

学会賞受賞論文

(奨励賞)

河川微細藻類に対する水稻除草剤の影響評価法に関する生態学的研究

石 原 悟*

農林水産消費安全技術センター農薬検査部

(平成 21 年 5 月 20 日受理)

Keywords: rice herbicides, water analysis, algal bioassay, attached diatoms, flow cytometry, river ecosystems, ecological risk assessment.

はじめに

我が国の農業の特徴としては水田が耕地の半分以上を占めることが挙げられる。そのため農薬の使用量のおよそ半分は水稻用であり、農薬による環境負荷を考える上では水田での農薬管理が必須となっている。また、水田は河川と水を介してつながっているため、水田で使用される農薬は河川等公共用水域に流出し非標的生物に影響を及ぼす危険性が高いことが知られている^{1,2)}。特に湛水状態で田面に直接施用される水稻除草剤は流出率が高く³⁾、畑作を農業の中心とする欧米と異なり、日本では水稻除草剤が生態影響評価の対象物質として優占度の高い物質群であるといえる。一方、生物に注目してみると、河川生態系において農耕地から流出した除草剤により最も影響を受ける可能性が高いと考えられる生物群は、生態学的食物連鎖の中では藻類などの生産者である。微細藻類を含めた植物群生は水域生態系において一次生産、酸素生産、栄養循環、魚類等の生息・繁殖・隠れ場所等として重要な役割を担っている⁴⁾。しかし、これまでの日本における非標的生物に対する農薬の影響評価は、特に経済的有益性の高い魚類や甲殻類に注目して行われていたため⁵⁾、農薬の非標的植物に対する有害性に関する知見は少ない。現行の評価手法では、日本の河川生態系の生産者を代表しているとは言い難い、単細胞の緑藻を用いた毒性試験の結果のみが評価に用いられている。また、農薬の非標的植物に対する影響評価手法に関しては、国際的にも魚類や甲殻類と比較して遅れを取っているのが現実である。

そこで、本研究では、河川水生生物の水稻除草剤による暴露実態を長期のモニタリングで明らかにすると共に、河

川生態系の一次生産性に及ぼす水稻除草剤の影響評価について、より精度の高い評価手法の開発を試みた。

1. 河川および湖における水稻除草剤の動態

河川および湖における一次生産者である藻類の水稻除草剤への暴露実態の調査を目的に、2001年から2005年に茨城県桜川流域および霞ヶ浦において水稻除草剤の挙動について調査した⁶⁾。

その結果、水稻除草剤の桜川における濃度の消長は、各除草剤の使用時期と良好な一致を見た。桜川は流域全域に渡って水田が分布しており、中流から下流にかけては全域に渡り水田排水の流入があるため、検出される除草剤の濃度水準に中流と下流で差はなかった。桜川および霞ヶ浦で同時期に検出される水稻除草剤の濃度差が大きいことから、桜川から流入する河川水中の水稻除草剤が霞ヶ浦の水により急激に希釈されていることが示された (Table 1)。

霞ヶ浦における農薬の垂直分布を調査した結果、最深部と上部の濃度差は小さく (1.1~1.7 倍)、水深が浅い霞ヶ浦では、桜川から霞ヶ浦に流入した水稻除草剤を含む河川水は速やかに混合され水中に分布しているものと考えられた。

2. 系統保存されている藻類を用いた水稻除草剤の有害性評価

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) における浮遊性単細胞緑藻類の生長阻害試験指針⁷⁾に準拠し、試験推奨種である *Pseudokirchneriella subcapitata* および *Chlorella vulgaris* (共に浮遊性単細胞緑藻、*C. vulgaris* は以前推奨種であったが、現行の試験指針では推奨種となっていない) の生長阻害試験を 14 種類的水稻除草剤について行い、水稻除草剤の緑藻の生長に及ぼす有害性を評価した。さらには、本試験指針に適応する緑藻以外

