

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340052

研究課題名(和文)食物網を考慮した化学物質の生態影響評価手法の開発

研究課題名(英文) Construction of a simple bi-trophic microcosm system: importance of comprehension at aquatic food web.

研究代表者

坂本 正樹 (Masaki, Sakamoto)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：20580070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：既存の毒性試験と結果を直接比較できる新たなマイクロコズム試験系を開発し、個体、個体群、群集レベルでの統一的な評価法を確立することを目的とし、研究を行った。マイクロコズム試験系の構成生物は、生態影響評価の標準試験生物として用いられるムレミカツキモとオオミジンコとした。毒性影響の指標(エンドポイント)としては「群集の動態」とすることで、既存の毒性試験結果との比較が可能であった。ただし、化学物質の作用パターン(どの生物に強く作用するか)の違いによって、種レベルと群集レベルで結果が大きく異なることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Risk assessments of the chemicals are conducted using reference indexes of toxicity estimated by species-level laboratory tests and/or micro-/mesocosm community-level studies. Although, the existing micro-/mesocosm communities are structurally too complicated, and thus it is difficult to compare the experimental results directly with those from species-level tests. Here, we developed a procedure of a simple bi-trophic microcosm experiment which contains the common species for testing chemical toxicities. This simple microcosm system would be an applicable tool to estimate the disturbing impacts of pollutants on plant-herbivore interactions, and linking the species- and population-/community level risk assessments in the future studies.

研究分野：生態学, 生態毒性学

キーワード：マイクロコズム 毒性影響 ミジンコ 藻類 エンドポイント 群集構造

1. 研究開始当初の背景

(1) 種レベルの評価と群集レベルでの評価

わが国では、有害化学物質の影響を評価する際、標準試験生物を用いた種レベルの試験で得られた毒性値 (PNEC) を指標としている。欧州では、様々な生物種の試験データから「影響を受ける種の割合」を算出し、全体の 5% の種が影響を受ける濃度 (HC₅) を基準値とした評価を行っている。群集レベルでの評価手法としては、マイクロコズムやメソコズムを用いた実験が行われるが、種レベル試験と異なる結果が得られることも多い。このような矛盾は、群集実験における生物間相互作用 (競争・捕食-被食など) や個体群の回復速度の種間差、休眠卵 (休眠細胞) からの孵化 (発芽) などの効果によると考えられている。そのため、実際の生態系を想定した生態影響評価を行う際は食物網を考慮に入れた詳細な検討が不可欠である。

ただし、実際に野外で「直接影響 (生存、増殖への影響)」が観察されるほど高濃度の汚染が起こる事例は少ない。従って、低濃度の化学物質が生物間相互作用・生態系機能へ与える影響を評価する必要がある。

(2) 標準試験生物を主要構成種としたマイクロコズムの開発

現行の種 (個体) レベル試験から得られるエンドポイントと直接比較できる群集レベルの標準的なエンドポイントは定められていない。マイクロコズムやメソコズムなどの試験ガイドラインは OECD (草案), US EPA (OPPTS 850. 1900), ASTM International (E1366-11) などが公表している。例えば US EPA のプロトコルに沿う場合、10 種の藻類と 5 種の水生動物が必要なるため、小規模の試験機関ではすべての生物を維持・管理しながらの実施が難しい。

(3) 食物網を考慮したリスク評価

マイクロコズムやメソコズム実験では、各生物の現存量と水質のモニタリングが行われる。ほぼ全ての研究において、多変量解析、統計モデルもしくは数理モデルを用いることで、一次生産量、個体群動態、群集構造、絶滅確率などをエンドポイントとした評価がなされている。しかし、これらの方法では各生物が生態系内でどのようなニッチを占め、どのような機能的役割 (例えば、食物網における重要度) を担っているのかを把握できない。

