

幼若ホルモン様農薬のミジンコ類に対する影響調査（2）

伊藤和男^{*1}、村岡美和^{*1}、清水謙一^{*2}、佐々木隆^{*2}、高橋基子^{*22}、永吉秀光^{*2}

Kazuo ITOU, Miwa MURAOKA, Kenichi SHIMIZU, Takashi SASAKI, Motoko TAKAHASHI,
Hidemitsu NAGAYOSHI
(平成 19 年度実績)

要 約

前年度に引き続き、OECD テストガイドライン 211 (TG211) の改訂案について、その試験法の問題点等検証を行った。幼若ホルモン様作用を示さない農薬数種を供試物質としてオオミジンコ繁殖試験を行った結果、一部に産仔数減少の症状は認められたものの濃度相関のあるものではなかった。さらに、同条件での産仔に雄は全く含まれなかった。また、幼若ホルモン様農薬を作用させ、雄が発生するようになった個体から産仔を採取し、その産仔を農薬暴露のない環境で飼育した結果、次世代の累積産仔数は低下する傾向が認められたが、産仔に雄は含まれなかった。一方、ミナミヌマエビを供試した結果、産仔数については処理区において減少が認められたが雌雄比については違いが認められなかった。

はじめに

前年の通り、オオミジンコの繁殖性試験 (TG211 : *Daphnia magna* Reproduction Test) の改訂作業が進行中である。前年度調査の結果、幼若ホルモン様農薬を作用させると、累積産仔数および産仔の雌雄比が暴露濃度に応じて変動するが、その両作用の半数影響濃度は比較的近いものであることがわかっている。また、供試農薬の暴露を止めるとその影響が回復することが確認され、さらに、供試するオオミジンコの系統によってその感受性に違いがある可能性も示されている。このため、今年度は他の農薬の作用性と、幼若ホルモン様農薬の作用における回復性、そして他生物種における作用について調査を進めた。

調査研究方法

1. 雄化と他の毒性エンドポイントとの関係把握

幼若ホルモン様作用を示さないとされる農薬として4種（ホスチアゼート、ベンチオ

*1 (独) 農林水産消費安全技術センター農薬検査部検査技術研究課

*2 (独) 農林水産消費安全技術センター農薬検査部有用生物安全検査課

カーブ、ペルメトリン、TPN)を選定し、21日間のオオミジンコ繁殖試験を実施した。暴露濃度は、各供試農薬の急性遊泳阻害試験の半数影響濃度付近を最高濃度とし、その1/10濃度および1/100濃度を設定した。

試験条件

①暴露条件：試験液は通気を行わず、週2回全液を交換する半止水式で行った。試験区は助剤対照区および薬剤処理区(3濃度)の計4区を設定し、各区は生後24時間以内のオオミジンコ5匹を供試した。供試農薬は適当量をジメチルホルムアミドに溶解して調製し、最終濃度が以下の濃度となるよう、試験開始時および換水時に試験液に添加した。試験液に添加する薬液容量は10 μ l/100 mlとした。

ホスチアゼート：2, 20, 200 μ g/L (ppb)、ベンチオカーブ：10, 100, 1000 μ g/L (ppb)

ペルメトリン：0.025, 0.25, 2.5 μ g/L (ppb)、TPN：1, 10, 100 μ g/L (ppb)

②環境条件：オオミジンコは各個体をそれぞれ100 mlの人工調製水(Elendt-M4培地をあらかじめ通気したもの)を入れたビーカーに収容した。ビーカーは20 $^{\circ}$ Cのインキュベーターにセットして温度を一定に管理した。照明は16時間明、8時間暗条件とした。給餌は1日1回、クロレラ懸濁液を0.2 mg 炭素/匹となるよう与えた。

③観察および測定：試験は21日間行った。毎日、供試した各ミジンコの生死、脱皮の有無、耐久卵の有無、産仔のある場合にはその生存産仔数、雌雄別の数、死虫数等観察した。なお、今回水中濃度の測定は行わず、結果は設定濃度に基づくものとした。

2. 被験物質を除去した後の回復性に係る調査

幼若ホルモン様農薬(ピリプロキシフェン)200 ng/Lをオオミジンコに暴露させて21日間観察した。この観察中に、十分量の雄仔虫と雌仔虫が得られるタイミングで産仔をブールし、農薬暴露のない環境にて雌仔虫を引き続き21日間飼育して各個体からの産仔数、産仔の雌雄比等を観察した。また、一部の雌仔虫には同条件で得られた雄仔虫も共存させ、交尾行動および耐久卵の発生等を観察した。

3. 他生物種での雄化作用の解明

淡水エビであるミナミヌマエビを供試生物とし、幼若ホルモン様農薬(ピリプロキシフェン)に雌雄の親エビを抱卵時まで暴露させ、産仔数および雌雄を観察した。農薬暴露濃度は急性毒性半数致死量(LC50)の1/20濃度および1/100濃度とした。雌雄の判定は、孵化1~1.5ヶ月後に、背面の卵巣の有無を観察することで行った。

試験条件

①暴露条件：試験液は1時間あたり6Lが交換される流水式で行った。ピリプロキシフェンは事前に試験を行った急性毒性試験結果に基づき、そのLC50値の1/100濃度および1/20濃度である2および10 μ g/Lになるよう、試験系に連続的に滴下した。なお、試験液中のピリプロキシフェン濃度を測定した結果、設定濃度の80%以上を維持していることを確認した。供試生物数は雌雄各10匹/区とし、親エビの暴露期間はおよそ20日間であるが、抱卵時期により適宜延長した。

②環境条件：試験液は脱塩素水道水を使用し、水温は22 $^{\circ}$ Cとした。照明は16時間明、8時間暗条件とした。

③観察条件：暴露後の親エビは各区5匹を個別の水槽に移し、孵化後成熟するまで飼育した。雌雄の判定は、孵化1～1.5ヶ月後に、背面の卵巣の有無を観察することで行った。

結果及び考察

ホスチアゼート、ベンチオカーブ、ペルメトリン、TPNを供試した結果、産仔数については対照区との有意差が認められる投与群があるものの、明確な濃度相関のある産仔数減少は認められなかった。また、同条件での産仔中に雄ミジンコは認められず、今回供試した農薬の化学物質としてのストレスは雌雄比変動には結びつかないことが示唆された。(表1)

オオミジンコ幼体を供試生物とし、ピリプロキシフェン 200ppt を投与すると産仔数が有意な減少、雄発生率が45%となった。これは前年度実施のリングテストの結果とほぼ等しかった。今回供試したオオミジンコは5日令を使用しており、通常1日令を使用するTG211と異なる試験であったが感受性に大きな違いはないものと思われた。(表2-1)

上記条件から発生した雌仔虫をピリプロキシフェンの含まれない培地中に移し、試験を継続した結果、ピリプロキシフェン暴露個体から発生した雌は、その産仔数に有意な減少が認められた。ただし、今回の雌仔虫は厳密には親の育包内で短期間ピリプロキシフェンの暴露があるため、この影響を排除するような更なる調査が必要と思われる。一方、同条件での産仔中に雄は認められず、雌雄決定プロセスが次世代には引き継がれないことが示された。(表2-2)

さらに、第1世代で発生した雌雄仔虫を共存させた結果、共存群はその産仔数が減少する傾向が示されたが、これが雄の存在によるものか生育環境の違い(餌量等)に由来するものなのかはさらなる調査が必要である。ただしいずれの群からも交尾行動や耐久卵の発生は認められなかった。(表2-3)

ミナミヌマエビを供試した結果、暴露開始1日から10日間で約半数の抱卵エビが得られ、20日間では最大70%(7匹)の抱卵であった。産仔数は、対照区、助剤対照区の平均35匹に対して、2µg/Lは31匹、10µg/Lは17匹で暴露区の方が少ない結果となった。一方、雌雄を判別した結果、対照区及び助剤対照区は59.7及び56.9%、2µg/L区は61.8%、10µg/L区は52.0%が雄で、ピリプロキシフェンの暴露の有無による雌雄の割合に違いは認められなかった。(表3)

表1：各種農薬を供試したオオミジンコ繁殖試験結果

表1-1

試験1	対照区	ホスチアゼート投与区			ベンチカーブ投与区		
		2ppb	20ppb	200ppb	10ppb	100ppb	1000ppb
21日間 生存親数	5	5	5	3	5	5	0
累積産仔数 平均値	252	227	243	205	233	206	—
CV	6%	6%	4%	7%	8%	7%	—
5%有意差	—	有		有	有		
♂発生率	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—

表1-2

試験2	対照区	ヘルマトリン投与区			TPN投与区		
		0.025ppb	0.25ppb	2.5ppb	1ppb	10ppb	100ppb
21日間 生存親数	4	5	1	0	4	5	3
累積産仔数 平均値	196	161	195	—	214	216	157
CV	27%	43%	—	—	31%	33%	51%
5%有意差	—						
♂発生率	0%	0%	0%	—	0%	0%	0%

表2：オオミジンコの2世代影響結果

表2-1

第1世代	対照区	ピリプロキシフェン
		200ppt
21日間 生存親数	10	10
累積産仔数 平均値	196	152
CV	15%	24%
5%有意差	—	有
♂発生率	0%	45%

表2-2

第2世代 (薬剤なし)	対照区 産仔♀	ピリプロキシフェン 産仔♀
21日間 生存親数	9	10
累積産仔数 平均値	279	206
CV	13%	20%
5%有意差	—	有
♂発生率	0%	0%

表2-3

♂+ 対照区産仔♀	♂+ ピリプロ産仔♀
9	10
212	166
20%	10%
—	有
0%	0%

表3：ミナミヌマエビの繁殖試験結果

群		個体番号					平均
		1	2	3	4	5	
対照区	雌雄数(匹)	35	30	25	35	46	34.2
	雄%	51.4	53.3	32.0	34.3	30.4	40.3
助剤対照区	雌雄数(匹)	42	43	51	13	27	35.2
	雄%	42.9	34.9	54.9	38.5	44.4	43.1
2 μ g/L区	雌雄数(匹)	7	35	35	37	41	31.0
	雄%	57.1	31.4	34.3	21.6	46.3	38.1
10 μ g/L区	雌雄数(匹)	※	30	18	21	13	20.5
	雄%	—	36.7	44.4	57.1	53.8	48.0

※1匹の産仔を確認したが、その後死亡