用いた群集・生態系レベルでの影響

野外環境を再現した実験生態系であるメソコスム試験は、フィールド研究における条件設定および操作の困難さと、実際の影響とは解釈し難い実験室条件下で執り行われる暴露実験の両方の課題を解決することが可能な実験手法である。メソコスム試験は、対照区の設置、環境条件の均一化、系内外への移動の調整といった実験操作が容易であり(早坂 2014)、殺虫剤の影響評価において極めて強力なアプローチとなる。したがって、本研究では、水田メソコスムを設置し、クロチアニジンおよびカルタップの残留プロセスを短期的(単年度)、長期的(経年的)スケールの両視点から明らかにし、クロチアニジンおよびカルタップに対する生物群集組成および食物網構造の経時的な反応を評価する。

### (2) カエル類を生物指標とした個体発生レベルでの影響

殺虫剤の発生毒性を評価するにあたり、カエル類は発生学的に非常に有効な実験材料である。カエル類は、卵に卵殻がないため発生プロセスでの異常を検出しやすい。さらに、モデル動物であるアフリカツメガエルを有しているため、遺伝子発現解析に展開しやすい。また、形態形成に殺虫剤の影響が認めら

れた場合、ヒトを含む脊椎動物への潜在的なリスクを明らかにすることができる。したがって、本研究では、野生カエル類のヤマアカガエルとアマガエル、モデル生物であるアフリカツメガエルの3種の初期発生に対するクロチアニジン、カルタップ、およびクロラントラニプロールの影響を表現型レベルで明らかにする。さらに、発生毒性が表現型レベルで認められた発生ステージにおいて、DNA マイクロアレイ解析を実施することにより、殺虫剤曝露によって発現変動が認められる遺伝子群を絞り込み、攪乱される生物機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 水田メソコスムを用いた群集・生態系レベルでの影響

#### 水田メソコスムの設置

長さ 400cm × 幅 200cm × 深さ 75cm の屋外実験水槽を新潟大学農学部圃場に 6 つ設置し、クロチアニジン処理区、カルタップ処理区、および対照区(未暴露)の3つの処理について、それぞれ2回の繰り返しを設けた。メソコスムの設置が完了した平成 27 年度は、水を張った状態で静置し、水田生物群集の形成を促し、平成 28 年度より水田性魚類としてクロメダカを各メソコスムに雌雄 80 匹ずつ導入した。殺虫剤の暴露は平成 28 年 6 月より行い、施用濃度は、各殺虫剤の慣行基準の施用量に基づき決定された。

#### 殺虫剤の残留・蓄積プロセスの解明

2016 年 6 月～12 月の 5 カ月間にわたり、殺虫剤散布前、散布後翌日、1 週間後、2 週間後、以降 1 カ月ごとに各メソコスムにおいて有機物層、土壌、および田面水の採取を行った。なお、環境中および生物中における殺虫剤の残留濃度については、現在も引き続き解析中であるため、本稿では割愛する。

#### 生物群集へ及ぼす殺虫剤の影響評価

殺虫剤散布から一時間後に、死亡もしくは明らかな異常を示した種について、各メソコスムの外周から水面全域をくまなく観察し、個体数のカウントを行った。

動物プランクトンの採取は、1L の田面水を採水し、250 $\mu$ m メッシュのプランクトンネットによって濾過し、残存したものをサンプルとして採取した。動物プランクトンを除く生物標本の採取は 30cm × 90cm の長方形のコドラート内で行われた。1 メソコスムあたりコドラート 4 区画が、稲株 6 株を囲む形で無作為な位置に設けられた。コドラート内の稲株に付着した生物は、稲株表面の生物をバキュームサンプラーで吸引し、株内部の生物を目視で採取した。水中を遊泳する生物は、目幅 1.0mm、縦横 10cm の金魚網を用いて採取した。土壌中に潜行する生物の採取においては、コドラート内の表層土壌を全て採取した後、目幅 850 $\mu$ m の金属メッシュで洗浄し、残存物から生物を採取した。イトミミズ類とユスリカ類は、表層土壌内に膨大な数が観察され、個

体数の計測が困難であったことから独立してサンプリングを行い、それぞれ、50ml と 250ml のコアサンプラーを用いて採取された土壌から生物を採取した。

サンプリングされた生物の一部については、現在もなお解析中であるため、殺虫剤暴露後 1 カ月までの解析結果を本稿では示す。また、食物網構造の解明のための安定同位体比分析については、現在もなお解析中であるため本稿では割愛する。