2. 研究の目的

本研究では、「食物網を考慮した化学物質の生態影響評価手法を確立する」ため、以下の 4 点を達成目標とした。

(1) 「現行の毒性試験と直接比較できる」新たなマイクロコズム系を開発する。

(2) 低濃度曝露による生物間相互作用の攪乱影響を定量的に評価する。

(3) 食物網を考慮し、生態系機能 (一次生産量, 食物網構造, 高次消費者の成長量) をエンドポイントとした新しい評価法の提言。

(4) 既存の評価基準 (PNEC や HC₅) と、生態学的視点を取り入れた本研究の評価基準との比較。

3. 研究の方法

研究期間は平成 26 年 4 月から平成 28 年 3 月までの 3 年間であり、期間中に (1) 藻類とミジンコを主とするマイクロコズムを開発し、(2) 農薬や重金属による各生物の生存、再生産、生物間相互作用への影響と生態系構造・機能への評価を行った。

(1) マイクロコズムの開発

マイクロコズムは、どのような試験機関でも実施可能な単純な構造とした。構成種として、毒性試験の標準試験生物である藻類 (ムレミカヅキモ *Pseudokirchneriella subcapitata*), ミジンコ (オオミジンコ *Daphnia magna*) を用い、系が 1 ヶ月程度、安定的に保たれることを目指し、容器の容量、各生物の初期密度、投入のタイミング等の検討を行った。飼育水には、動・植物プランクトンを同時に培養できる COMBO 培地を用いた。

(2) 農薬や重金属による各生物の生存、再生産、生物間相互作用への影響

① マイクロコズムを用いた殺虫剤、除草剤、重金属の影響評価

殺虫剤 (フェニトロチオン), 除草剤 (シメトリン), 重金属 (銀ナノコロイド) を対象に、従来の種レベル試験から得られる指標値と本研究で開発したマイクロコズム試験から得られる結果を比較した。

② 餌閾値レベルに対する殺虫剤の影響

カプトミジンコ (*D. galeata*) およびスカシタマミジンコ (*Moina micrura*) を対象に、個体群の餌閾値レベルに対する殺虫剤の影響を調査した。この検証のため、殺虫剤フェニトロチオンの曝露 ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) または無曝露の環境下で内的自然増加率が 0 になるときの餌濃度の値を推定した。

③ 水槽レベルマイクロコズムを用いた検証

20 L (2 栄養段階) 及び 300 L 容量 (魚を加えた 3 栄養段階) の系での実験を行い、フラスコレベル試験系と同様の結論が得られるかを確かめた。

4. 研究成果

(1) マイクロコズムの開発

① クロレラとムレミカヅキモの有機炭素量の比較

動物プランクトンの飼育で一般的に使用されるクロレラ (*Chlorella vulgaris*) と、本研究で使用するムレミカヅキモの細胞当たり

有機炭素含有量を比較し、マイクロゾムにおけるムレミカヅキモの初期細胞密度を決定した。

炭素量の測定を行ったところ、ムレミカヅキモの細胞サイズ(約 10 μm)はクロレラ(約 2 μm)より 5 倍程度大きい、細胞あたりの有機炭素含有量はクロレラがムレミカヅキモより高いことがわかった(図 1)。この結果から、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ のクロレラに相当するムレミカヅキモの密度は $2.6 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ と算出された。

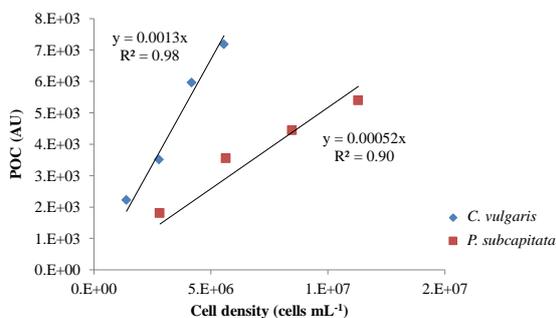


図 1. クロレラとムレミカヅキモの細胞密度と有機炭素含有量の関係。

ただし、細胞内の炭素含有量がそのまま餌としての質の高さを表すわけではない。藻類細胞あたりのリン含有量は水中のリン酸態リン濃度に依存し、細胞内の C:P 比は環境に応じて変化する。水中のリン酸態リン濃度が低い環境で藻類を培養すると C:P 比が低くなり、それを摂食するミジンコの成長や増殖率が低下することが知られている。とは言え、炭素は生物体を構成する重要な元素であり、餌の量を炭素重量に換算することで多くの先行研究と同様に餌の過不足の指標として判断することができる。これらの結果から、マイクロゾム試験系におけるムレミカヅキモの初期密度をオオミジンコの成長・増殖に十分な $5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ が望ましいと判断した。

