

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：84306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510088

研究課題名(和文)カエル後期発生における奇形と変態遅延に関するトリアジン系除草剤の比較毒性学的研究

研究課題名(英文)Comparative toxicology of triazine herbicides focusing on delayed metamorphosis and malformations during the postembryonic development of anurans

研究代表者

坂 雅宏(Saka, Masahiro)

京都府保健環境研究所・水質課・主任研究員

研究者番号：80419192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界中で汎用的に使用されているトリアジン系除草剤について、両生類に対する毒性影響を総括的に解明すべく、主要な7種の除草剤を対象に、ネツタイツメガエル幼生を使った長期低濃度曝露試験を実施した。試験結果により、これらの除草剤が共通して、幼生の成長や発生を阻害する化学的ストレスーとして作用し、さらに、脊椎の異常をもたらす催奇形性物質であることが確認された。また、甲状腺組織の病理観察により、これらの除草剤による成長・発生阻害は、甲状腺機能の攪乱によるものではなく、別の作用機序によることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Triazines have been commonly used as herbicides on a global scale. Although toxic effects of triazines have been intensively studied, chronic toxicity of triazines on amphibians is still controversial. We revealed non-lethal toxic effects of seven triazine herbicides on the anuran postembryonic development by conducting long-term exposure tests using premetamorphic tadpoles of Western clawed frogs. Our morphometric results consistently indicated that the triazines acted as a chemical stressor inhibiting tadpole growth and/or development in a thyroid-inactive mode. In addition, it was demonstrated that the triazines had teratogenicity to induce axial malformations in developing tadpoles.

研究分野：環境毒性学

キーワード：カエル 後期発生 トリアジン 除草剤 成長阻害 発生遅延 奇形 甲状腺

1. 研究開始当初の背景

草種別の選択毒性に優れており、我が国では農耕地はもとより、河川敷やゴルフ場においても広く使用されているトリアジン系除草剤は、その多くが魚毒性 A 類に分類され、急性毒性という点では低毒性の除草剤であると考えられている。しかし、2000 年以降、トリアジン系除草剤の一つであるアトラジンについて、両生類幼生に対する成長阻害、催奇形性、生殖器官や性比への影響を示唆する研究成果が米国を中心に次々と公表された。生殖器官や性比への影響については、その後の研究により再現性のないことが指摘され、そのため否定的な見解が主流となったが、その他の影響については十分に検証されていない。

アトラジンの成長阻害作用や催奇形性は、我々の先行研究において見いだされたシメトリンによるカエル後期発生過程での毒性影響と類似点が多い。シメトリンもトリアジン系除草剤の一つであり、このような毒性影響の発現には、共通の化学構造であるトリアジン環が重要な役割を果たしている可能性がある。すなわち、アトラジンやシメトリン以外のトリアジン系除草剤についても、これらと同様の毒性影響が発現することが考えられるため、トリアジン系除草剤の安全性について再評価する必要が生じている。

2. 研究の目的

官能基や側鎖の異なる複数のトリアジン系除草剤について、カエル幼生（オタマジャクシ）を用いた低濃度長期曝露試験を行い、シメトリンが引き起こす毒性影響がトリアジン系除草剤に共通するものかどうかを明らかにするとともに、官能基の違いと関連づけながら、毒性影響の共通性やその発現リスクの相違について検証する。

3. 研究の方法

- (1) 研究対象とするトリアジン系除草剤は 7 種とする。これらは、化学構造上、以下の 2 群に大別される。すなわち、シメトリン同様にトリアジン環第 6 位にメチルチオ基を有するアメトリン、プロメトリン、ジメタメトリンと、メチルチオ基の代わりにクロロ基を有するシマジン、アトラジン、プロパジン、シアナジンである。
- (2) 試験生物種は、実験動物としての利便性や国際的な汎用性を備えたネッタイツメガエルとする。そのオタマジャクシで、発生段階が前変態期（後肢が枝芽の状態）のものを以下の試験に使用する。
- (3) 96 時間の急性毒性試験を行い、7 種のトリアジン系除草剤の半数致死濃度を決定する。
- (4) 半数致死濃度よりも 1~3 桁低い濃度範囲で長期曝露試験を行う。曝露濃度は 2 段階とし、曝露群 I は半数致死濃度の 1/10（一部の除草剤については 1/100）の濃度、曝