#### (2) カエル類を生物指標とした個体発生レベルでの影響

##### 供試動物

水田で繁殖するアカガエル科に属するヤマアカガエルおよびアマガエル科に属するニホンアマガエルの 2 種が、殺虫剤の暴露実験のために供試された。両種の産卵直後の卵塊は、新潟県と山形県内の湿地環境に生息する繁殖集団から採取された。アフリカツメガエルについては、新潟大学で維持されているクローズドコロニーの個体から採卵後、人工授精を行い、受精卵を得た。卵および孵化後の生体の飼育は、水量 200ml のガラス水槽で行われ、1 水槽あたり 30~50 個の卵が用いられた。

##### 曝露実験に用いた殺虫剤

本実験では標準物質および水稲栽培に用いられる商業製剤を試験対象とし、クロチアニジン標準物質(和光純薬,東京)、カルタップ塩酸塩標準物質(和光純薬,東京)、およびクロラントラリニプロール標準物質(和光純薬,東京)が用いられた。溶媒には FETAX 試験プロトコル (ASTM, 1993) に基づく FETAX 培養液を用い、5 段階の殺虫剤暴露群、および FETAX 培養液のみの対照群が設けられた。

##### 催奇形性の観察

Gosner のステージ区分(1960)に基づく発生段階表に則り、ステージ 15 以前の発生初期卵が曝露実験に用いられた。観察期間は、尾芽胚が形成されるステージ 16 (神経管期) から開始し、ステージ 19 (尾芽胚後期)、ステージ 20 における孵化、および外鰓の消失を経て幼生への変態が完了するステージ 25 (鰓蓋完成期) に達するまでとした。顕微鏡下による観察は殺虫剤の暴露後 12 時間毎に行われ、各水槽における死亡および奇形を生じた個体数が記録されるとともに、死亡個体および奇形発生個体は速やかに水槽から取り除かれた。

##### DNA マイクロアレイ解析

カルタップにおいて、野生ガエルおよびアフリカツメガエルに共通して、脊椎および尾の褶曲が認められたことから、上記奇形を対象に DNA マイクロアレイ解析が行われた。脊椎の褶曲が認められる曝露 48 時間後および尾の褶曲が認められる曝露 60 時間後を基準に、それぞれの奇形発生の 6 時間前である曝露 42 時間後、54 時間後の計 4 つのステージで RNA のサンプリングを行った。

マイクロアレイ解析はアフィメトリクス社の GeneChip® *Xenopus laevis* 2.0 Genome Array が用いられた。発現量の算出は MAS5 によって行われ、各ステージにおける対照群と暴露群の発現量の比を算出し、2 倍以上の発現増加もしくは、1/2 以下の発現減少が認められた遺伝子群を抽出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 群集・生態系レベルでの殺虫剤の影響

殺虫剤の散布 1 時間後に、クロチアニジンにおけるユスリカ類幼虫、カルタップにおけるメダカの急性致死が観察された(図 1A,B)。クロチアニジンについては、2 つの処理区いずれにおいても、土壌中から田面水中にユスリカ類幼虫の産卵を伴う浮上・游泳の異常行動が観察された。カルタップについては 2 つの処理区のいずれにおいても、メダカの死亡が確認された。

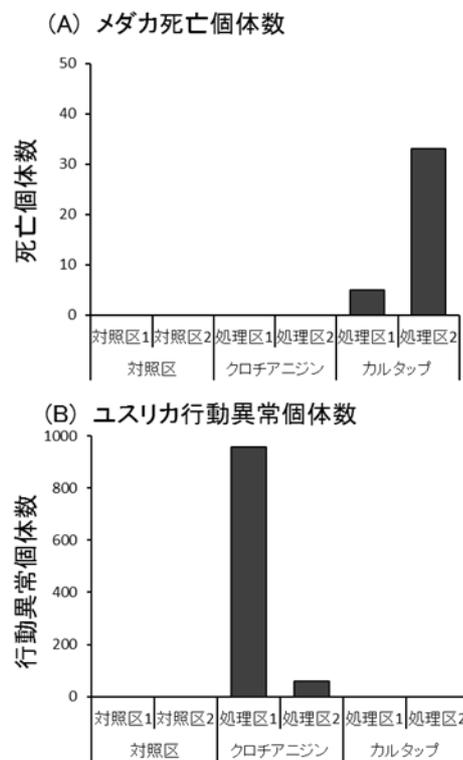


図 1 殺虫剤散布 1 時間後の急性毒性。

生物群集に対する殺虫剤の経時的な影響を可視化するため、生物種を単位面積あたりの存在量に補正した主要反応曲線 (PRC: Principle Response Curve) による解析が行われた。PRC 分析は、対照群の群集組成を 0 とし、各調査時点における処理群の群集組成が 0 よりどれだけ差異が生じているかを経時的に可視化する解析手法である。PRC1 値は対照群および処理群間の群集組成の差異を示し、個別の種における影響を示す bk 値と対照することで、各生物種における増減を捉えることを可能とする。