②オオミジンコの初期個体群の条件選定

マイクロゾム実験系においてオオミジンコ初期個体群を構成する成体と仔虫の比率を変えて比較したところ、実験期間中に処理区間で pH や DO の変動パターンに大きな違いは認められなかった(図 2a, b)。ムレミカヅキモの細胞密度は、オオミジンコの増殖と同調して低下し、day 18 以降はどの処理区においても上昇した(図 2c)。実験終了時のオオミジンコ密度は「仔虫」で他の処理区より 2 倍以上高かった(図 2d, e)。

pH がすべての処理区で day 24 以降に上昇したのは、ムレミカヅキモの密度がその時に大きく上昇したためであると考えられる。DO はムレミカヅキモの密度が高くなるにつれて低下したが、これはオオミジンコの生存や増殖に影響を与えるほどではなかった。また、水質測定とサンプリングは、全て DO が最も

低くなる暗期(明期に切り替わる 1-2 時間前)に行ったため、実験期間中に酸欠でオオミジンコの生存や増殖が影響されたということは考えにくい。オオミジンコ個体群については、すべての処理区において実験期間中に 2 世代目のオオミジンコによる産仔は認められなかったため、オオミジンコ密度は初期導入個体による再生産によってのみコントロールされていたと考えられる。

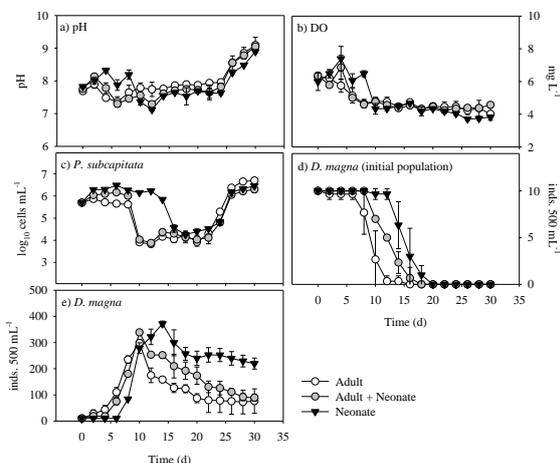


図 2. 実験期間中の水質と各生物密度の変化 (mean \pm SD)。

系の安定性の指標の 1 つである密度の最大振幅 ($\log_{10}(\text{max}/\text{min})$) は、ムレミカヅキモで「仔虫」の処理区で他の 2 つよりも低くなったが ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test), オオミジンコについては処理区間で有意な違いが認められなかった ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test; 図 3a, b)。最大振幅が大きいということは、確率論的に密度がゼロになるリスク(全滅のリスク)、もしくは餌の食いつくしによって消費者の個体群が崩壊するリスクが高くなることを意味する。変動係数(CV)についても同様に、全滅のリスクを示す指標となるが、ムレミカヅキモ密度については「成体」の処理区で高くなる傾向があった ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test; 図 3c, d)。試験期間中の最低密度はムレミカヅキモとオオミジンコのどちらにおいても「仔虫」の処理区で高くなった ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test; 図 3e, f)。これらの結果から、マイクロゾム試験系におけるオオミジンコ初期個体群は 1 齢仔虫のみによって構成されるものが望ましいと考えられる。

