

水生シダサンショウモ（栄養繁殖個体）を試験生物とした 生長阻害試験法の検討

石原 悟

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

水生シダであるサンショウモ (*Salvinia natans*) の栄養繁殖個体を試験生物とした生長阻害試験法を検討した。SIS (Swedish standard) 培地を用い、日長以外の環境条件を *Lemna* 属ウキクサに対する生長阻害試験の試験指針 (OECD TG221) に従いサンショウモを培養したところ、良好な生長が認められた。生長阻害試験における曝露開始時の個体を、栄養繁殖個体の先端の浮葉 2-4 枚を残し切断し 3 日間培養したものと定め、7 日間 (ウキクサ生長阻害試験の曝露期間) 培養した結果、乾燥重量および水中葉長でそれぞれ約 5 倍および約 9 倍の生長が認められた。除草剤 (オキサジアゾン、シメトリンおよびプレチラクロール) を被験物質として生長阻害試験を行った結果、水中葉長から算出した生長速度を基に算出した半数生長阻害濃度は、オキサジアゾン、シメトリンおよびプレチラクロールでそれぞれ 5.24, 14.6 および 7.46 $\mu\text{g/L}$ であった。試験を実施した範囲ではサンショウモは *Lemna* 属ウキクサの一種であるアオウキクサ (*L. aoukikusa*) と同程度の感受性を示した。OECD TG221 に準じた試験における試験生物として、サンショウモが有用であることが示唆された。

Keywords : 水生植物, 除草剤, リスク評価

結 言

ほ場などで使用された農薬は隣接する河川や湖沼といった水圏に流入することがあるため、水圏生態系に対する農薬の影響評価は、農薬登録時における影響評価の重要な分野の一つとなっている^{1,2)}。水生植物に対する農薬の安全性評価は、日本では藻類 (単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた生長阻害試験成績³⁾のみが用いられるが、欧米では除草剤など植物に活性を有する物質に対しては、複数種の藻類とウキクサ (*Lemna* sp.)⁴⁾を用いた試験成績が利用されている。フサモ (*Myriophyllum* sp.)⁵⁾を用いた生長阻害試験法の開発等が欧州でおこなわれているが、現状では水生植物に対する農薬の生長阻害試験法 (特に供試生物の種類) は充実しているとは言い難い。

本研究では藻類、ウキクサなど国際的な生長阻害試験の指針が定められている水生植物以外の水生植物種に対する影響を評価する手法として、ウキクサと同じ浮遊植物であるサンショウモ (*Salvinia natans*) (図 1) を供試生物として、*Lemna* 属ウキクサ生長阻害試験 (OECD TG221) で定められた試験条件に準拠した試験の実施が可能であるか検討を行い、サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物とした

生長阻害試験の試験法を開発した。また、開発した手法を用いサンショウモの除草剤に対する感受性を明らかにした。なお、本研究は平成 24 年度課題「農薬の河川一次生産者に対する環境影響評価手法の高度化の検討」の一環として行った。

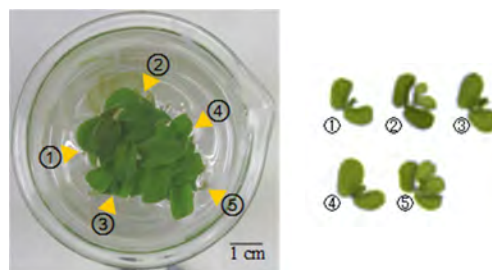


図 1. サンショウモ栄養繁殖個体
左: 培養 14 日後の様子 (容器: 100 mL ガラス製ビーカー)
右: 先端の浮葉 2-4 枚を残し切断した個体

材料および方法

1. 試験生物

サンショウモ (図 1) は茨城県のハス田水路より採取した個体をクローン増殖して用いた。室内での継代培養を容易にするため、70-80%エタノールへの浸漬による除藻を行い、微細藻類が繁殖しない系統を確立して使用した。培養には照明 (NEC 製、

FL8N, 昼白色蛍光灯) 付き培養器 (IKUTA 製, A4201D2L) を用い, 継代培養の環境条件は, 培地; SIS 培地⁴⁾, 明期 16 時間, 温度; 24±2°C, 放射照度; 100±20 μE·m⁻² s⁻¹ とし, 1-2 ヶ月毎に新鮮な培地に植継いだ。

