

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82405

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550090

研究課題名(和文) 河川生態系への影響が心配な神経毒性農薬の汚染実態と水生昆虫による生態影響試験開発

研究課題名(英文) Ecological effects test using aquatic insects and measurement of neurotoxic pesticides considering their influence on river ecosystems

研究代表者

田中 仁志 (Tanaka, Hitoshi)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・担当部長

研究者番号：40415378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：河川生態系への影響が懸念されるネオニコチノイド系殺虫剤を対象として、河川水中の濃度の実態及び水生昆虫に対する影響に関する新規調査法の開発を研究目的とする。河川水中の農薬の比較的長期間の変動を把握する方法として期待されているパッシブサンプリングを水への溶解性が極めて大きいネオニコチノイド系殺虫剤に適用する際に必要となる吸着速度、設置可能期間、温度に対する吸着特性を明らかにした。さらに、ネオニコチノイド系殺虫剤の水生昆虫に対する影響の評価方法として、河川に人工基盤(半丁ブロック)を設置して付着した種の構成を解析する方法や水生昆虫(幼虫)の単位時間あたりの移動距離(速度)を解析する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to develop an analytical method of neonicotinoid insecticides influence river ecosystems, and to present a new method of evaluating their toxicity to aquatic insects. The installation period and temperature were set in order to facilitate passive sampling. Passive sampling is a research method receiving increasing attention as a way to monitor relatively long-term changes in pesticide concentrations in river water, particularly for neonicotinoid insecticides that have an extremely high solubility and whose adsorption coefficient depends on the adsorbent resin. To evaluate the effects of the insecticides on aquatic insects, species compositions were analyzed with artificial bases (blocks) installed on the riverbed, and video analysis was used to estimate the distance travelled per unit time (speed) by aquatic insect larva.

研究分野：環境生物学

キーワード：ネオニコチノイド系殺虫剤 水生昆虫 パッシブサンプリング 河川生態系 行動解析 種構成モニタリング アレニウスプロット 吸着速度定数

1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系殺虫剤は、神経伝達物質アセチルコリンの受容体に作用し、神経を刺激し続けて死に至らしめる神経毒で、強親水性を特徴とする(富沢(2000) *日本応用動物昆虫学会誌*,44,1,1-15.)。優れた害虫防除効果を有することから、近年広く利用されるとともに、使用量も多い。一方、ネオニコチノイド系殺虫剤は標的外となるべき益虫のミツバチに大きな影響を与えたことで注目され(門脇辰彦(2010) *化学と生物*,48,8,577-582.)。防除対象ではない昆虫への影響が懸念されている。それらの殺虫剤が河川中へ流出した際には、河川生態系における餌生物として重要な水生昆虫などに影響する恐れがある。近年では水生昆虫にも ppb レベルの低濃度で毒性を発現した(ROESSINK et.al. (2013) *Environ. Toxicol. Chem.*,32,5,1096-1100.) ことやその濃度を超えて河川水中から検出されていた事例(STARNER et.al. (2012) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88, 3, 316-321.)が報告されているため、情報が不足している水域移行後の環境濃度の実態や生態系への影響調査を行う必要がある。さらに、これまで殺虫剤への感度が高いとされてきた試験生物ミジンコへは影響が小さいため、新たな毒性評価方法が必要である。ネオニコチノイド系殺虫剤は神経伝達を阻害するため、神経に直結した生命現象を指標とすれば、迅速かつ低濃度で影響の評価が可能と考えられる。また、河川水中の農薬のいつとも分からない最高濃度時を正確に狙って採水することは、通常の方法(Grabサンプリング)では難しい。一方、水中に吸着樹脂(パッシブサンプラー)を設置し、設置期間中の平均存在濃度として捉える方法は、Grabサンプリングでは確認できなかった農薬を検出し(矢吹ら(2013) *第38回日本農薬学会大会講演要旨集*,92) 新たな環境動態把握手法として有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、汚染実態把握及び生物検定法の開発を目的として、(1)河川水中のネオニコチノイド系殺虫剤を対象にしたパッシブサンプリングの検討と共に、(2)水生昆虫に対する影響を判断基準とした生態影響評価手法を構築することにある。