培地中の栄養資源が過剰に供給される環境下では、餌生物とその捕食者(植食者)の個体群振動が極端に大きくなり、どちらか一方、もしくは両者の絶滅が起こりやすくなる。この現象は paradox of enrichment と呼ばれ、室内での培養実験で頻繁に観察される。本研究で用いた COMBO 培地 ($P = 1.6 \text{ mg L}^{-1}$, $N = 14.0 \text{ mg L}^{-1}$) は一般的な湖水と比較して過剰に高い窒素とリンを含み、paradox of enrichment が起こりやすい実験環境と言える。本研究では、オオミジンコ初期個体群の年齢組

成に応じて系の安定性に大きな違いが生じたが、初期導入個体を1齢仔虫のみとすることで、系を1か月程度高いまま維持することが出来た。

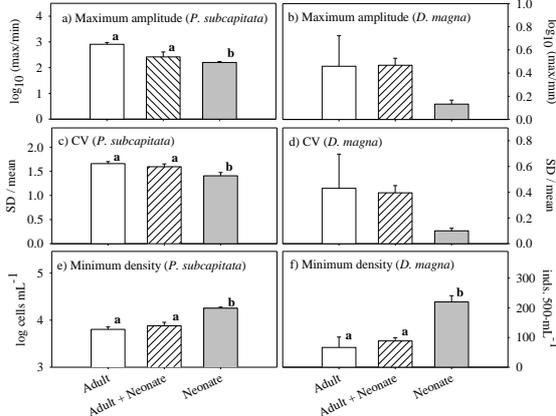


図 3. 系の安定性の指標値と、オオミジンコ初期導入個体群の例組成の関係。

(2) 農薬や重金属による各生物の生存、再生産、生物間相互作用への影響

① マイクロコズムを用いた殺虫剤、除草剤、重金属の影響評価

構築したマイクロコズムを用いて、殺虫剤(フェニトロチオン)、除草剤(シメトリン)、重金属(銀ナノコロイド)の影響を調べた。

フェニトロチオンの最高濃度は $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ (オオミジンコに対する 48-h EC_{50})、シメトリンの最高濃度は $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (ムレミカツキモに対する 72-h EC_{50}) と設定した。銀ナノコロイドについては $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (ムレミカツキモに対する 72-h EC_{50} やオオミジンコの内的自然増加率に対する EC_{50} と同程度) を最高濃度とした。試験期間は 30 日間(銀ナノコロイドは 14 日間)とし、ムレミカツキモとオオミジンコの密度、COMBO 培地の pH、溶存酸素濃度(DO)の経時変化を調べた。

本研究における群集レベルでのエンドポイントは多変量解析の 1 つである PRC (principal response curve) の canonical coefficient (ムレミカツキモとオオミジンコの個体群動態から計算) とし、ダネット検定によって対照区との違いをサンプリング日毎に調べた。

実験を行った結果、フェニトロチオンとシメトリンについては、最高濃度区でも有意な影響が検出されなかった(図 4)。これは、個体群動態に対する生物間相互作用と試験物質の毒性影響の強さが相対的に異なるためである。例えば、シメトリン曝露では $5 \mu\text{g L}^{-1}$ でムレミカツキモの増殖率が 1/2 になる。しかし、オオミジンコによる摂食効果は相対的に強く、数日で細胞密度が 1/10 以下になった。そのため、オオミジンコの存在下ではシメトリンの毒性による両者の個体群動態への影響が検出されにくくなったと考えられる。殺虫剤フェニトロチオンについても、同様の理

由で影響が検出されなかったと考えられる。

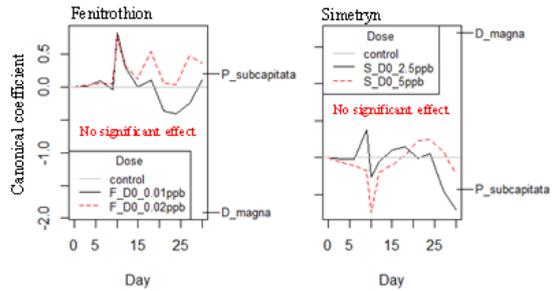


図 4. 群集構造の動態に対する殺虫剤(右)と除草剤(左)の影響。図の右軸は species score で、canonical coefficient (左軸) の変化に対する影響の寄与を表している。