2. 生長阻害試験法の検討

2.1. 試験生物の準備

生長阻害試験に使用する試験生物 (サンショウモ栄養繁殖個体の生長点を含む先端) を調製する手法を検討した。100 mL ガラス製ビーカーまたはポリカーボネート製プラントボックス (IWAKI 社製, CUL-JAR300) を試験容器とした。なお, 全ての試験でガラス製のビーカーを試験容器として用いる場合には, 培地の蒸発防止のため, ガラス製の時計皿を蓋として使用した。

栄養繁殖個体の先端の浮葉 2-4 枚を残し切断した個体 (以下, 切断個体という) を 1-2 個体移植して培養した。移植後 1-2 ヶ月程度の期間, 外観および分枝の発生状況を観察した。環境条件は, 継代培養と同条件とした。

2.2. 前培養期間の検討

栄養繁殖個体の先端を切断してから, 被検物質を曝露開始するまでの期間 (以下, 前培養期間という) を検討するため, 切断個体の生育状態を観察した。100 mL ガラス製ビーカーを試験容器とし, 切断個体を移植して培養した。移植後 1 週間程度の期間, 切断個体の外観を観察した。

2.3. 曝露期間中の生長量の測定

試験期間中における試験生物の生長量を明らか

にするため, 試験開始時および終了時に浮葉面積, 水中葉長および乾燥重量を測定して生長倍率を明らかにした。試験期間は, OECD TG221 の曝露期間と同様に 7 日間とした。浮葉面積の測定は, 生体画像解析システム・スキャナライザー (LemnaTec 社製 Scanalyzer) を用いて試験容器上部より試験個体の写真を撮影し, 画像解析することにより測定した。水中葉長の測定はデジタルノギス (Mitutoyo 社製, CD-15CP) を用いた。乾燥重量は, 試料を 80°C の恒温器で 2 日間以上乾燥させた後, 電子天秤 (Sartorius 社製, R-200D) で測定した。試験開始時の浮葉面積と乾燥重量および水中葉長には, 高い相関が認められたことから, 試験開始時の乾燥重量および水中葉長は, 別途同条件で培養した個体の切断個体の浮葉面積と乾燥重量の値を利用し推定した。

切断個体を試験条件で 3 日間培養したものを 100 mL ガラス製ビーカーに移植することで, 試験開始とした。試験は 6 連で 5 回行い, 全ての測定値の平均値を算出し生長倍率を求めた。

3. 除草剤に対する感受性

3 種類の除草剤 (オキサジアゾン, シメトリンおよびプレチラクロール) を被検物質として生長阻害試験を行った。試験法の概要を図 2 に示す。

試験容器として 100 mL ガラス製ビーカーを使用した。試験開始時の試験生物数は 1 個体/容器とし, 環境条件は継代培養時と同条件とした。曝露は 7 から 8 段階の異なる濃度, 繰り返し数は 6 連とした。曝露開始および終了時に浮葉面積, 水中葉長および乾燥重量を測定した。また, 曝露終了時には, 分枝の数を目視で計測した。浮葉面積, 水中葉長および乾燥重量の測定方法は, 2.3. と同様に行った。

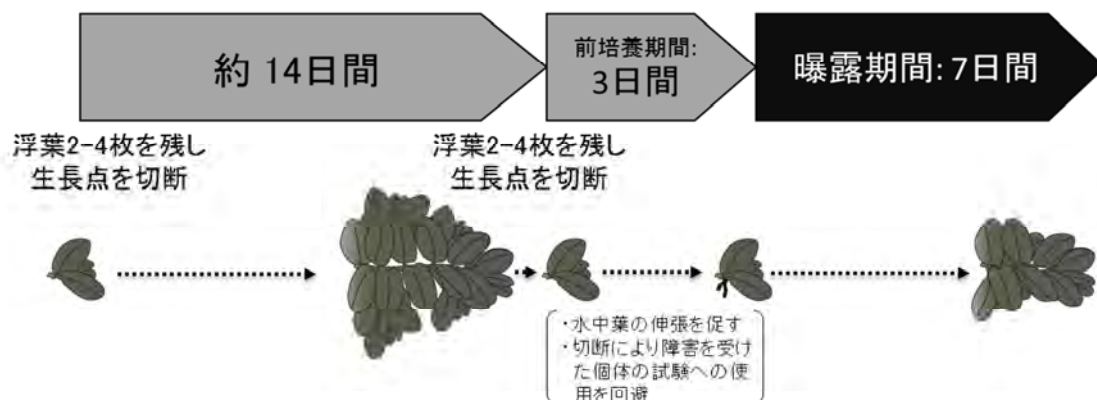


図2. サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物とした生長阻害試験の概要

試験開始および終了時に、各曝露区の試験溶液中の被検物質濃度を LC-MS/MS により測定した。水中葉長および乾燥重量について 0-7 日間の生長速度を次式より算出し、対照区の生長速度との比較から各曝露濃度における生長阻害率を求めた。