3. 研究の方法

(1) ネオニコチノイド系殺虫剤を対象にしたパッシブサンプリングの検討

水環境中のネオニコチノイド系殺虫剤を対象にしたパッシブサンプラーを用いたモニタリング法の適用を検討するため、室内実験による吸着平衡定数の算出及び現地調査を実施した。パッシブサンプラーとして Porlar Organic Chemical Integrative Sampler (以下「POCIS」と表す)を用い、ネオニコチノイド系殺虫剤の吸着平衡定数を算出した。吸

着平衡定数が明らかになれば、POCIS への吸着量と浸漬時間から平均濃度を計算することができる。1L ガラス容器に POCIS を 1 組と農薬添加水溶液を入れた。農薬添加水溶液は超純水にネオニコチノイド系殺虫剤 8 種(アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、フィプロニル、イミダクロプリド、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム)農薬混合標準液を添加し 0.2 µg/L とするよう調整した。このガラス容器を遮光し、20 の恒温槽に入れ、100 rpm で振とうした。農薬添加溶液の濃度を一定に保つため、溶液の交換は毎日実施した。試験開始から 1、3、5、7 及び 14 日経過した POCIS を回収し、農薬の吸着量を測定した。

現地調査は 2015 年 8 月に大阪府内河川上流域の 1 地点で実施した。POCIS を河床付近に 4 日間浸漬し、設置時と回収時に Grab サンプリングにより水試料を採取した(写真 1)。この調査を 8 月 17~21 日と 21~25 日の 2 回実施した。回収した POCIS 内の吸着剤(Oasis HLB、Waters 製)を取り出してガラスカラムに充填し、アセトンで溶出後、水/メタノール混液に置換し、LC-MS/MS で農薬を定量した。



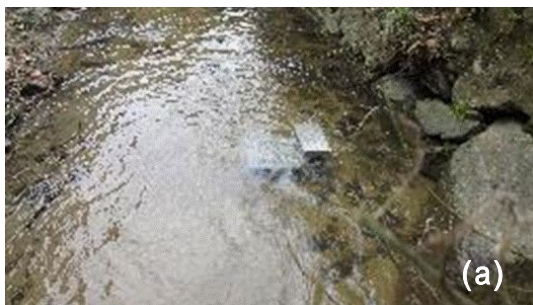
写真 1 パッシブサンプラーの外観(サンプラーは落葉等の付着や石の衝突による破損を防止するためステンレスかごの中に設置する)

(2) 水生昆虫の生息実態調査手法の検討

水生昆虫への生態影響評価手法の提案として、河川に人工的なすみか(人工基盤)を設置し、そこに付着する水生昆虫の種類の変化から影響を評価する生息実態調査手法の構築を試みた。

大阪府南東部を流れる、大和川水系石川の支流佐備川上流部の溪流において、上流側から A、B 及び C の 3 地点に人工基盤(半丁ブロック(以下、ブロック;縦×横×高さ=19cm×19cm×11cm、水平方向に楕円柱状の空洞がある))を設置した。それぞれの地点の河床(砂)の上に、1~数 m 間隔に 3 つのブロックを設置した。ブロックは、空洞が水流の方向と直角になるように設置した(写真 2a)。さらに、3 地点の pH、溶存酸素、電気伝導度など水質も同時に調査した。平成 27 年 3 月 4 日にブロックを設置し、4 月 23 日と 5 月 13 日に取り出して水生昆虫を採取した。付着した水生昆虫を目視で確認しながら、溪

流水でプラスチックバット上に流し入れた（写真 2b）。それぞれの地点毎に設置した 3 つのブロックは同じプラスチックバットに流し入れ、1 つの試料とした。落葉・落枝などを除去し、水生昆虫を捕集した。採集後のブロックは元の位置に再設置した。



(a)



(b)

写真 2 大和川水系石川の支流佐備川（大阪府）の上流部に設置した水生昆虫調査用人工基盤（半丁ブロック）(a)と定着した水生昆虫の採集風景(b)

(3) 水生昆虫幼虫の移動速度によるオニコチノイド系殺虫剤の新規影響評価手法

試験生物は、埼玉県西部の丘陵地帯を流下する、荒川支流の都幾川の平瀬（写真 3）で採取した。生息密度が大きく、比較的きれいな水の指標生物で、容易に採集できるシロタニガワカゲロウ、エルモンヒラタカゲロウ及びフタツメカワゲラの幼虫を使用した。採取した水生昆虫は、バケツへ移し、エアレーションを行い実験室へ持ち帰った。