銀ナノコロイドについては $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (ムレミカツキモへの 72-h EC_{10} やオオミジンコの内的自然増加率に対する EC_{10} と同程度) で有意な個体群動態への影響が検出された(図 5; day 4 と day 6 で有意な影響)。また、 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ の曝露区では day 8 と day 10 以外のすべてのサンプリング日で有意な影響が検出された。これは、銀ナノコロイドに対するムレミカツキモとオオミジンコの感受性が同程度で、両者が同じように直接的な毒性影響を受けたためだと考えられる。このように、化学物質の作用パターン(どの生物に強く作用するか)の違いによって、種レベルと群集レベルで結果が異なることがわかった。

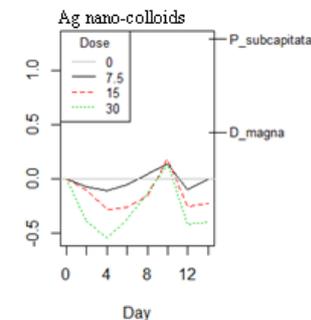


図 5. 群集構造の動態に対する銀ナノコロイドの影響。

② 餌閾値レベルに対する殺虫剤の影響

カブトミジンコおよびスカシタマミジンコを対象に、個体群の餌閾値レベル(内的自然増加率が 0 になるときの餌濃度)に対する殺虫剤の影響を調べた。その結果、カブトミジンコの餌閾値レベルは曝露区で有意に高くなったが、スカシタマミジンコでは影響がみられなかった。これは、殺虫剤に対する後者の感受性が低いためだと考えられる。このように、ミジンコ種を用いて生物群集や生態系への化学物質の影響を推定する際は、生物の性質も有用なエンドポイントとなることがわかった。

③ 水槽レベルマイクロコズムを用いた検証

20 L (2 栄養段階) 及び 300 L 容量 (3 栄養段階) の系を用意し、硝酸銀の影響を調べた。

20 L容量のマイクロコズム実験に用いた植物プランクトンは富山県南砺市の桜ヶ池から採集した群集である。植物プランクトン群集については、実験開始の8日前に採集し、屋外で全培養後、実験に用いた。動物プランクトンとしてはフラスコレベル試験系と同様にオオミジンコを用いた。

300 L容量の実験系では、植物プランクトン、動物プランクトンとも、桜ヶ池から採集した群集を全培養後に使用した。また、2次消費者として魚（モツゴ *Pseudorasbora parva*, 幼魚2個体）の在・不在の処理区を用意し、群集の食物連鎖長と硝酸銀の影響を調べた。

添加した硝酸銀の設定濃度は $8.0 \text{ Ag } \mu\text{g L}^{-1}$ であり、これはオオミジンコの内的自然増加率に対する EC_{50} に近い値である。フラスコレベル試験系と同様に生物群集への影響を多変量解析 (PRC) により調べた。

20 L (2 栄養段階) の実験系では、群集構造に対する硝酸銀の影響は実験初期でのみ検出され、その後は回復した (図 6 ; day 9 のみダネット検定で $p < 0.05$)。300 L (3 栄養段階) の系では、モツゴ、硝酸銀ともに有意な影響は検出されなかった (図 7)。

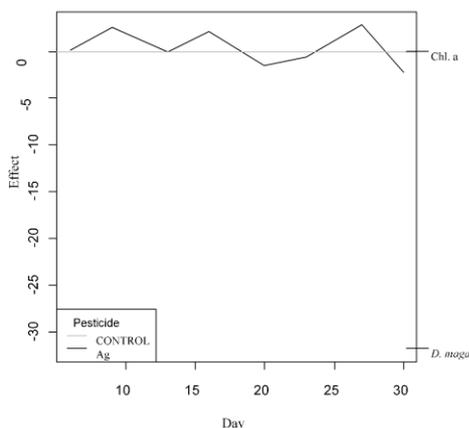


図 6. プランクトンの群集構造の動態に対する硝酸銀の影響 (20 L 容量での実験)。

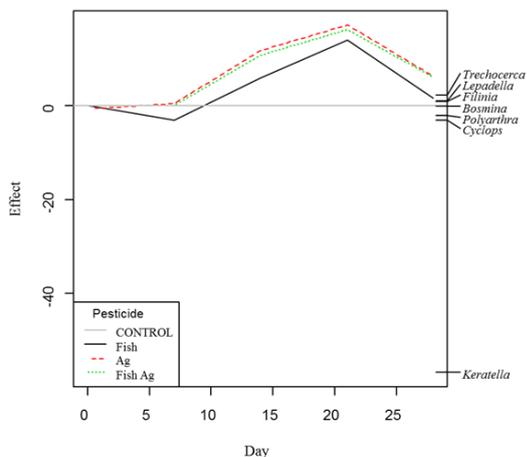


図 7. プランクトンの群集構造の動態に対する魚と硝酸銀の影響 (300 L 容量での実験)。

また、一般化線形モデル (GLM) を用いて各生物種に対する影響を調べたところ、20 L の系では硝酸銀によるオオミジンコの密度に対する負の影響が検出された。300 L の系ではワムシ類や枝角類に対して硝酸銀と魚類が正または負の影響を与えたことが分かった (表 1)。このように、群集レベル実験のエンドポイントとしては、群集構造よりも各構成種の動態に対する影響のほうが感度良く検出されることが分かった。

表 1. GLM によって推定された、各測定項目に対する硝酸銀、魚、日にちの効果 (300 L 容量の実験)。表中の青字は正の効果、赤字は負の効果を示す。

	Parameter coefficient in best model				AIC	
	Intercept	Ag	Fish	Day	Best	Full
WT	239.426	—	—	-6.937	242.1	245.25
pH	283.254	—	—	-7.219	46.232	50.06
DO	49.564	—	—	-8.395	251.83	255.64
Chl. a	14.782	—	—	-3.925	573.66	573.56
<i>Lepadella</i>	30.691	16.895	5.547	-19.99	—	1929.9
<i>Trehocerca</i>	0.399	-5.538	29.209	31.734	4041.2	4041.4
<i>Keratella</i>	206.29	-64.84	-27.73	46.98	—	18307
<i>Polyarthra</i>	69.89	12.41	16.95	-24.09	—	8181.3
<i>Filinia</i>	57.610	6.202	—	-17.092	4025	4026.2
<i>Cyclops</i>	15.922	-9.266	-21.604	26.820	—	744.36
<i>Bosmina</i>	-2.415	-3.403	-3.552	4.063	—	121.69

(3) 研究成果のまとめ

本研究では、ムレミカツキモとオオミジンコを構成種としたシンプルなマイクロコズムを構築した。構成種の個体群動態に対する化学物質の影響を調べることで、得られた結果は既存の種レベル試験結果 (個々の種の行動や成長、増殖への影響) と直接比較することが可能になる。化学物質曝露による群集レベルでのエンドポイントとしては、「群集構造」とすることで、既存の種レベル試験から得られる指標値 (EC_{50} や NOEC , HC_5 等) との比較が可能である。

ただし、前述のように、化学物質の作用パターン (どの生物に強く作用するか) の違いによって、種レベルと群集レベルで結果が大きく異なりうる。このような現象は水槽レベルでの実験においても確認された。また、ミジンコ種を用いて生物群集や生態系への化学物質の影響を推定する際は、生物の性質も有用なエンドポイントとなることがわかった。

本研究によって得られた成果のうち、マイクロコズムの構成や試験条件については、すでに論文として出版されている。その他の結果についても、現在論文執筆中または投稿中である。

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 8 件)

① Sakamoto M., Nagata T., Ha J.Y., Kimijima S., Hanazato T. and Chang K.H. (2015) Inducible

defenses as factor determining trophic pathways in a food web. *Hydrobiologia*, 743: 15-25.

査読有, DOI: 10.1007/s10750-014-1999-x

② Sakamoto M., Ha J.Y., Yoneshima S., Kataoka C, Tatsuta H., and Kashiwada S. (2015) Free silver ion as the main cause of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles to cladocerans. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 500-509.