クロチアニジン処理区において、対照区の

群集組成との間に有意な差異が検出された (ANOVA:  $p < 0.05$ ) (図 2A)。PRC1 値を用いた評価では、施用前に関しては対照区に類似した群集組成であったものの、施用 24 時間後においては大きく離れた組成となり、施用 1 週間後において対照群との差異は最大となった。その後、施用 5 週間後になると再び PRC1 の値は 0 に近くなり、対照群の群集組成に近づいた。種スコアにおける評価では、調査期間を通じクロチアニジン処理区の PRC1 値が負であったことから、bk 軸上で  $bk > 0$  となるオオユスリカからマルミジンコ科 sp2 までの種、とりわけオオユスリカ、クロバナムスリカ、アオシマカイミジンコ、コカゲロウ科 sp、ホソナガカイミジンコ、アメンボ科 spp 幼虫、ショウジョウトンボ、ミズムシ科 spp 幼虫といった種において、個体数の減少が検出された。一方、 $bk < 0$  となるフトオケブカミジンコからマルタニシまでの種、とりわけフトオケブカミジンコでは個体数の増加が検出された。

カルタップ処理群においては、対象区の群集組成との差異に有意性は認められなかった (ANOVA:  $p = 0.167$ ) (図 2B)。ただし、PRC1 値における評価では有意な差は生じなかったものの、継時的に対照群との群集組成の相違が拡大する傾向が認められた。種スコアにおける評価では、 $bk < 0$  となるアオシマカイミジンコからイトミミズ科 sp までの種、とりわけアオシマカイミジンコ、ケンミジンコ科 sp、マダラミズメイガ属 sp 幼虫および蛹において個体数の減少が検出された。一方、 $bk > 0$  となるオオユスリカからミギワバエ科 sp 蛹までの種、とりわけオオユスリカ、フトオケブカミジンコ、コカゲロウ科 sp、ヒラマキガイモドキ、ミギワバエ科 sp 蛹といった種においては  $bk$  値が正となり、個体数の増加が検出された。

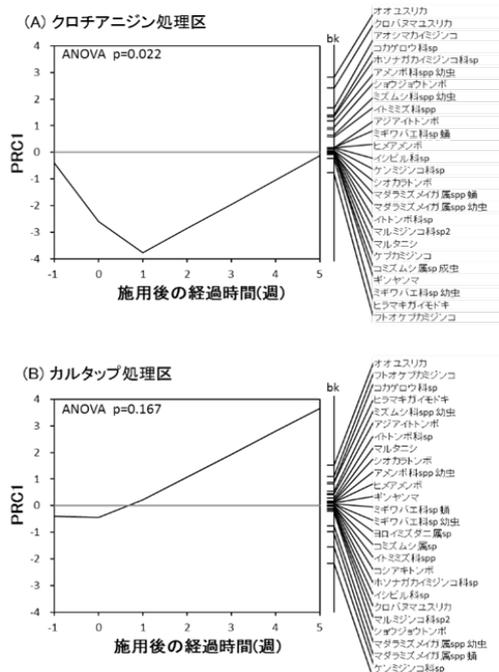


図 2 殺虫剤暴露後の生物群集の反応。

(2) 個体・遺伝子レベルでの殺虫剤の影響  
3 種の殺虫剤のうち、カルタップにのみ濃度依存的な催奇形性がみられた (図 3)。種間の差異として、ヤマアカガエルよりもアマガエルとアフリカツメガエルにおいて、低いカルタップ濃度での奇形が誘起された (図 3)。カルタップによって催された奇形パターンとして、すべての生物種において脊椎・尾の褶曲、水腫、伸長不全が認められ、アマガエルとアフリカツメガエルにおいて着色障害が認められた (図 4)。

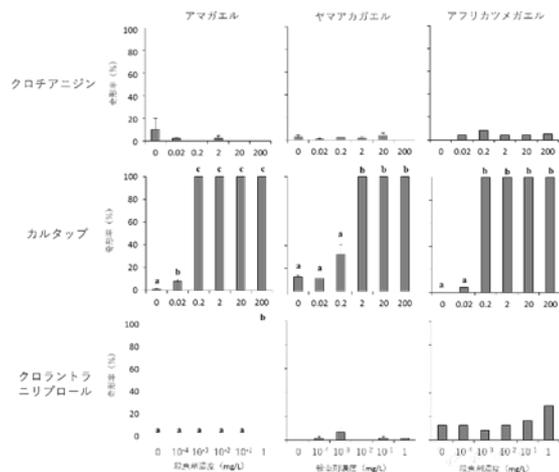


図 3 3 種の殺虫剤の催奇形性。



図 4 カルタップにより催された奇形。

カルタップによって催された脊椎・尾の屈曲を対象に、4 つの発生ステージでマイクロアレイ解析を行った。すべてのステージにおいて、共通して免疫システムにかかわる遺伝子群が最も顕著に検出され、次にストレス反応や神経システム、発生、成長にかかわる遺伝子群の発現変動が認められた (表 1)。曝露 60 時間後の発生ステージで検出された、あらゆる生物種で保存され胚発生において重要な役割を担っているとされる Wnt シグナル経

路の攪乱を図5に示す。攪乱を受けていた形態形成にかかわる遺伝子群の中には、ホメオティック遺伝子等の形態形成の根幹となっている遺伝子が検出されており、節足動物だけではなく、ヒトを含む脊椎動物に対する潜在的なリスクが浮き彫りとなった。

表1 カルタップにより攪乱された遺伝子群および生理機能。

生理機能	42時間	48時間	54時間	60時間
免疫システム	34genes ES=7.0	29genes ES=6.8	29genes ES=7.6	23genes ES=2.7
ストレス反応	33genes ES=2.2	20genes ES=1.6	-	-
抗原プロセス	5genes ES=2.2	-	-	3genes ES=1.6
神経システム	13genes ES=1.9	22genes ES=5.6	-	-
成長	12genes ES=1.8	17genes ES=4.5	14genes ES=2.0	15genes ES=3.3
発生プロセス	90genes ES=1.5	116genes ES=2.3	85genes ES=3.1	83genes ES=1.7
原腸形成	-	4genes ES=1.9	-	-

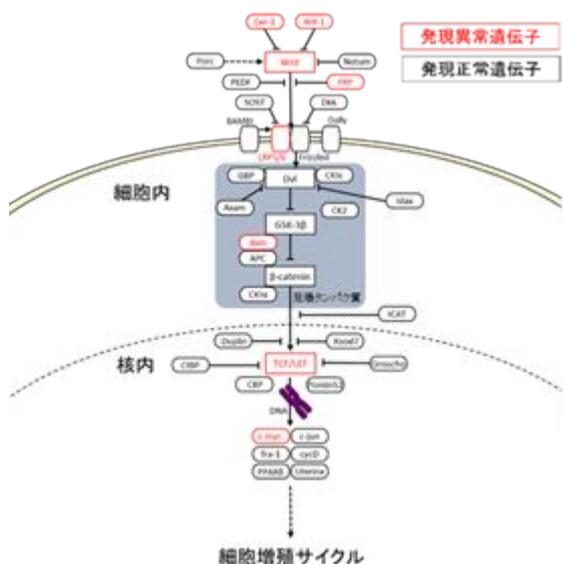


図5 カルタップにより攪乱された Wnt シグナル経路。

<引用文献>

①早坂大亮, 水田メソコスムによる生物群集に及ぼす殺虫剤の影響に関する研究, 日本農薬学会誌 39(2), 2014, 108-114  
 Jinguji, H., & Ueda, T. Can the use of more selective insecticides promote the conservation of *Sympetrum frequens* in Japanese rice paddy fields. *ODONATOLOGICA*, 44(1-2), 2015, 63-80.  
 Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Goulson, D.. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34. 2015

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

清水瑛人、鎌田泰斗、Roshan Nalinda、佐藤雄大、前野貢、久保田真敏、門脇基二、関島恒夫「水稲用殺虫剤が無尾類の初期発生におよぼす影響」日本生態学会第64回全国大会、2017年3月14~18日「早稲田大学早稲田キャンパス(東京都新宿区西早稲田)」  
 清水瑛人、鎌田泰斗、佐藤雄大、関島恒夫「水稲用殺虫剤が水田棲カエル類の初期発生におよぼす影響」第15回応用生態工学会北信越現地ワークショップ、2016年10月28~29日「新潟日報メディアシップ日報ホール(新潟県新潟市中央区万代)」  
 佐藤あやめ、鎌田泰斗、関島恒夫、笠井敦、五箇公一「水田メソコスムを用いて生物群集に対する殺虫剤の影響を評価する」日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会、2016年3月26~29日「大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

関島 恒夫 (SEKIJIMA, Tsuneo)  
 新潟大学・自然科学系・教授  
 研究者番号: 10300964

(2)研究分担者

前野 貢 (MAENO, Mitsugu)  
 新潟大学・自然科学系・教授  
 研究者番号: 10190315

渡邊 肇 (WATANABE, Hajime)  
 新潟大学・自然科学系・准教授  
 研究者番号: 10292351

門脇 基二 (KADOWAKI, Motoni)  
 新潟大学・自然科学系・教授  
 研究者番号: 90126029