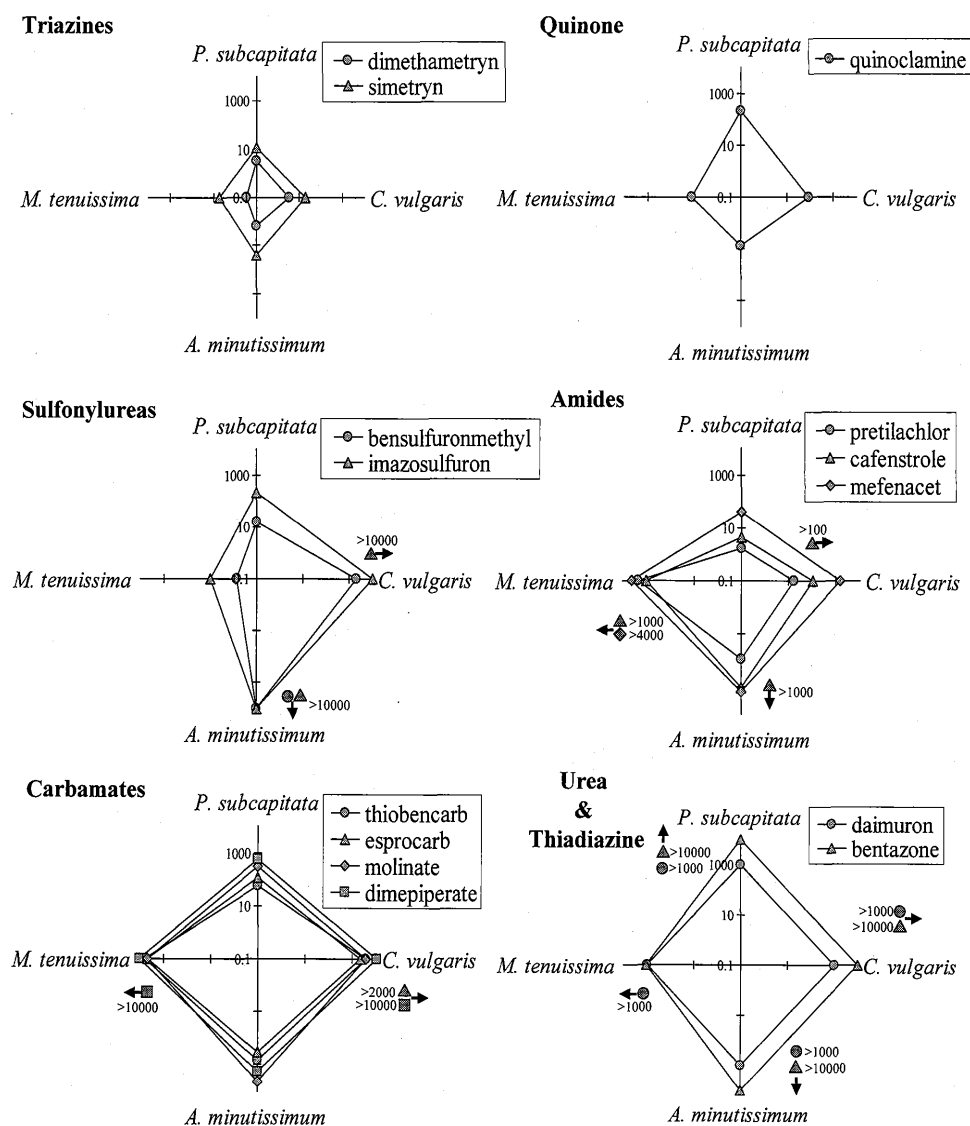
* 〒187-0011 東京都小平市鈴木町 2-772

E-mail: satoru-ishihara@acis.famc.go.jp

Table 1. Detected maximum level and detected day of rice herbicides at Sakura R. and L. Kasumigaura in 2001^{a)}