オニコチノイド系殺虫剤で比較的高いクロチアニジンを含む水和剤（商品名：フルスウィング、住化グリーン株式会社）0.02g を 100ml 蒸留水に溶解し、殺虫剤原液とした。滅菌シャーレ（90×15mm、IWAKI サイテック）にガラス繊維濾紙（ワットマン GF/D）を敷いた後、ミネラルウォーター（ボルヴィック）20ml を加え、試験に用いる水生昆虫幼虫を 1 匹ずつ入れた。その後、クロチアニジン原液を設定濃度になるように加え、20 恒温室内の振盪機上に置き、42rpm 回転状態で暴露させた。本条件では、カゲロウ類幼虫は一週間以上、カワゲラ類では約 1 ヶ月の飼育が可能で、観察中に脱皮も行われ、最終的に羽化する個体もあった。クロチアニジンの影響は、ビデオカメラで撮影した幼虫の動画から、Windows10 パソコン用 2 次元運動

解析ソフトウェア DIPP-MotionV/2D（ディテクト株式会社）を用いて単位時間あたりの移動距離を運動量として求め、暴露濃度との関係解析した。



写真 3 荒川水系都幾川（埼玉県）の水生昆虫採取地点風景

4. 研究成果

(1) ネオニコチノイド系殺虫剤を対象にしたパッシブサンプリングの検討

ジノテフランを除く 7 種類の農薬は、14 日間まで吸着量と暴露時間に直線関係 ($r > 0.95$) を確認できた。それらの農薬の吸着平衡定数は、0.0464 ~ 0.2518 と算出された。ジノテフランの吸着量は比較的短時間で横ばいとなった。これは、POCIS の吸着樹脂である HLB がジノテフランを保持する能力が低いためであると考えられた。従って、HLB を吸着樹脂とする POCIS はジノテフランについては、長期間のサンプリングには適さないことが推察された。この結果を踏まえ、InertSep Pharma FF 固相カートリッジ（GLサイエンス製）を用いる方法を検討したところ、3 日程度の設置が可能であることが分かった。さらに、Sampling rate が吸着速度定数に比例することから、3 つの温度で Sampling rate をもつめ、アレニウスプロットした。良好な直線関係が認められ、各化合物の Sampling rate の温度依存性を把握することができた。これにより、設置期間中の平均水温での Sampling rate を推算することが可能となり、より正確に濃度を推算できるようになる成果を得た。

(2) 水生昆虫の生息実態調査手法の検討

4 月には、河床ではヒラタカゲロウ科 1 種が優占しており、その他にモンカゲロウ科、シマトビケラ科など昆虫が 1 種ずつ確認された。ブロックでも河床と同種のヒラタカゲロウ科 1 種が優先しており、その他にも河床と同種のモンカゲロウ科とシマトビケラ科の水生昆虫が 1 種ずつ確認された。

5 月には、河床ではマダラカゲロウ科 2 種が優占しており、その他に 4 月に確認されたモンカゲロウ科、シマトビケラ科など昆虫が 1 種ずつ確認された。ブロックでも河床と同種のマダラカゲロウ科 2 種が優占しており、その他にも河床と同種のモンカゲロウ科の水生昆虫が 1 種確認された。河床とブロックでは優占する水生昆虫の組成が概ね一致し

た。この結果から、礫をすみかとして利用する水生昆虫の生息実態の調査方法として、人工的なすみかとして人工基盤（ブロック）を設置する本提案は、簡便かつ安価でもあり、有用な手法であると考えられた。

一方で、ブロックに付着した水生昆虫は、地点Aと地点Bでは種組成が類似しているのに対し、地点Cでは地点Aあるいは地点Bと異なっていた。これらの地点の電気伝導度はA、B及びCで、それぞれ13.4、14.3及び26.4 mS/mと地点Cで高く、水質の違いにより種組成が変化した可能性がある。

(3) 水生昆虫幼虫の移動速度によるネオニコチノイド系殺虫剤の新規影響評価手法

図1aは、シャーレ内のフタツメカワゲラ幼虫を撮影したビデオ映像のキャプチャ画像である。この幼虫が約10分間移動した軌跡を運動解析ソフトで処理した線は図1bに示した。この時、経過時間と幼虫(体長15mm)の移動距離は、一次直線的な関係($R^2=0.97$)を示し、平均移動速度は約8.3mm/sであった(図2)。行動観察の結果では、連続して動き回る特徴があったカワゲラ類幼虫は、じっとしている時間が長いカゲロウ類よりも、運動量を指標とした影響判定に適した試験生物である可能性が示された。本研究において、市販運動解析ソフトを用いることにより、運動量の定量的評価が可能であることが明らかになった。一方、ネオニコチノイド系殺虫剤の無影響濃度(NOEC)や半数影響濃度(EC_{50})の算出までには至らなかった。適切