$$\mu_{0-7} = (\ln N_7 - \ln N_0) / 7$$

N_0 : 試験開始時の水中葉長または乾燥重量

N_7 : 7 日後の水中葉長または乾燥重量

半数生長阻害濃度 (7d- ErC_{50}) の算出は試験開始時と終了時の試験溶液中の被検物質濃度の幾何平均値を用いた。Microsoft Excel のソルバー機能を利用し、非線形最小二乗法によるロジスティック回帰分析を行い、7d- ErC_{50} を算出した。

結果および考察

1. 生長阻害試験法の検討

1.1. 試験生物の準備

培養に用いた容器の材質により、発生する分枝の数に違いが認められた。ガラス製ビーカー (蓋: ガラス製時計皿) を用いた場合、2 週間程度の培養で、平均 4 ヶ所から分枝の発生が認められたが (図 1 左)、プラントボックス (蓋: ポリカーボネート製) では、同じ培養期間で、分岐の発生は認められないか、もしくは 1 ヶ所しか認められなかった。また、培養期間を延長してもその傾向は変わらなかった (図 3)。

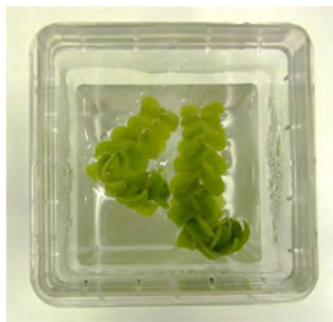


図 3. ポリカーボネート製プラントボックスを容器として培養したサンショウモ栄養繁殖個体 (2 個体/容器で培養開始, 培養日数: 50 日)

詳細な要因は不明であるが、ガラス製容器を用いた培養法は、ポリカーボネート製のプラントボックスを用いた方法と比較し、強く分枝が発生する培養

方法であると考えられた。

生長阻害試験における試験生物の準備という観点では、より短期間で分枝が発生する条件で培養できることが望ましい。ポリカーボネート製のプラントボックスを用いた培養法では、分枝の発生が少なく試験生物の準備は困難であることから、サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物とする場合、培養容器としてガラス製容器の使用が適していると考えられた。

1.2. 前培養期間の検討

検討した手法では、試験生物 (生長点を含む先端) を被検物質で曝露する前に強制的に切断する必要があるため、切断による影響が懸念された。曝露開始前に水中葉の伸長を促す前培養期間を設けることで、切断時に大きな傷害を受けた個体の試験への使用を防ぐことができた。同様の手法は、フサモを用いた試験³⁾でも提案されている。

切断個体を培養し外観を観察したところ、移植後 2-3 日間は外観の変化は小さかった。そこで、前培養の期間は、試験設計が容易 (金曜日に切断し、月曜日に曝露開始可能) で切断時に大きな傷害を受けた個体の判別が可能な 3 日間とした。

1.3. 曝露期間中の生長量の測定

サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物とする場合、影響指標として、浮葉面積、湿重量、乾燥重量、水中葉長などが考えられた。検討した培養方法では、浮葉が重なり生長するため (図 1)、試験終了時に浮葉面積を正確に測定することはできなかった。また、水中葉は根毛状で水分を多量に保持できる形状であることから、湿重量の正確な測定はできなかった。

本試験法における影響指標としては、乾燥重量 (生物量に及ぼす影響を評価) および水中葉長 (形態に及ぼす影響を評価) が適切であると考えられた。試験に用いた個体の試験開始時の乾燥重量の測定は不可能である。また、試験開始時の水中葉長の測定も困難であるが、試験開始時の浮葉面積 (試験開始時には浮葉は重なっていない (図 1 右) ため、比較的正確な測定が可能) と乾燥重量および水中葉長には、高い相関が認められたことから、別途測定した値を利用し、推定を行った。さらには、7 日間の培養では対照区の個体に肉眼で分枝が確認できたことから、試験終了時の分枝の数も有用な影響指標