Common name (JMAF name ^{b)})	Midstream		Downstream		River mouth		Lake (Kakeuma-oki)	
	M.L. ^{c)} ($\mu\text{g/l}$)	Date	M.L. ^{c)} ($\mu\text{g/l}$)	Date	M.L. ^{c)} ($\mu\text{g/l}$)	Date	M.L. ^{c)} ($\mu\text{g/l}$)	Date
bensulfuron-methyl	1.2	15-May	0.96	22-May	0.61	22-May	0.20	29-May
cafenstrole	1.0	15-May	0.68	22-May	0.34	22-May	0.19	29-May
daimuron (dymron)	7.9	15-May	4.9	22-May	3.0	22-May	1.0	29-May
dimethametryn	0.15	15-May	0.14	22-May	0.074	22-May	0.046	29-May
esprocarb	0.70	15-May	0.88	22-May	0.44	22-May	0.11	29-May
imazosulfuron	1.5	15-May	1.2	22-May	0.60	22-May	0.24	5-Jun
mefenacet	2.5	15-May	3.0	22-May	1.6	22-May	0.19	5-Jun
molinate	4.0	29-May	3.0	29-May	1.5	5-Jun	0.20	29-May
pretilachlor	1.4	8-May	0.73	1-May	0.49	1-May	0.043	8-May
pyrazosulfuron-ethyl	0.50	15-May	0.49	22-May	0.30	22-May	0.090	29-May
simetryn (simetryne)	0.83	29-May	0.52	29-May	0.49	5-Jun	0.040	29-May

^{a)} Ref. 6. ^{b)} Japanese Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries. ^{c)} Maximum Level.

**Fig. 1.** Summary of the EbC_{50} ($\mu\text{g/l}$) ranges for seven types of rice herbicides.⁸⁾ Arrow indicates the limit concentration.

の藻類種（藍藻および珪藻）の選定を行い、藍藻 *Merismopedia tenuissima* および珪藻 *Achnanthes minutissimum* を試験生物種として選定すると共に、生長阻害試験を行うことにより水稻除草剤の藍藻および珪藻の生長に及ぼす有害性を評価した (Fig. 1)⁸⁾。

P. subcapitata は薬剤感受性が高く^{9,10)}、その試験結果は生態影響評価の初期段階で世界的に使用されている。日本においても、藻類の生長阻害試験では *P. subcapitata* の使用が推奨されており、生態影響評価にも利用されている。本種は藻類の中でも感受性が高いという理由から、農薬の登録保留基準の判定では不確定係数を掛けることなく *P. subcapitata* の毒性値 (EC₅₀: 50% Effective Concentration) がそのまま利用されている¹¹⁾。しかし、必ずしも *P. subcapitata* の感受性がすべての農薬に対して最も高いものではないことが、本研究のトリアジン系除草剤、スルホニルウレア系除草剤およびキノクラミンの試験結果から示された。トリアジン系およびスルホニルウレア系除草剤に最も感受性が高かったのは、4種藻類のうち、藍藻 *M. tenuissima* であった。*M. tenuissima* のトリアジン系およびスルホニルウレア系除草剤に対する EC₅₀ 値は、*P. subcapitata* と比較して、平均でそれぞれ 3.5 および 34 倍低い値であった。一方、キノクラミンに最も感受性が高かったのは、珪藻 *A. minutissimum* であり *A. minutissimum* のキノクラミン感受性は、*P. subcapitata* と比べ 5.4 倍低かった。これらの結果から、精度の高い生態影響評価を行うには藻類の除草剤に対する感受性差を考慮し、緑藻だけでなく複数種の藻類を供試対象として影響を見ることが重要であることが示された。

3. 回復性を考慮した影響評価手法の開発

化学物質による影響からの回復性は個体群へ及ぼす影響を推測する上で重要な情報であるにもかかわらず、的確に評価がされていないのが現状である。化学物質の急性的な生長阻害のみで有害性を評価する現行の方法では、農薬の生物に対する不可逆的な影響を評価できないため、実際の環境に近いシナリオを反映するためには、急性的な影響だけでなく、農薬による影響からの回復性について明らかにすることが重要である。そこで、生長阻害下の *P. subcapitata* 細胞について、フローサイトメーターで側方散乱光強度およびクロロフィル a の自家蛍光強度を測定し、各ドットプロットの分布の特徴から、除草剤 (40 種) が藻類細胞の形態に及ぼす影響を 4 型に類型化した。さらに、7 種類の除草剤について、生長阻害下の *P. subcapitata* 細胞を、除草剤を含まない培地で再度培養し、生長速度、ドットプロットおよび細胞形態を対照区と比較し、*P. subcapitata* 細胞の除草剤による影響からの回復性を形態および生長速度の面から評価した¹²⁾。

除草剤暴露による形態変化と回復性との関係を考察する

と、白化した細胞が多く観察されるほど生長速度が回復するまでの期間が長い傾向にあった。一方、細胞の肥大が観察された ALS 阻害剤暴露区および形態にほとんど変化を生じなかった光化学系 II 阻害剤暴露区では回復までの期間が短く、これらの剤による生長阻害下の細胞は、対照区と同等の増殖力を有していた。作用機構に関する情報とフローサイトメリー解析の結果を基に、除草剤の影響からの回復性の程度を推測できることが示唆された。

4. 水稻除草剤が 4 種の藻類の生長に及ぼすリスクの評価

系統保存されている藻類を用いた水稻除草剤の有害性評価で明らかにした EC₅₀ 値 (“影響濃度”) と桜川流域および霞ヶ浦における水稻除草剤のモニタリング結果 (“環境中濃度”: ここでは各年度における最高検出濃度を使用) を比較し、桜川流域および霞ヶ浦において水稻除草剤が微細藻類の生長に及ぼすリスクを評価した。

リスク評価は、“影響濃度”と“環境中濃度”が明らかになっている 12 種類的水稻除草剤について行った¹³⁾。その結果、桜川および霞ヶ浦では、いずれの評価においても“影響濃度”が“環境中濃度”を上回る事例は見られなかったことから、これらの水稻除草剤が 4 種藻類の生長に急性的な悪影響を及ぼすリスクは総じて低いと考えられた。しかし、“影響濃度”が“環境中濃度”を上回ることはないものの、本研究で評価した酸アミド系除草剤、トリアジン系除草剤およびスルホニルウレア系除草剤の中には、“影響濃度”と“環境中濃度”が比較的近い値を示すものもあり、また、水田との距離がより近い水路や小河川でのリスク評価では“影響濃度”が“環境中濃度”を上回る事例も認められたことから、これらの剤については、河川生態系の一次生産者に対する高次の影響評価を行う必要があると考えられた。特に、河川の一次生産者として重要な役割を担っている珪藻¹⁴⁾の生長に悪影響を及ぼすリスクが他の除草剤と比べ高いトリアジン系除草剤は、その優先順位が高いものと考えられた。

5. 珪藻を用いた生長阻害試験方法の開発

現行の藻類生長阻害試験⁷⁾は、液体培養で安定した継代培養が可能な浮遊性の藻類および付着性の低い藻類に適用が限られている。

そこで、付着性の高い淡水産付着性珪藻の薬剤感受性を簡易に検定できる生長阻害試験の方法を検討し、96 穴マイクロプレートを利用した試験法を開発した¹⁵⁾。さらには、本試験方法に適用可能な珪藻の種類について検討したところ、生長速度から判断すると *Craticula molestiformis*, *Eolimna minima*, *Eolimna subminuscule*, *Fistulifera saprophila*, *Mayamaea atomus* および *Nitzschia palea* が高い