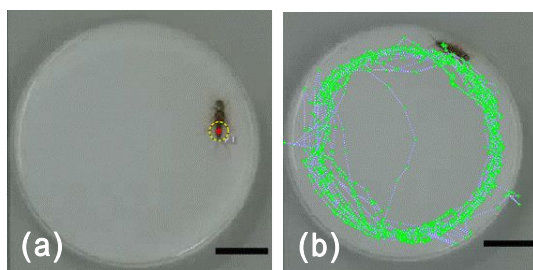


図1 シャーレ内の試験生物(フタツメカワゲラ幼虫)(a)と約10分間の移動軌跡線(b)(写真中のスケールは2cm)

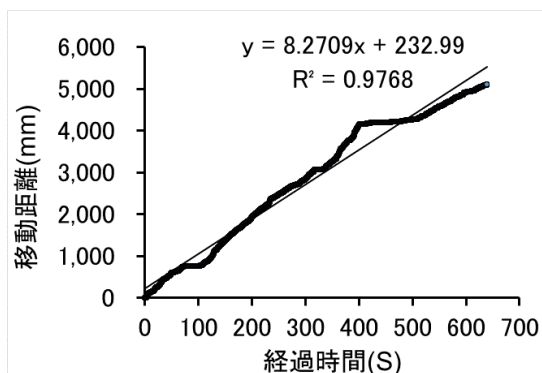


図2 シャーレ内の試験生物(フタツメカワゲラ幼虫)の経過時間と移動距離の関係

な暴露期間等を検討することにより、算出が可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Yoshinori Yabuki, Takashi Nagai, Keiia Inao, Junko Ono, Nobuyuki Aiko, Nobutoshi Ohtsuka, Hitoshi Tanaka and Shinji Tanimori, Temperature dependence on the pesticide sampling rate of polar organic chemical integrative samplers (POCIS), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol.80, Issue 10, 2016, 2069-2075.

〔学会発表〕(計7件)

矢吹芳教, 小野純子, 相子伸之, 五十幡怜人, 渡邊裕純, 大塚宜寿, 田中仁志, 水田排水路におけるパッシブサンプリングを用いたネオニコチノイド系殺虫剤のモニタリング, 第51回日本水環境学会年会講演集, 2017, 517.

矢吹芳教, 小野純子, 相子伸之, 大塚宜寿, 田中仁志, パッシブサンプラーによる環境水中のネオニコチノイド系殺虫剤のモニタリング, 第50回日本水環境学会年会講演集, 2016, 593.

大塚宜寿, 田中仁志, 相子伸之, 矢吹芳教, 小野純子, POCIS法におけるネオニコチノイド系殺虫剤のRs値の算出方法, 第50回日本水環境学会年会講演集, 2016, 592.

田中仁志, 大塚宜寿, 相子伸之, 矢吹芳教, 水生昆虫の行動に基づくオニコチノイド系殺虫剤の新規影響評価法の検討, 日本陸水学会第81回大会, 2016, 183.

相子伸之, 矢吹芳教, 大塚宜寿, 田中仁志, 水生昆虫の生息場所として人工基盤を用いた河川生態影響評価手法の提案, 日本陸水学会第81回大会, 2016, 185.

矢吹芳教, 水田を含む水環境中におけるパッシブサンプリング技術を用いた農薬モニタリング, 農薬環境科学研究, 2016, 39-45.

相子伸之, 矢吹芳教, 大塚宜寿, 田中仁志, 河川の生態影響評価に向けた水生昆虫の生息実態調査手法の提案, 日本陸水学会第80回大会, 2015, 185.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中仁志 (TANAKA HITOSHI)
埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・担当部長
研究者番号: 40415378

(2) 研究分担者

矢吹芳教 (YABUKI YOSHINORI)
地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所・環境研究部・主任研究員
研究者番号: 00360818
相子伸之 (AIKO NOBUYUKI)
地方独立行政法人大阪府立環境農林水産

総合研究所・環境研究部・主任研究員
研究者番号：30443526
大塚 宜寿 (OHTSUKA NOBUTOSHI)
埼玉県環境科学国際センター・化学物質担
当・主任研究員
研究者番号：30415393

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし