

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510031

研究課題名(和文) 低濃度の農薬による水圏生態系の機能への影響評価

研究課題名(英文) Impacts of low-level pollution by pesticides on freshwater ecosystem.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：「水圏生態系の構造と機能が、低濃度の農薬(殺菌剤、除草剤、殺虫剤)の曝露によってどのように変化するのか」を明らかにすることを目的として研究を行った。種レベルのバイオアッセイや模擬生態系を使った群集レベル実験の結果から、日本で生態系影響の評価基準として用いる予測無影響濃度や欧米で用いられるHC5よりも低い濃度であっても、各種農薬が生態系構造や機能に影響を及ぼすことが明らかになり、これらを指標とする影響評価の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Aquatic ecosystems have many real problems due to anthropogenic impacts. Chemical pollution by pesticides is one contributing factor to these problems. Population dynamics of the organisms are controlled by complex combinations of biotic interactions and abiotic environmental factors. Vulnerability to the pesticides differs between each species, so the chemicals not only affect the individual survival or the reproduction, but also disturb the prey-predator interactions at very low concentrations. Here, we have examined the impacts of low level exposure of three pesticides (insecticide, herbicide and bactericide) on freshwater ecosystem by conducting individual-, population- and community level experiments. Our results suggest that pesticides affect significantly on food web structure and ecosystem functions at lower concentrations than PNEC or HC5.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：分科：環境学 細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：農薬 水圏生態系 食物網構造 生態系機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 低濃度の化学物質による曝露評価

わが国では、有害化学物質の影響を評価する際、種レベルの生物試験で得られた毒性値を指標として PNEC (予測無影響濃度) を算出する(改正化審法: 2010年4月施行)。しかし、この方法では様々な種によって構成される生物群集への影響を評価することは困難である。欧州では、各生物種の感受性を統計学的に示し、「感受性分布」から、HC₅ (全体のうちの5%の種が影響を受ける濃度) を算出して生態系影響の基準値としている。今後、わが国においても同様の手法が取り入れられるだろう。しかし、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(種間競争、捕食-被食関係の攪乱やそれに伴う食物網構造の変化)・生態系機能へ与える影響を評価する必要がある。

(2) 作用機序の異なる農薬の影響

生態系全体に及ぼす化学物質の影響を評価するためには、「生食食物連鎖」と「微生物ループ」を考慮に入れた食物網を対象とする必要がある。さらに、代表者らの行った先行研究から、農薬による生物群集への影響はその作用機序の違いにより大きく異なることが示唆されている。例えば除草剤(光合成阻害)は植物プランクトンに強く作用し、殺虫剤(神経系阻害)は動物プランクトン(特にミジンコ)に強く作用する。殺菌剤(例えばSH酵素活性阻害)は真菌や細菌類に強く作用する。このように、作用機序の違いから、影響を強く受ける生物群の栄養段階が異なり、食物網の構造が変化すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、作用機序の異なる化学物質の曝露を受け、食物網内の物質・エネルギーの流れがどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、以下の4点を達成目標とした。

- ・作用機序の異なる化学物質の曝露を受け、系内の物質、エネルギーの流れがどのように変化するかを明らかにする。
- ・低濃度曝露による生物間相互作用の攪乱の影響を定量的に評価する。
- ・温度や光量などの変化に伴う群集の変動パターンに対する農薬の影響を明らかにする。
- ・生態系機能(一次生産量、食物網構造、高次消費者の成長量、プランクトンの季節的遷移)をエンドポイントとした新しい評価法の提言。

2. 研究の方法

本研究では、農耕地で使用される除草剤(シメトリン)、殺虫剤(メソミル、フェントロチオン)、殺菌剤(イプロベンフォス)を用い、微生物(バクテリア、原生動物)、生産者(植物プランクトン)、一次消費者(動物プランクトン)、高次消費者(モツゴ)から構成される生態系への影響を評価した。

3年の研究期間で、作用機序の異なる農薬による各生物の生存、再生産への影響、生物間相互作用への影響、食物網構造への影響を評価した。実験で得られた結果を基に、食物網構造に変化をもたらす化学物質の濃度と、既存の PNEC 値および HC₅ 値との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 各生物の生存、再生産への影響

ムレミカツキモ(緑藻)、ミジンコ3種(オオミジンコ、カプトミジンコ、ゾウミジンコ)、魚類2種(メダカ、モツゴ)について、殺虫剤(メソミル、フェントロチオン)、除草剤(シメトリン)、殺菌剤(イプロベンフォス)に対する感受性を調べた。図1は OECD テストガイドラインに準拠した藻類増殖阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験の結果を図示したものである。

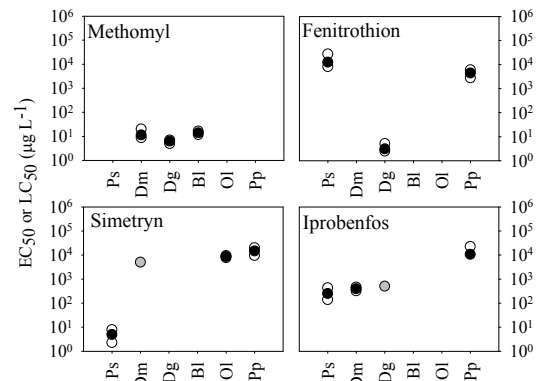


図1. 急性毒性試験の結果。横軸は試験生物名(Psはムレミカツキモ, Dmはオオミジンコ, Dgはカプトミジンコ, Blはゾウミジンコ, Oiはメダカ, Ppはモツゴ), 縦軸は半数影響濃度もしくは半数致死濃度(データの白丸は95%信頼区間, 灰色の丸はおおよその値, µg L⁻¹)である。これらの基礎データは他の実験における農薬濃度設定の目安とした。

各農薬に対する感受性は藻類(ムレミカツキモ)もしくはミジンコが最も高い感受性を示したため、ミジンコ繁殖試験によって再生産への影響を調べた(ムレミカツキモの増殖への影響は上記の試験)。産仔数に対する半数影響濃度(EC₅₀)を推定した結果、カプトミジンコとオオミジンコに対するシメトリンの EC₅₀ は 5622、8772 µg L⁻¹であった。イプロベンフォスの EC₅₀ はカプトミジンコが 164.9 µg L⁻¹、オオミジンコが 293.2 µg L⁻¹であった。さらに、各濃度区で内的自然増加率を求めた後に、化学物質の濃度と

内的自然増加率の関係について、べき関数による非線形回帰を行った。非線形回帰の結果から、個体群レベルの慢性影響の指標として内的自然増加率が0になる対象物質の濃度を推定した。その結果、カプトミジンコとオオミジンコの内的自然増加率が0となるイプロベンフォスの濃度は、 $310.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $944.6 \mu\text{g L}^{-1}$ であった。また、シメトリンの濃度はカプトミジンコが $5622 \mu\text{g L}^{-1}$ 、オオミジンコが $8772 \mu\text{g L}^{-1}$ であった。これらの結果から、イプロベンフォスはシメトリンに比べて、低濃度でミジンコ2種の繁殖や個体群成長に影響することが分かった。また、イプロベンフォスとシメトリンに対するカプトミジンコの繁殖や個体群成長の感受性はオオミジンコよりも高いことが分かった。

(2) 生物間相互作用への影響

藻類 - ミジンコ間相互作用への影響

結果の再現性が高く、取り扱いが容易で、さらに現行の種レベル毒性試験の結果と直接比較できるようにするため、ムレミカツキモとオオミジンコを構成員としたシンプルなマイクロコズム(1-L 容量)を構築した。これにより、藻類(生産者)とミジンコ(一次消費者)間の相互作用に及ぼす農薬の影響を調べた。曝露した除草剤(シメトリン)、殺虫剤(フェントロチオン)、殺菌剤(イプロベンフォス)の濃度は、ムレミカツキモの72-h EC_{50} とオオミジンコの48-h EC_{50} のうち低い方の値を基準とし、その値の2分の1倍、1倍、2倍と設定した。図2は各処理区における水質の変化を表している。