露群 II は曝露群 I の 1/10 の濃度とする。曝露期間は約 28 日間とし、対照群のオタマジャクシが変態最盛期直前（後肢が完全に形成され、前肢が出現あるいは出現間際であるが、尾の退化吸収はまだ始まっていない段階）に達した時点で試験を終了する。

- (5) 曝露期間中、定期的にオタマジャクシを実体顕微鏡下で観察し、全長、後肢長、発生段階、体重等を計測するとともに、奇形等の外観上の異常についても記録する。これらの観察値について、対照群と曝露群との間で統計的比較を行い、有意差の有無をもって、発生遅延（後肢の発達阻害を伴う変態遅延）、成長阻害（体重・全長の減少）、奇形等に注目した毒性影響の有無や程度を判定する。
- (6) 発生遅延等の影響については、変態を制御する重要な器官、すなわち、甲状腺について、組織学的な病理観察を行い、その影響が甲状腺機能の攪乱により生じたものかどうかを判断する。
- (7) 上記(5),(6)で観察された毒性影響の程度や発現濃度を比較することにより、環境中での影響発現リスクについて、トリアジン系除草剤の間での共通性や相違点を化学構造と関連付けて考察する。

4. 研究成果

- (1) 7 種のトリアジン系除草剤の半数致死濃度は、シメトリン同様に比較的高い濃度であった。これらの除草剤は、急性毒性に関する限り、魚毒性と同様、オタマジャクシに対しても低毒性であることが示唆された。
- (2) しかし、半数致死濃度よりも 1 桁（一部の除草剤については 2 桁）低い濃度の曝露群 I で、すべての除草剤が有意な成長阻害や発生遅延をもたらした（図 1）。一部の除草剤については、同様の影響が、さらに 1 桁低い濃度の曝露群 II においても認められ

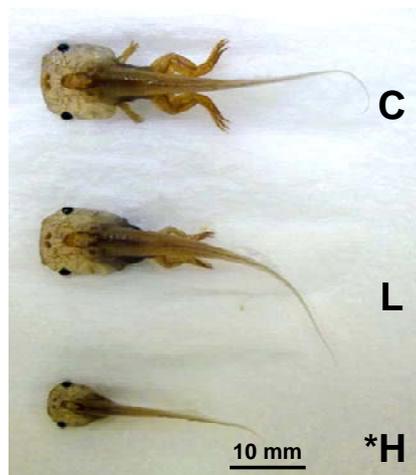


図 1. トリアジン系除草剤によるオタマジャクシの成長・発達阻害。C: 対照群、L: 曝露群 II、H: 曝露群 I。後肢の発達が阻害され、とくに曝露群 I では全身の伸長も著しく阻害されている。

た。トリアジン系除草剤に共通する毒性影響として、カエル後期発生における成長と発生の阻害作用が認められた。

(3) 奇形に関しては、対照群では異常を認めなかったが、曝露群ではすべての除草剤について、明らかな奇形が複数個体に見られた。個体により、奇形の程度には差があったものの、症例はすべて脊椎のわん曲であった(図2)。その出現頻度は、多くの場合、有意に高いものと判定され、トリアジン系除草剤に共通するもう一つの毒性影響として、脊椎の異常をもたらす催奇形性が確認された。



図2. トリアジン系除草剤により生じたオタマジャクシの脊椎わん曲(右)。左は対照群での正常なオタマジャクシ。

- (4) すべての除草剤について、成長と発生の阻害作用が認められたものの、甲状腺組織の病理観察では、抗甲状腺ホルモン物質による典型的な病変、すなわち、ろ胞細胞の過形成やこれに伴う甲状腺肥大等は一切観察されなかった。トリアジン系除草剤による成長・発生阻害は、甲状腺機能の攪乱により生じたものではなく、別の作用機序によることが示唆された。
- (5) 成長・発生阻害作用については、メチルチオ基を有するトリアジン系除草剤よりも、クロロ基を有するものの方が、影響の程度が重篤であり、濃度によってはオタマジャクシの成長と発生をほぼ完全に阻害した。脊椎の異常に関しては、シマジンにおいて、半数以上の個体に奇形が見られ、とくに高い出現率を示した。
- (6) 急性毒性発現濃度(半数致死濃度)を基準に、上記(2),(3)の影響発現リスクを評価した場合、クロロ基を有するトリアジン系除草剤の方が、リスクが大きいものと推察された。
- (7) トリアジン系除草剤が成長・発生阻害や奇形を引き起こす濃度は、河川等の環境水から検出される通常のレベルよりもかなり高い。しかし、農耕地等、除草剤の施用地やその直近の用水路等においては、これらの影響が発現する濃度に達することも