査読有, DOI: 10.1007/s00244-014-0091-x

③ Mano H. and Tanaka Y. (2016) Mechanisms of compensatory dynamics in zooplankton and maintenance of food chain efficiency under toxicant stress. *Ecotoxicology*, 25: 399-411.

査読有, DOI: 10.1007/s10646-015-1598-2

④ Sakamoto M., Mano H., Hanazato T. and Chang K.H. (2016) Construction of a simple bi-trophic microcosm system using common species (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*) for testing chemical toxicities. *Korean Journal of Ecology and Environment*, 49: 228-235.

査読有, DOI: 10.11614/KSL.2016.49.3.228

⑤ Ha J.Y., Kamo M. and Sakamoto M. (2017) Acute toxicity of copper to *Daphnia galeata* under different magnesium and calcium conditions. *Limnology*, 18: 63-70.

査読有, DOI: 10.1007/s10201-016-0489-4

〔学会発表〕 (計 33 件)

① Ha J.Y., Mano H., Nagata T and Sakamoto M. Impacts of low-level pollution by pesticides on freshwater ecosystem structure. 16th International Symposium on River and Lake Environment, 2014 年 8 月 24-27 日 Chuncheon・韓国

②坂本正樹, 河鎮龍, 真野浩行, 永田貴丸. 実験系の違いによって異なる農薬の生態影響. 日本環境毒性学会, 2014 年 9 月 10-11 日, 富山県・富山市

③真野浩行, 坂本正樹, 岡本誠一郎. *Daphnia* 2 種に対する農薬の毒性影響. 日本環境毒性学会, 富山県・富山市 2014 年 9 月 10-11 日

④坂本正樹, 河鎮龍, 真野浩行, 永田貴丸. 低濃度の農薬による湖沼生態系の構造・機能への影響評価. 日本陸水学会, 2014 年 9 月 10-13 日, 茨城県・つくば市

⑤坂本正樹, 河鎮龍, 真野浩行, 片岡知里, 柏田祥策. 個体群・群集レベルでの生態毒性影響評価へ: 種レベル試験と結果を直接比較できることの重要性. 日本環境毒性学会, 2015 年 9 月 2-3 日, 東京都・文京区

⑥真野浩行, 坂本正樹, 岡本誠一郎. カブトミジンコの餌資源競争能力に対する殺虫剤の影響. 日本環境毒性学会, 2015 年 9 月 2-3 日, 東京都・文京区

⑦坂本正樹, 河鎮龍, 真野浩行, 片岡知里, 柏田祥策. 有害化学物質による湖沼生物群集への影響: 種・個体レベルから個体群・群集レベルへ. 日本陸水学会,

⑧真野浩行, 坂本正樹, 南山瑞彦. ミジンコ 2 種の餌資源競争能力に対する殺虫剤の影響. 日本環境毒性学会, 愛媛県・松山市 2016 年 9 月 6-7 日

⑨坂本正樹, 真野浩行, 河鎮龍, 花里孝幸. 化学物質の影響評価を目的とした新たなマイクロコスム実験系の開発. 日本陸水学会, 2016 年 11 月 3-6 日, 沖縄県・中頭郡西原町

⑩青山洗貴・真野浩行・坂本正樹. 淡水マイクロコスム実験系を用いた Ag の生態影響評価. 日本陸水学会甲信越支部会, 2016 年 11 月 26-27 日, 長野県・小諸市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/msslucky94/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 正樹 (SAKAMOTO, Masaki)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号: 20580070

(2)研究分担者

戸田 任重 (TODA, Hideshige)

信州大学・学術研究院理学系・教授

研究者番号: 60291382

花里 孝幸 (HANAZATO, Takayuki)

信州大学・学術研究院理学系・教授

研究者番号: 60142105

(平成 28 年度より連携研究者)

真野 浩行 (MANO Hiroyuki)

国立研究開発法人土木研究所・つくば中央研究所・研究員

研究者番号: 40462494