になりうると考えられた。なお、7 日間の培養では、乾燥重量および水中葉長でそれぞれ約 5 倍および約 9 倍の生長が認められた (図 4)。

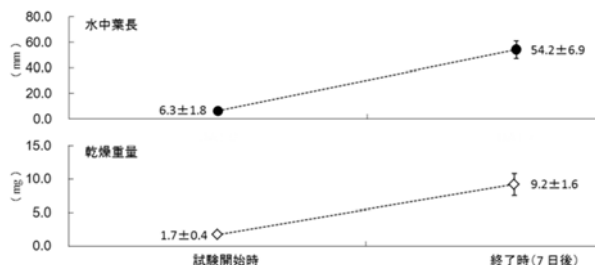


図 4. 試験期間(7 日間)における試験生物の生長 (上: 水中葉長, 下: 乾燥重量)

2. 除草剤に対する感受性

作用機構の異なる 3 種類の除草剤 (オキサジアゾン, シメトリンおよびプレチラクロール) を被験物質として, サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物とした生長阻害試験を実施した (図 5)。水中葉長の生長速度から算出した 7d-ErC₅₀ はオキサジアゾン, シメトリンおよびプレチラクロールでそれぞれ 5.24, 14.6 および 7.46 μg/L であった。

アオウキサの 7d-ErC₅₀ (葉状体数から算出した生長速度を基に算出: オキサジアゾン 19.1, シメトリン 37.7 およびプレチラクロール 4.27 μg/L) と比較すると, その差は 4 倍以内であり, サンショウモの 3 種類の除草剤に対する感受性はアオウキサと同程度であった。

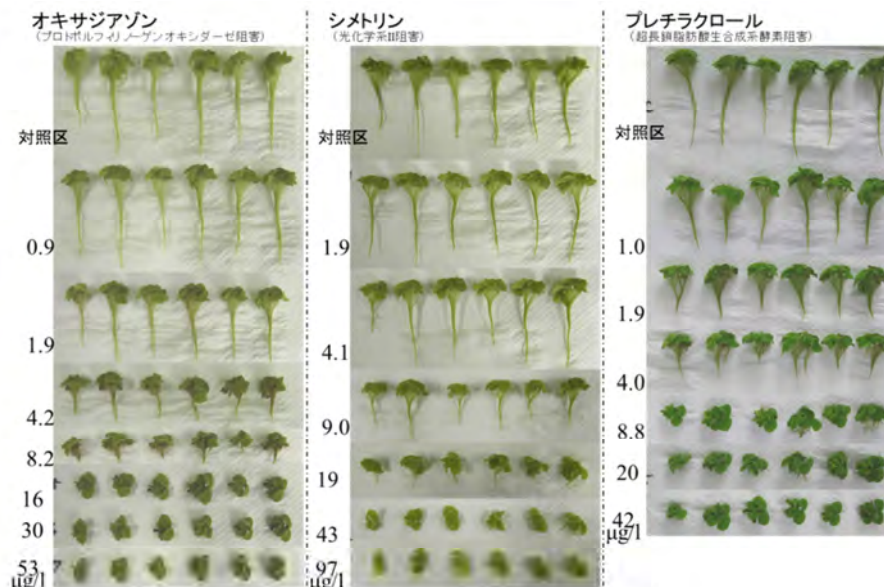


図 5. 試験終了時における試験生物の様子 (左からオキサジアゾン, シメトリン, プレチラクロール)

おわりに

サンショウモ栄養繁殖個体を試験生物として, OECD TG221 で定められた条件に準拠した試験の実施が可能であるか検討を行った。その結果, 環境条件については, 日長を除き OECD TG221 で定められた条件でサンショウモの正常な培養および生長阻害試験の実施が可能であることを確認した。生長阻害試験の実施については, 試験生物の準備および影響指標の測定でウキサとは異なる手法が必要であった。

本手法により, 水生シダの農薬に対する感受性評価が可能となることから, 農薬に対する水生生物種の感受性分布の解析を検討する際, 本手法の活用が期待される。

引用文献

- 1) 環境省: 農業生態影響評価検討会第2次中間報告-我が国における農業生態影響評価の当面のあり方について-, (2002).
- 2) 宮本貢ら: 住友化学 技術誌 2008- I, 26-40, (2008).
- 3) OECD: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, (2006).
- 4) OECD: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 221 *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, (2006).
- 5) Lorraine Maltby *et al.*(ed.): Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, CRC Press, Boca Raton, pp. 47-56., 2009.