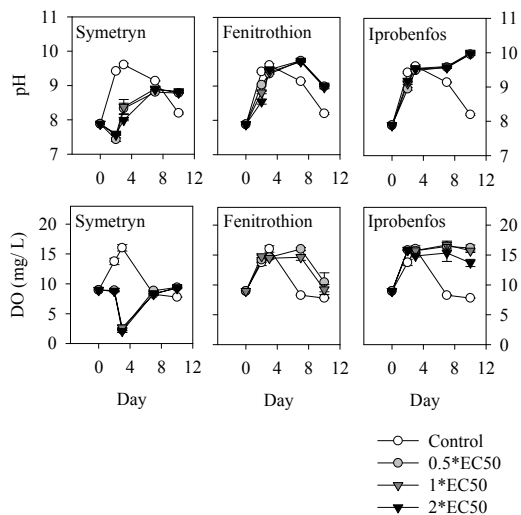


図2. 各処理区における水質の変化。

シメトリン処理区でpHが低下したが、これはムレミカツキモの光合成活性に影響を与えたためである。また、その時にDO(溶存酸素濃度)が著しく低下した。反対に、フェントロチオンとイプロベンフォスを投与した処理区では、pHとDOの上昇がみられた。これは、オオミジンコが直接の毒性影響を受けたため、ムレミカツキモへの摂食圧が低下し、ムレミカツキモの細胞密度が著しく上昇

したことが原因と解釈できる(図3)。

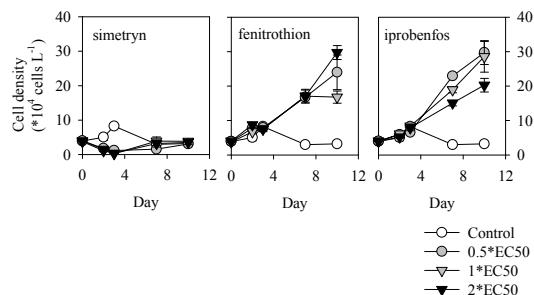


図3. 各処理区におけるムレミカツキモの細胞密度の変化。

これらの結果から、直接藻類の増殖に影響を与えない濃度での曝露(フェントロチオンの曝露濃度は最高でもムレミカツキモの増殖に対する EC_{50} の50万分の1程度)であっても、捕食-被食関係の攪乱を介して間接的に影響を及ぼすことが明らかになった。オオミジンコの個体数の変化を図4に示す。

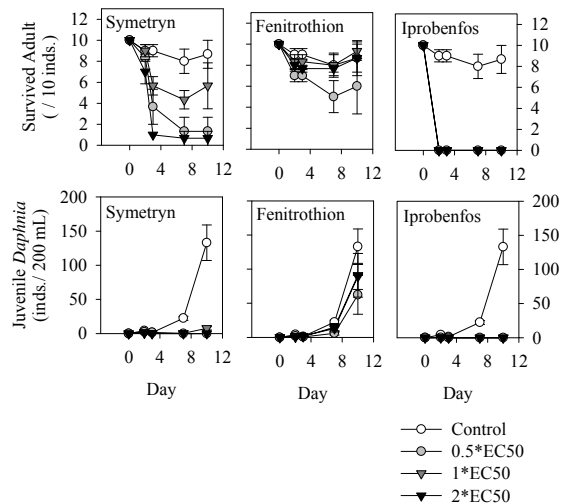


図4. 各処理区におけるオオミジンコの動態。実験開始時に投入した成体10個体の生存数(上)と生まれた仔虫の数(下)。

シメトリン処理区では、成体の生存数が大きく低下した。ただし、シメトリン濃度は最高でもオオミジンコの48-h EC_{50} の500分の1以下であったことから、死亡の直接的原因はDOの急激な低下(図2)であると考えられる。これは、既存の毒性試験では検出できない農薬の間接影響の一例である。フェントロチオン曝露によるオオミジンコへの影響は、重みづけ平均値(time weighted average)を用いて多重比較(ホルムの方法)を行った結果、有意ではなかった。一方、イプロベンフォスは非常に強い作用を示した。

