

幼若ホルモン様農薬のミジンコ類に対する影響調査（3）

伊藤和男^{*1}、村岡美和^{*1}、清水謙一^{*2}、清野義人^{*2}、佃 美和^{*22}、永吉秀光^{*2}

Kazuo ITOU, Miwa MURAOKA, Kenichi SHIMIZU, Yoshito SEINO, Miwa TSUKUDA,
Hidemitsu NAGAYOSHI

（平成 20 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。昆虫成長制御剤 (IGR 剤) であるテフルベンズロンを供試してオオミジンコ繁殖試験を実施した結果、産仔に雄は含まれず、ピリプロキシフェンの暴露による影響とは異なる結果となった。また、塩化ナトリウムを供試して繁殖試験を実施した結果、産仔に雄は含まれなかった。これらの結果は、ピリプロキシフェンの暴露に伴って産仔に雄が含まれるという現象は、特異性が高いものであることを示している。

はじめに

農薬の生態毒性を把握するための各種試験は OECD によりテストガイドライン化されており、オオミジンコの繁殖性を観察するための試験 (TG211: *Daphnia magna* Reproduction Test) は 1998 年に現在の形に制定されている。我が国の環境省より、この試験法に幼若ホルモン様作用を検出するための観察事項の追加を主体とする改訂案が提出されたため、問題点等の検証を行ってきたところである。前年度、幼若ホルモン様作用を示さない農薬数種を供試してオオミジンコ繁殖試験を行ったところ、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く、また、産仔に雄は全く含まれなかった。一方、幼若ホルモン様農薬であるピリプロキシフェンを作用させ、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、次世代の産仔総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。更に、ミナミヌマエビを供試し幼若ホルモン様農薬の影響を調べた結果、産仔数につ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。

今年度は他の農薬の作用性と、その回復性等、調査を進めた。また、平成 18 年度に参加したリングテスト (室間変動調査) において、陽性対象のピリプロキシフェンの試験液中濃度測定で分析の繰り返し精度など課題が残ったため、新たに分析法の確立を行った。

*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

調査研究方法

1. 供試農薬の水中濃度測定方法の確立

ピリプロキシフェンを供試したミジンコ繁殖試験において、試験液中の濃度測定を HPLC-MS/MS を用いて行った。

(水中濃度測定方法)

前処理：試験溶液 100ml をけい藻土カラムに添加し、酢酸エチル 50ml で溶出した後、酢酸エチルを脱水、留去して残留物をアセトニトリル 1ml に溶解、フィルターろ過後、下記条件の HPLC-MS/MS で分析した。

HPLC-MS/MS 条件：移動相 アセトニトリル/水 (9/1)、カラム AtlantisC18 150mm × 2.1mm、カラム温度 40 °C、移動層流速 0.1ml/min、試料注入量 10 μl、イオン化 ESI(+)、キャピラリー電圧 3.7kV、コーン電圧 25V、MRM 条件 322.0 → 185.1 (m/z)、コリジョン電圧 30V

2. 雄化と他の毒性エンドポイントとの関係把握

ピリプロキシフェンとは作用機作の異なる IGR 剤としてテフルベンズロンを供試し、2つのエンドポイント（産仔数変動、雌雄比変動）の関係を把握するためのオオミジンコ繁殖試験を行った。また、化学物質によるストレスの一例として、塩化ナトリウムを供試した繁殖試験も実施し、エンドポイントの調査を行った。

(テフルベンズロン供試繁殖試験：暴露濃度 10 ~ 800 ng/l で 5 濃度区、各区 10 匹)

(塩化ナトリウム供試繁殖試験：暴露濃度 0.05 ~ 0.5% で 5 濃度区、各区 10 匹)

3. 被験物質を除去した後の回復性に係る調査

テフルベンズロンを供試した繁殖試験で影響の認められた個体を M4 水に戻して飼育を継続し、回復性を調査した。

結果及び考察

1. 供試農薬の水中濃度測定方法の確立

HPLC-MS/MS を使用することで 25ng/l 以下の微量なピリプロキシフェンを検出することが可能になったものの、この濃度付近での検量線および分析の繰り返し精度については十分な精度が得られなかった。なお、換水直後および 2 日経過後の試験液の濃度分析を実施した結果、最高濃度区 (T5) でも残存率が 10% 前後となっており、ピリプロキシフェンが試験液中で速やかに減衰していることが示された。(表 1)

2. 雄化と他の毒性エンドポイントとの関係把握

テフルベンズロンを供試したオオミジンコ繁殖試験の結果、親の死亡が起こる程度の高濃度区 (T4、T5) では産仔が全く無いが、それ以下の濃度区では濃度依存の産仔数減少は認められず、いずれの濃度区でも雄の発生は認められなかった。(表 2)

塩化ナトリウムを供試した試験では、産仔数減少が認められる濃度区でも雄発生は認められなかった。(表 3)

ピリプロキシフェンと作用機作の異なる2被験物質は、半数致死濃度と半数影響濃度が近いことが推測される。親の死亡が起こらない濃度範囲で産仔数の減少が起こり、且つ雄の発生が認められるピリプロキシフェンとは異なる結果となった。

また、テフルベンズロンでは産仔数の減少が認められない濃度区（T1～T3）でも、高濃度のT3区では産仔の一部で外殻に奇形が認められ、この点についても、産仔個体が雌雄ともに健常であるピリプロキシフェンとは異なる結果となった。

3. 被験物質を除去した後の回復性に係る調査

テフルベンズロンを供試した試験で産仔が出なくなった個体をM4水に戻して試験を継続した結果、産仔数に回復は認められず、不可逆的な毒性影響であることが示唆された。ピリプロキシフェンではM4水に戻して1週間から2週間で産仔数、雌雄比共に回復性が認められており、回復性についても異なる結果となった。

（3カ年総括）

オオミジンコ繁殖試験に雌雄の観察という項目を加え、雌雄比というエンドポイントを設定することは、幼若ホルモン様農薬の特異的な検出に利用出来る可能性が示唆された。しかしながら、その知見を環境影響への評価に利用することについては他生物種で同一の結果が得られない等の問題点が多く、十分な知見の蓄積が必要と思われる。

表1：ピリプロキシフェン濃度測定

処理区(設定濃度)	試験水中濃度の経時変化 (2日後溶液/灌水日溶液)(残存率)		
	繰り返し分析①	繰り返し分析②	平均
T1 (25ppt)	2.3%	0.4%	1.4%
T2 (74ppt)	0.1%	1.8%	1.0%
T3 (220ppt)	1.0%	0.8%	0.9%
T4 (640ppt)	2.1%	9.0%	5.5%
T5 (2000ppt)	9.0%	17.0%	13.0%

表 2 : テフルヘンズロン供試材ミジンコ繁殖試験

試験区	テフルヘンズロン濃度(ppt)	期間中生存親数	産仔数平均値	産仔数CV%	産仔中♂数
Cont	—	10	187.8	28%	0
S-Cont	—	10	207.3	14%	0
T-1	10	10	221.5	8%	0
T-2	30	9	186.2	18%	0
T-3	90	10	209.1	13%	0
T-4	270	2	0.0	—	0
T-5	800	0	—	—	—

表 3 : 塩化ナトリウム供試材ミジンコ繁殖試験

試験区	NaCl濃度(%)	期間中生存親数	産仔数平均値	産仔数CV%	産仔中♂数
Cont	—	8	102	24%	0
T-1	0.05	9	99	56%	0
T-2	0.089	10	123	16%	0
T-3	0.16	9	119	18%	0
T-4	0.28	9	86	21%	0
T-5	0.5	4	29	25%	0