あり得る。成長や発生の遅れた個体や脊椎の異常を伴う個体は、野外ではその後の生存率が著しく低下する。究極的には、地域個体群の減少へとつながることも危惧されるため、フィールド調査を含めた発展的な研究が必要とされる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① M. Saka, N. Tada, and Y. Kamata. 2012. Examination of an amphibian metamorphosis assay under an individual-separated exposure system using *Silurana tropicalis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86, 86–92. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.08.034. 査読有.
- ② M. Saka, N. Tada, and Y. Kamata. 2013. Application of an amphibian (*Silurana tropicalis*) metamorphosis assay to the testing of the chronic toxicity of three rice paddy herbicides: Simetryn, mefenacet, and thiobencarb. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 135–143. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.03.023. 査読有.

[学会発表] (計8件)

- ① M. Saka, N. Tada, Y. Kamata. Chronic toxicity tests of three rice paddy herbicides on *Silurana tropicalis* tadpoles using a modified amphibian metamorphosis assay. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific Meeting. 24–27 Sept. 2012. ANA Hotel Kumamoto Newsky (Kumamoto, Japan)
- ② 坂 雅宏・多田 哲子・鎌田 洋一. メチルチオトリアジン系除草剤によるカエル後期発生への毒性影響について. 第19回日本環境毒性学会研究発表会. 2013年9月8日. 東洋大学(東京都).
- ③ 坂 雅宏・多田 哲子・鎌田 洋一. メチルチオトリアジン系除草剤によるカエル後期発生への毒性影響について. 日本爬虫両棲類学会第52回大会. 2013年11月2日. 東海大学(札幌市).
- ④ 坂 雅宏. 両生類の環境毒性学(招待講演). 独立行政法人農業環境技術研究所生物多様性研究領域セミナー. 2014年2月28日. 農業環境技術研究所(つくば市).
- ⑤ 坂 雅宏・多田 哲子・鎌田 洋一. クロロトリアジン系除草剤によるカエル後期発生への毒性影響について. 第20回日

本環境毒性学会研究発表会. 2014年9月11日. 富山国際会議場 (富山市).

鎌田 洋一 (KAMATA, Yoichi)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 20152837

- ⑥ M. Saka, N. Tada, Y. Kamata. Chronic toxicity of triazine herbicides on the postembryonic development of *Xenopus (Silurana) tropicalis*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific Meeting. 15–17 Sept. 2014. Adelaide, Australia.
- ⑦ M. Saka, N. Tada, Y. Kamata. Chronic toxicity of triazine herbicides on the postembryonic development of *Xenopus (Silurana) tropicalis*. Joint Symposium of the Japan Society for Comparative Endocrinology and the International Society for Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 7–9 Nov. 2014. Okazaki National Institute for Basic Biology (Okazaki, Japan).
- ⑧ 坂 雅宏・多田 哲子・鎌田 洋一. クロロトリアジン系除草剤によるカエル後期発生への毒性影響について. 日本爬虫両棲類学会第53回大会. 2014年11月8日. 神戸山手大学 (神戸市).

[その他] ホームページ

- ① 平成24年度京都府保健環境研究所事業概要
http://www.pref.kyoto.jp/hokanken/documents/jigyogaiyou_h24.pdf
- ② 平成25年度京都府保健環境研究所事業概要
http://www.pref.kyoto.jp/hokanken/documents/jigyogaiyou_h25.pdf
- ③ 平成26年度京都府保健環境研究所事業概要
http://www.pref.kyoto.jp/hokanken/documents/jigyogaiyou_h26.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂 雅宏 (SAKA, Masahiro)
京都府保健環境研究所・水質課・主任研究員
研究者番号: 80419192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

多田 哲子 (TADA, Noriko)
京都府保健環境研究所・水質課・主任研究員
研究者番号: 70419191

(4) 研究協力者