このように、各生物種を単独で曝露する毒性試験と単純なマイクロコズムでさえ、全く異なる結果が得られることがわかった。野外群集内には多種多様な生物が存在するため、今後は本実験と異なる生物種や農薬種を使

用した場合にどのような結果が得られるのかを検証する必要がある。

ミジンコ 魚類間の相互作用への影響
 魚の餌選択性に及ぼす農薬の影響を評価するため、モツゴ幼魚（体長 24.9 ± 1.6 mm）と動物プランクトンを用いて4時間の捕食実験を行った。動物プランクトンは実験の1日前に琵琶湖南湖で採取したものである。ビーカーに動物プランクトンを含む湖水をそれぞれ 1L ずつ入れ、各農薬を添加した（対照区、シメトリン $8.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 、フェニトロチオン $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ もしくはイプロベンフォス $8.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ）。設定濃度は米国環境保護庁の Ecotox データベースをもとに算出した HC_5 （全体の5%の種が影響を受ける濃度）もしくは環境省の報告書に記載されている PNEC（予測無影響濃度）である。実験に使用した湖水では、カプトミジンコが動物プランクトン総数の9割以上を占めていた。実験終了時のビーカー内のカプトミジンコの個体数とモツゴ消化管内の個体数を処理区間で比較した結果、有意な違いはみられなかった（クラスカル・ウォリス検定）（図5）。低濃度の農薬に曝されると、動物プランクトンは遊泳パターンが変化し、魚に見つかりやすくなることが知られているが、 HC_5 や PNEC での曝露条件では、モツゴの餌選択性に影響を与えないことがわかった。

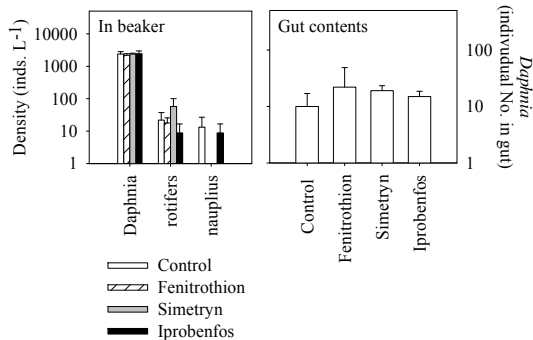


図5. 農薬によるモツゴの餌選択性への影響。左図は実験終了時におけるビーカー内の各生物の個体数。右図はモツゴの消化管内に観察されたカプトミジンコの個体数。

(3) 食物網構造への影響

メソコズム実験（300-L 容量：細菌などの微生物、動・植物プランクトン、魚から構成される食物網）により、低濃度の各種農薬の影響を評価した。高次消費者（モツゴ）を含めたメソコズム実験は2012年6月から8月にかけての42日間行った。桜ヶ池（富山県南砺市）で採取した動物プランクトン、植物プランクトン、その他の微生物（細菌類や原生動物）を十分に増やした後、これらを実験用水槽に混ぜ入れ、モツゴ稚魚3個体を入れたものをメソコズムとした。各農薬（対照区、シメトリン $8.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 、フェニトロチオン $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ もしくはイプロベンフォス $8.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ）

を添加した（各農薬の濃度は HC_5 もしくは PNEC）。

実験期間中、水温、pH、DO に処理区間で有意な違いはみられなかったが、Chl. a 濃度（植物プランクトンの現存量の指標）がフェニトロチオン処理区で有意に高くなった（repeated measures ANOVA）（図6）。これは、殺虫剤によって動物プランクトンが影響を受け、摂食量が低下したことが原因と考えられる。

