

幼若ホルモン様農薬のミジンコ類に対する影響調査

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

Kazuo ITOU, Miwa MURAOKA, Kenichi SHIMIZU, Takashi SASAKI, Motoko TAKAHASHI

(平成 18 年度実績)

要 約

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。幼若ホルモン様農薬を供試した結果、オオミジンコの 21 日間累積産仔数は供試濃度に相関して低下すると共に、産仔中の雄の割合も供試濃度に相関して増加しており、産仔数が半減する濃度と産仔の半数が雄となる濃度は比較的近いものになることがわかった。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た。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た。

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、このためのリングテスト (室間変動調査) が実施されることとなった。このため、当該リングテストに参加すると共にミジンコへの影響に関する詳細調査、他種甲殻類への影響の調査等を実施し、改訂試験法の問題点等の検証を行った。

調査研究方法

1. OECD TG211 (オオミジンコ繁殖試験) の改訂リングテストへの参加

今回のリングテストは (独) 国立環境研究所がリーディングラボとなっており、供試物質 (幼若ホルモン様農薬: ピリプロキシフェン、対照物質: 3, 5-ジクロロフェノール、共に和光純薬製) および供試生物 (オオミジンコ) は国立環境研究所より提供されたものを使用した。試験法は OECD TG211 に準拠し、通常の見察項目 (親生死、産仔数等) に、

*1 (独) 農薬検査所調査研究課

*2 (独) 農薬検査所有用生物安全検査課

改訂案の観察項目（産仔の雌雄判定、脱皮の有無）を加える形で実施した。実施条件を次に示す。雌雄判定は実体顕微鏡による観察での第1触角の大小により行った。

試験条件

- ① 暴露条件（ピリプロキシフェン）：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。試験区は対照区、助剤対照区および薬剤処理区（5濃度）の計7区を設定し、各区は生後24時間以内のオオミジンコ10匹を供試した。ピリプロキシフェンは適当な濃度溶液をジメチルホルムアミドに溶解して調製し、最終濃度が25, 74, 220, 670, 2000 ng/L (ppt) 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。
- ② 暴露条件（3, 5-ジクロロフェノール）：試験区は対照区および薬剤処理区（5濃度）の計6区を設定した。3, 5-ジクロロフェノールは適当量を水に溶解し、最終濃度が12, 37, 110, 330, 1000 μ g/L (ppb) となるよう試験液に添加した。その他の条件は上記①と同様に行った。
- ③ 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。
- ④ 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。また、換水時には試験液の温度、pH、DO値を測定した。なお、今回ピリプロキシフェンの水中濃度の測定が困難であったため、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

幾つかの濃度においてミジンコ繁殖試験を実施し、続けて被験物質を含まない培地にオオミジンコを移して試験を継続し、産仔数および雄発生についての回復性を調査した。

3. 雄化と他の毒性エンドポイントとの関係把握

リングテストを含め数回試験を実施し、既存のミジンコ繁殖試験のエンドポイント（産仔数変動）と、改正法での追加エンドポイント（雌雄比変動）について濃度比較を行った。半数影響濃度（EC50）の算出はEcotox-Staticsにより、全て設定濃度での比較とした。

4. 他生物種での雄化作用の解明

オオミジンコ指定系統以外の生物種を用いて繁殖影響調査を行った。今年度はリングテスト用に提供を受けたオオミジンコ（H18 国立環境研究所からの譲渡種）と、当所で長期間継代飼育してきたオオミジンコ（H7 国立環境研究所からの譲渡種）を供試し比較した。

結果及び考察

リングテストについては、試験期間中数匹の死亡が生じたものの結果に大きな影響を及ぼすものではなく、概ね濃度に依存した観察結果を得ることができた。(表 1,2, 図 1,2) しかし、今回供試物質の水中濃度測定が困難であり、設定濃度に基づく結果で報告することになったことは今後課題を残した。また、延べ 8000 匹となる産仔の雌雄判定の作業は単に既存の試験に観察項目を加えるというレベルではなく、実用上では何らかの合理的手法が必要になると思われた。

なお、リングテストは最終的に当所を含め 10 カ所の機関が参加しており、OECD のインターネットサイトで各データが参照可能である。当所の結果は室間変動として大きく外れるものではないことを確認した。

2 1 日間ピリプロキシフェンを暴露したオオミジンコを供試物質のない培地に戻し、さらに 1 5 日間飼育観察した結果、産仔数減少、雄発生率共に回復することが示された。(図 3,4) ただし回復が発現するには最低 7 日程度必要であり、回復度合いもそれまで暴露していた濃度に影響すると思われた。

ピリプロキシフェンを供試した結果、産仔数減少をエンドポイントとした EC50 値と雌雄比変動をエンドポイントとした EC50 値は比較的近いものとなった。(表 3) ただし雌雄比については中間濃度区で個体差が大きく、NOEC は異なると推定されるが更なるデータの蓄積が必要と思われる。