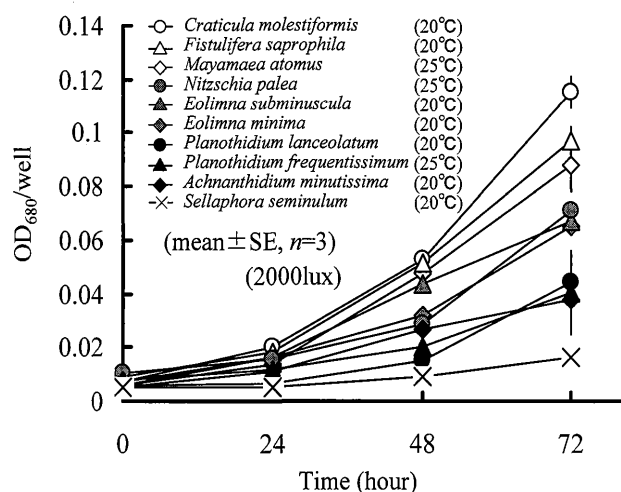


Fig. 2. Growth curves of tested attached diatoms. Reprinted from ref. 15 with permission.

と評価できた (Fig. 2). 一方, 実環境中での生息範囲の広さおよび野外からの分離培養の容易さから判断すると, *M. atomus* および *N. palea* が試験生物として適していると考えられた.

6. *Nitzschia* 属珪藻のトリアジン系除草剤感受性

前述の試験手法を利用し, 各水域より単離培養した *Nitzschia* 属珪藻のトリアジン系除草剤感受性を調査した. その結果, 同種の *Nitzschia* 属珪藻間でトリアジン系除草剤感受性に 100 倍を超える大きな差があることが明らかになった (Fig. 3). 採取した地点別に感受性を比較し考察すると, 感受性の低下している個体は, 農業排水の影響が少ない地点からは単離されず, 水田内および水田排水が流入する地点から単離される傾向にあった. この結果は, 除草剤の使用が水田内の珪藻群集の除草剤感受性に影響を及ぼしていることを示唆するものであった.

付着性珪藻が河川の一次消費者の餌資源であることを考慮すると, 感受性の違いが一次消費者の餌としての質に及ぼす影響を評価することは意義深い. トリアジン系除草剤感受性が大きく異なる *N. palea* 2 株の各種元素含量を測定

した結果では, 2 株の間の窒素, 炭素および硫黄含量に差はなく, 感受性の違いが餌としての質に及ぼす影響は小さいことが示唆された. また, 生長速度に関しても, 2 株の間に優位な差は認められなかった. これらの結果は, 珪藻群集内に除草剤に対する感受性の低下した個体が存在したとしても, 一次生産者としての機能に悪影響を及ぼす危険性は小さいことを示唆するものであった.

遺伝的生物多様性の保全の必要性について議論する必要性はあるが, 生態系における機能・サービスという観点から考察すると, 感受性の低下と生態系機能の低下は一致するものではないことを示す重要な結果であると考えられた¹⁶⁾.

7. 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性

より現実的・精緻な評価には, 複数の種・属レベルが混在している群集に対する影響評価が重要である. そこで, 高次の影響評価手法として, 前述の生長阻害試験法を改良し, 珪藻群集を用いた生長阻害試験法の開発を試みた. さらに, 開発した方法を利用し, トリアジン系除草剤感受性が低下した珪藻群集の水界生態系における挙動を, 茨城県桜川流域および長野県千曲川流域で調査した.

茨城県の逆川および桜川流域について調査した結果, 農業排水の流入がほとんどない地点 (逆川上流) の珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性は農業排水が流入する地点 (桜川中流) と比べ期間を通じて高い傾向にあった. また, その差は, 水稻の作付け期間により大きくなる傾向にあった (Fig. 4).

長野県の広井川および千曲川流域について調査した結果も茨城県の河川での結果と同様に, 農業排水の影響を受けない地点の珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性は農業排水が流入する地点と比べ高い傾向にあった. これらの結果は, 前項で示した, 水田がトリアジン系除草剤に対し感受性が低下している個体の起源であるという仮説をより強く支持するものであった.

河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性に差がみられたものの, 河川で検出されるトリアジン系除草剤濃度が, 珪藻群集の生長に悪影響を及ぼす濃度に達する可能性は低

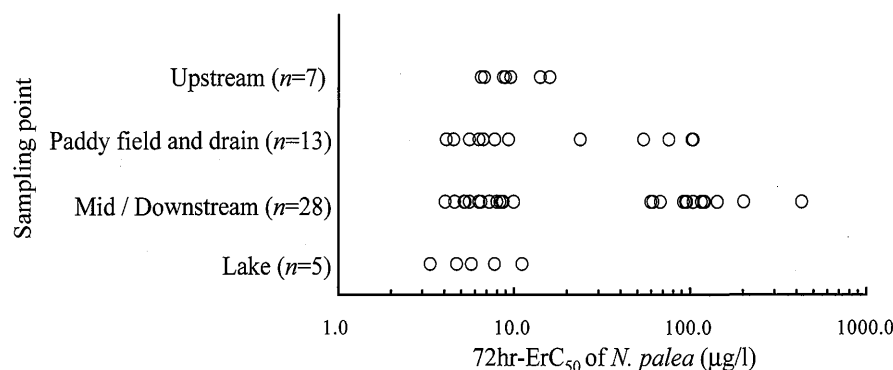


Fig. 3. Sensitivity of various *N. palea* strains to triazin herbicide (Dimethametryn). Reprinted from ref. 16 with permission.

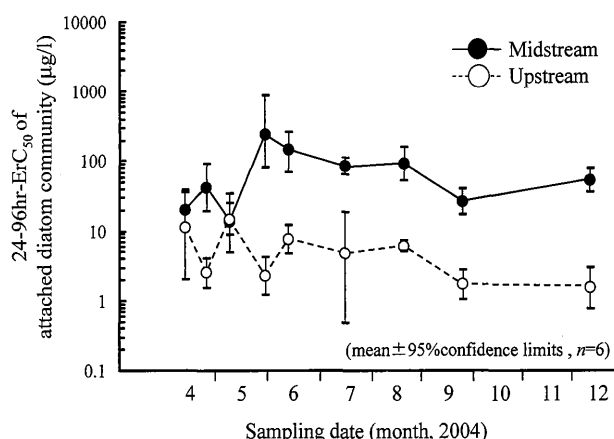


Fig. 4. Seasonal changes of sensitivity of attached diatom community to triazin herbicide (Dimethametryn). Reprinted from ref. 17 with permission.

く、河川に流出したトリアジン系除草剤が珪藻群集の生長に悪影響を及ぼすリスクは低いと考えられた。

逆川および桜川流域の珪藻群集を用いた生長阻害試験で試験終了時の珪藻群集を調査した結果、対照区では22属54種を超える種類が観察された。農業排水の影響を受けない地点の試験では、*M. atomus* が優先することが多く、次いで、*Nitzschia* 属および *Planothidium lanceolatum* が優占する傾向にあった。農業排水が流入する地点の試験では、*Nitzschia* 属が優占することが多く、*Nitzschia* 属以外では、*M. atomus* および *Eolimna* 属が優占する傾向にあった。

本手法により珪藻群集の生長に及ぼす化学物質の影響を容易に評価できることから、高次の評価手法として期待できた。しかし、本手法は野外の珪藻を直接試験に使用しているため、生物種が採集場所および季節に左右される。今後、高次の評価に利用するためには、さらに珪藻群集と薬剤感受性に関する知見を集積し、詳細な試験条件設定する必要があると考えられた¹⁷⁾。

おわりに

それぞれの農薬の影響濃度をすべての生物種に対し明らかにすることはできない。限られた試験生物に対する有害性評価の結果を基に評価せざるを得ない状況では、試験生物種の選定は評価結果を左右する重要な問題となっている。初期評価でリスクの疑われる農薬については、守るべき生態系を踏まえ、試験生物種の追加や現実的な暴露条件での試験等の結果から高次の評価を行うとともに、初期評価の有する不確実性を低減し、より精緻な評価を行う必要がある。本研究では、河川の一次生産性に及ぼす農薬の影響評価を、付着性珪藻類の生長を評価エンドポイントとすることで精緻化を試みた。付着性珪藻類を試験生物として評価することで、河川の一次生産性に及ぼす農薬の影響評価をより現実的に行えるものとする。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を頂いた日本植物防疫協会上路雅子博士ならびに日本植物調節剤研究協会研究所石井康雄博士に深く感謝の意を表します。また、本研究の取りまとめに際し、適切なご指導とご助言を頂いた竹内安智博士、安部浩博士ならびに農業環境技術研究所有機化学物質研究領域與語靖洋領域長に深く感謝の意を表します。また、東京学芸大学教育学部真山茂樹准教授には珪藻の分類方法およびデータの解析手法等についてご指導とご助言を頂きお礼申し上げます。本研究の遂行にあたり種々の励ましとご協力を頂いた農業環境技術研究所堀尾剛主任研究員、小原裕三主任研究員、稲生圭哉主任研究員、横山淳史研究員他多くの皆様に心から感謝いたします。

引用文献

- 1) 国立環境研究所：国立環境研究所特別研究報告 SR-19-'95, 1995.
- 2) 国立環境研究所：国立環境研究所特別研究報告 SR-29-'99, 1999.
- 3) 丸 諭：千葉県農業試験場特別報告 18 号, 1991.
- 4) M. R. Gary (ed.): "Fundamentals of Aquatic Toxicology. 2nd ed.," Taylor & Francis, London, pp135-169, 1995.
- 5) <http://www.env.go.jp/water/noyaku/seitaiken02/honbun.pdf> 2009 年 5 月 12 日閲覧.
- 6) 石原 悟, 石坂眞澄, 堀尾 剛, 小原裕三, 上路雅子：雑草研究 **51**, 69-81 (2006).
- 7) OECD: "Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test" Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, 2006.
- 8) 石原 悟：植調 **36**, 22-31 (2002).
- 9) T. Shigeoka, Y. Sato, Y. Takeda, K. Yoshida, and F. Yamauchi: *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 847-854 (1988).
- 10) F. Kasai and S. Hatakeyama: *Chemosphere* **27**, 899-904 (1993).
- 11) http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/h16rep_suisan.pdf 2009 年 5 月 12 日閲覧.
- 12) 石原 悟, 堀尾 剛, 小原裕三, 横山淳史：雑草研究 **51**, 239-248 (2006).
- 13) 石原 悟：農業環境技術研究所報告 **25**, 32-38 (2008).
- 14) 秋山優編：藻類の生態, 内田老鶴園, 1986.
- 15) 石原 悟, 堀尾 剛, 小原裕三, 横山淳史, 真山茂樹：環境毒化学会誌 **9**, 101-113 (2006).
- 16) 石原 悟：農業環境技術研究所報告 **25**, 48-58 (2008).
- 17) 石原 悟：農業環境技術研究所報告 **25**, 58-72 (2008).

略歴

石原 悟

生年月日：昭和 47 年 3 月 29 日

最終学歴：東京学芸大学大学院教育学研究科修士課程修了

職歴等：平成 8 年 4 月 農林水産省 農薬検査所

平成 11 年 4 月 農林水産省 農業環境技術研究所

平成 18 年 10 月 (独) 農薬検査所

平成 19 年 3 月 東京農工大学大学院連合農学研究科より博士 (農学) を取得

平成 19 年 4 月 農林水産消費安全技術センター・農薬検査部

研究テーマ：農薬の生態影響評価

趣味：庭いじり, 旅行