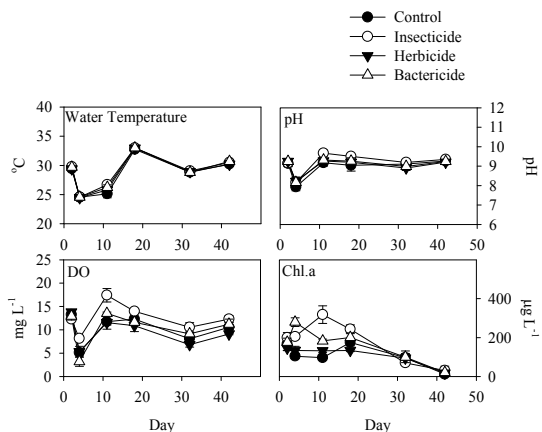


図6. 実験期間中の水質の変化。

モツゴの体成長に明らかな違いは見られなかったが、その餌生物である動物プランクトンについては、処理区間で明らかな密度の違いがみられた（図7）。

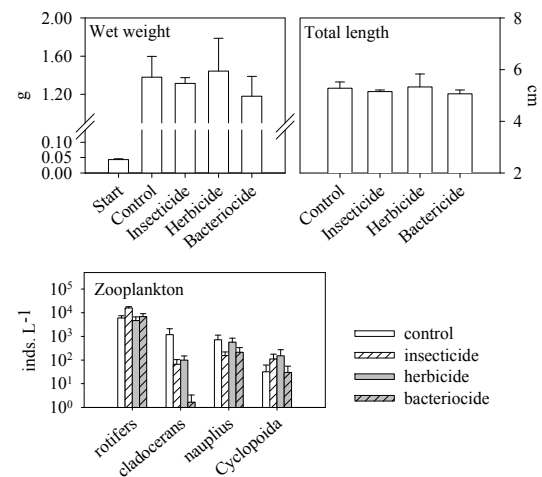


図7. 実験終了時のモツゴの湿重量（左上）と全長（右上）および動物プランクトンの密度（下）。

多変量解析手法の一つである Principal Response Curve (PRC) を用いて動物プランクトン群集構造を比較した結果、農薬種によって影響のパターンが異なることがわかった（図8）。殺虫剤（フェニトロチオン）による影響のパターンは除草剤（シメトリン）や殺菌剤（イプロベンフォス）と異なった。また、フェニトロチオン、シメトリン処理区では、実験終了時には群集構造が回復傾向にあったが、イプロベンフォス処理区では回復が見

られなかった。

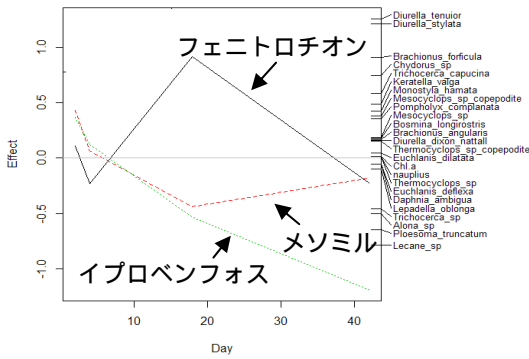


図 8. プランクトン群集構造の時間変化. 左の縦軸は canonical coefficient の値 (影響の程度) で, 対照区 (=0) との違いを表している. 右の縦軸は species score で各生物種の canonical coefficient への寄与を表している.

さらに, 食物網構造への影響を明らかにするために炭素, 窒素安定同位体比を行った結果, 処理区間で各生物の特に炭素安定同位体比が異なっていた (図 9).