リングテストに供試したオオミジンコと当所で保有していたオオミジンコを用いてピリプロキシフェンを再度供試した結果、両者では産仔数減少の EC50 値は比較的近いものの、雌雄比変動の EC50 値が異なっていた。(表 3) 両種が同じ由来と考えた場合、飼育環境の違い等が雄発生感受性に影響を及ぼす可能性が示されたが更なるデータの蓄積が必要である。

表 1 : リングテスト結果 (ピリプロキシフェン)

表 2 : リングテスト結果 (3,5-ジクロロフェノール)

2 1 日暴露後	産仔数			雄		2 1 日暴露後	産仔数			雄	
	親数	仔数	平均	仔数	雄%		親数	仔数	平均	仔数	雄%
対照区	10	1628	162.8	1	0.1	対照区	10	960	96.0	0	0.0
助剤対照区	10	1827	182.7	0	0.0	助剤対照区	(設定せず)				
25ppt	10	1680	168.0	2	0.1	12ppb	9	959	106.6	0	0.0
74ppt	10	1606	160.6	98	6.1	37ppb	8	804	100.5	0	0.0
220ppt	9	919	102.1	460	50.1	110ppb	9	964	107.1	0	0.0
670ppt	10	567	56.7	450	79.4	330ppb	10	827	82.7	0	0.0
2000ppt	10	249	24.9	248	99.6	1000ppb	9	656	72.9	0	0.0

図 1 : 産仔数変動 (ヒ°リフ°ロキシフェン)

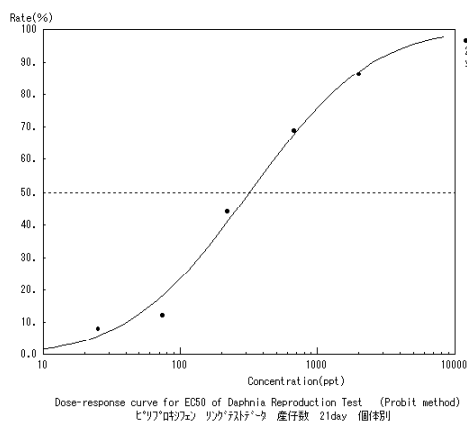


図 2 : 雌雄比変動 (ヒ°リフ°ロキシフェン)

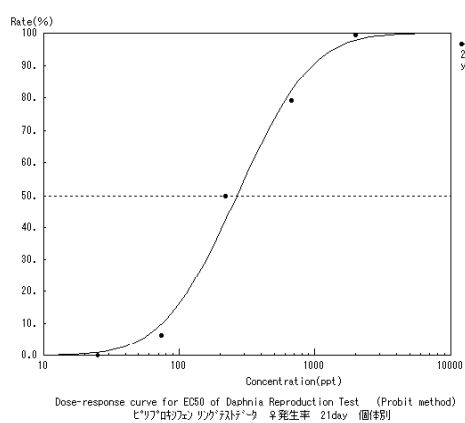


図 3 : 回復性検討 (産仔数)

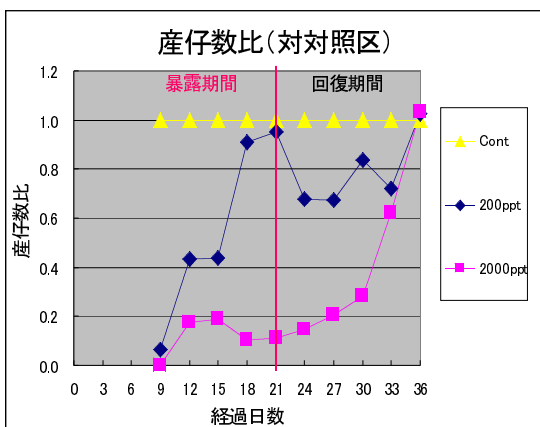


図 4 : 回復性検討 (雌雄比変動)

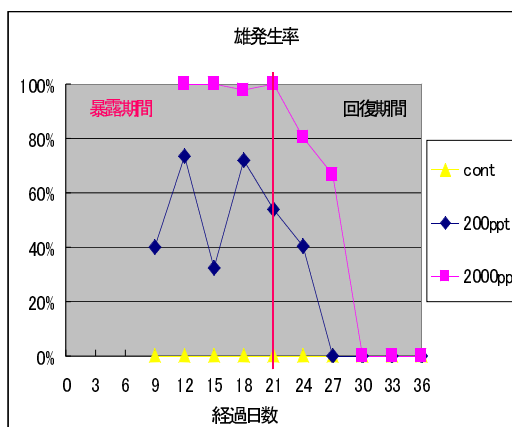


表 3 : エンドポイント比較および供試オオミジンコの比較

ヒ°リフ°ロキシフェンEC50 (ppt)		産仔数 減少	雌雄比 変動
国環研譲渡種 (H18譲渡)	リンゲテスト時	320	270
	再試験 (回復性検討)	280	160
農薬検査所保有種 (H7国環研譲渡)		190	580