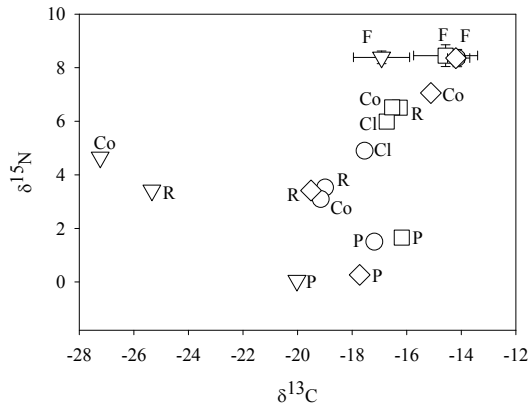


図 9. 炭素, 窒素安定同位体比の分析結果. $\delta^{13}\text{C}$ は餌資源の指標, $\delta^{15}\text{N}$ は栄養段階の指標として用いられる. プロットは \circ が対照区, \bullet がフェニトロチオン, \square がシメトリン, \blacksquare がイプロベンフォス処理区. 各プロット横のアルファベットは生物分類群で, P は植物プランクトン, R はワムシ類, Cl はミジンコ類, Co は捕食性カイアシ類, F はモツゴ.

特にフェニトロチオン処理区 (図 9 の \bullet) で各生物の $\delta^{13}\text{C}$ が低くなる傾向が見られた. これは, 植物プランクトン種組成と消費者の餌選択が変化したことを示唆する. モツゴの窒素安定同位体比と体成長に対しては農薬の影響が見られなかったが, 炭素安定同位体比が異なっていたことから, プランクトン群集構造の変化に応じて利用する資源の改変があったと推察される.

これらの結果から, 一般的な評価法でリスクが無いと判断される濃度 (HC_5 や PNEC) の農薬であっても, 生物群集に及ぼす影響は大きいことがわかった. また, 作用機序の違いによってその影響は異なっていた.

(4) 既存の評価基準との比較

本研究では, 種レベルのバイオアッセイから群集レベル実験まで, 網羅的に実験的解析を行った. その結果, 「種レベル (単一種) 試験と 2 種以上 (2 栄養段階以上) の実験結果が全く異なることもある」ということが明らかになった. そのため, 種レベル試験の結果から算出される PNEC や HC_5 が十分に生態系への影響を評価できているのかという疑問が生じる.

種レベルから群集レベルまで共通して用いたフェニトロチオン (殺虫剤) とシメトリン (除草剤) について, 文献値 (米国環境保護庁 Ecotox database) から算出した HC_5 はそれぞれ, $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ と $8.2 \mu\text{g L}^{-1}$ だった. イプロベンフォス (殺菌剤) については研究例が少なく, 妥当な HC_5 を算出できなかったため, 環境省が報告している PNEC ($8.6 \mu\text{g L}^{-1}$) を基準とした.

メソコズム実験とモツゴ (特に感受性が低い魚類ではない) の餌選択性実験の結果から, 一般的な淡水魚の体成長と餌選択性に対してはこれらの濃度でも影響が見られなかった. しかし, 動物プランクトンや植物プランクトンの密度や群集構造には明らかな影響が確認された. さらに, 群集構造の経時変化のパターンは農薬の種類によって異なっていた. フェニトロチオンとメソミルの処理区では, 最終的にプランクトン群集構造は対照区と同様の構造に収束 (回復) したが, イプロベンフォス処理区ではそれが見られなかった. モツゴの成長に影響が確認できなかった原因の一つとして, 餌生物の量や質の変化に対応した餌選択の変化があったと考えられる. 炭素, 窒素安定同位体比解析の結果からも, 食物網構造の変化が認められた.

また, 小規模のマイクロコズム実験では, シメトリン濃度が HC_5 の 3 分の 1 以下 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) で, DO の著しい低下が起こり, それが原因でミジンコの死亡につながった. この現象は大規模の実験系 (メソコズム) では起こらなかったが, 種レベル試験では検出できない農薬の間接的な影響の一例である. マイクロコズム実験におけるフェニトロチオンの最高濃度は $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ で, HC_5 のおよそ 4 分の 1 であったが, 捕食者 被食者間の相互作用に影響を与え, 藻類の密度が大きく上昇した. 藻類の密度上昇はイプロベンフォス処理区でも観察された. ただし, 設定したイプロベンフォスの濃度は $125\text{--}500 \mu\text{g L}^{-1}$ で, HC_5 よりも高かった.

このように, 研究対象とした農薬種に関しては HC_5 や PNEC の曝露濃度であっても十分に水圏生態系の構造や機能に影響を及ぼしうることが明らかになった. 本研究により, 群集レベル実験で得られる「群集構造の変化」や「炭素, 窒素安定同位体比の変化」に影響を及ぼす農薬の濃度は, 既存の指標値 (HC_5 や PNEC) よりも低いことが示された. ただし, これらをエンドポイントとして基準

値を策定するためには、実験データの蓄積が必要である。

上記の研究結果は国内外の学会で発表済みであり、論文を投稿準備中である。また、研究成果報告書には主要な研究結果のみを記載したが、その他に20-L規模でのマイクロコズム実験、動物プランクトンの競争実験等を行い、これらは学術誌に掲載されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) 坂本正樹, 河鎮龍 (2013) 食物網を考慮したリスク評価. 環境毒性学会誌, 16: 49-57. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jset>

(2) Mano H. and Sakamoto M. (2013) Competitor density and food concentration: an empirical approach to elucidate the mechanism of seasonal succession of two coexisting *Bosmina*. Journal of Ecology and Environment, 36: 267-271. DOI: 10.2131/jts.38.131

(3) Sakamoto M. and Tanaka Y. (2013) Different tolerance of zooplankton communities to insecticide application depending on the species composition. Journal of Ecology and Environment, 36: 141-150. DOI: 10.2131/jts.38.131

(4) Ikenaka Y., Sakamoto M., Nagata T., Takahashi H., Miyabara Y., Hanazato T., Ishizuka M., Isobe T., Kim J.W., Chang K.H. (2013) Effects of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on an aquatic ecosystem: acute toxicity and community-level toxic impact tests of benzo[a]pyren using lake zooplankton. The Journal of Toxicological Science, 38: 131-136. DOI: 10.2131/jts.38.131

(5) Matsuzaki S.S., Sakamoto M., Kawabe K. and Takamura N. (2012) A laboratory study of the effects of shelter availability and invasive crayfish on the growth performance of native stream fish. Freshwater Biology. 57: 874-882. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2012.02743.x

〔学会発表〕(計20件)

(1) 真野浩行, 坂本正樹, 永田貴丸. 農薬による *Daphnia* 2種への慢性影響. 日本生態学会, 広島国際会議場 2014年3月14日~18日.

(2) 坂本正樹, 永田貴丸, 真野浩行. 低濃度の農薬による食物網構造への影響. 日本陸水学会 龍谷大学 2013年9月10日~13日.

(3) 坂本正樹, 米島伸, Ha Jin-Yong. 食物網を考慮したリスク評価. 日本環境毒性学会, 東洋大学 2013年9月7日~8日.

(4) Sakamoto M. Impacts of anthropogenic chemicals on inherent and inducible anti-predator defenses in zooplankton. International Symposium on water quality and human health: challenges ahead. University of Peradeniya, Sri Lanka 2013年3月15日~16日.

(5) Mano H., Tanaka Y. Variation in tolerance to pesticides among *Daphnia galeata* clones in Lake Kasumigaura. The 5th International Congress of East Asian Federation of Ecological Societies. 龍谷大学 2012年3月17日~21日.

〔図書〕(計1件)

坂本正樹. 共立出版. 日本生態学会(編) 吉田丈人, 鏡味麻衣子, 加藤元海(担当編集員). 淡水生態学のフロンティア・シリーズ現代の生態学9巻(第3章) 2013年, 269pp(23p-34p).

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

代表者の研究室ホームページ. 研究課題名や業績等を記載.

<https://sites.google.com/site/mslucky94/>

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

永田 貴丸 (NAGATA Takamaru)

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・研究員

研究者番号: 50454624

真野 浩行 (MANO Hiroyuki)

独立行政法人土木研究所・研究員

研究者番号: 40462494