

模擬生態系試験法について

化学物質の生態影響を捉えるための試験手法としては、単一の生物種を用いた試験と生物の複合作用を踏まえた試験に大別されている。単一種による毒性試験は比較的簡便で安価であることから、化学物質の登録や有害物質のスクリーニング等、化学物質の生態影響を判定する現場で用いられているが、その結果は実際の野外の生態系と同一条件が再現されることは稀で、この試験は毒性評価の相対的スクリーニングとしてのみ意味がある¹⁾という意見もある。もう一方の生物の複合作用を踏まえた試験であるモデル生態系あるいは模擬生態系、いわゆるマイクロコズムやメソコズムを用いた化学物質の有害性評価は、より実際の生態系に近い条件での試験であり、米国の農薬登録、カナダでの優先物質での生態リスク評価、OECDにおける高生産量プログラムでの有害性評価手法などの中で取り上げられている。しかし、現段階では、試験系で用いる生物種やエンドポイントの選定、試験方法などに関する検討が行われている、あるいは今後行われる状況にあること、費用面での課題もあることから、試験方法が確定し、法規制等に利用されるにはさらに時間を要すると考えられる。

本資料では、このような背景を踏まえて、模擬生態系、特にマイクロコズムに関して、その重要性、つまり複数の生物種で構成された生態系モデルを用いた生態系影響評価の重要性、模擬生態系を用いた研究事例、模擬生態系試験の短所、長所及びこれからの課題の3点について、既存の知見を整理した。さらに、諸外国での事例として、米国環境保護庁農薬登録における模擬生態系の利用に関する位置付けについてとりまとめた。

1. 複数の生物種で構成された生態系モデルを用いた生態系影響評価の重要性

複数の生物種による生態系モデルを用いた生態系影響評価手法の重要性については、稲森ら(1998)²⁾が次のようにとりまとめている。

既存及び新規の化学物質の製造や使用により、環境中には多種多様な化学物質が検出されており、自然生態系に対する化学物質の影響を正確に評価する手法の開発およびその確立が強く望まれているものの、現在までのところ明確な評価法は存在していない。

生産者・捕食者・分解者で構成される生態系では、生物間相互作用が成り立っており、また生物種により化学物質に対する感受性は異なる。これまでに用いられている影響評価試験は単一生物試験であり、試験種に対する影響しか評価できない。生態系における生物間相互作用を含めた影響を評価するためには、複数以上の生物種が存在し、生産者・捕食者・分解者の存在する多種生物系試験で評価することがより適切である。多種生物系試験は、自然界に存在する様々な生物学的及び非生物学的側面を含有しているため、系の構成種に及ぼす影響や化学物質の消長を同時に評価することが可能である。これらの正確な影響評価は、実際の環境中で行えることが最善であるが、実際には不可能である。そこで、実際の環境により近い、模擬生態系を用いて、対象とする化学物質に対する生態系への影響評価を行うことが重要である。

2 模擬生態系を用いた研究

生態毒性試験として用いられている生態系モデルは大きく、自然生態系の一部をそのまま室内に持ち込んだ規模の大きなモデル、自然生態系の写実的なモデルではなく、種の遷移、代謝均衡能、恒常性能など自然生態系が持つ一般的な機能をモデル化しようとしたものの2つに分類されている³⁾。前者のモデルは生態系に対する定量的影響評価が可能と考えられており、後者は規模が小さいものの、生態系の機能に対する影響評価を目的としており、化学物質の有害性ランキングを行うことは可能と考えられている³⁾。

複数の生物種を用いた生態系モデルとして代表的な試験にマイクロコズム(フラスコレベル) メソコズム(隔離水界を用いる大規模なレベル) 試験が挙げられ、メソコズム試験は前述 に、マイクロコズム試験は前述 の試験に該当する。マイクロコズムとは「小さな宇宙」を語源としており、制御環境下で個体群や群集をある容器内で培養した系として、これまで微生物生態学や環境科学の立場から微生物の相互作用や機構解明などに用いられてきた²⁾。

以下、マイクロコズムあるいはメソコズムを用いた化学物質の毒性試験について、既往の知見からその研究例をとりまとめた。

(1) マイクロコズム、メソコズム試験と単一種試験の比較・検討事例

府馬ら(2000)⁴⁾は、鉄鋼、各種合金、バッテリー、塗料、磁器製造等を起源として存在するマンガンの水系微生物生態系に対する影響評価を行った。ここではマイクロコズム構成種として、鞭毛藻の *Euglena gracilis* (生産者)、繊毛虫の *Tetrahymena thermophila* (消費者)、ならびに細菌の *Escherichia coli* DH5 (分解者)を用いて試験を行っている。試験では、マイクロコズムでみられた影響が発現するメカニズムを考察するため、マイクロコズム構成生物種の単独培養系に対する影響についても検討している。その結果、マイクロコズムと単独培養系では、マンガンの影響にいくつかの差がみられた。即ち、マイクロコズムでは繊毛虫のテトラヒメナが死滅し、これは餌の *E. coli* が死滅した間接的影響と考えられたこと、*Eu. gracilis* はマンガン 550mg/L 添加により、マイクロコズムでは若干増加したのに対し、単独培養系では明らかに減少したことが挙げられた。の要因として、共存する他の生物種によってマンガンが吸収又は吸着され培養中のマンガン濃度が低下した可能性や、添加したマンガンの化学的動態が毒性の低いものに変換された可能性が考えられた。以上の結果より、府馬らは毒性因子の影響は、生態系における場合と単独培養の場合とで異なることを示唆しており、生態系影響をより現実的に評価するためにはマイクロコズム試験が有用であるとしている。

同様に、実際の生態系により近い混合系としてのマイクロコズム試験の有効性についてはいくつかの報告があり、これらの報告について稲森ら²⁾が紹介している。それによれば、高松ら(1996)は、洗剤成分である非イオン界面活性剤のLASの分解性と構成生物に及ぼす影響を評価しており、その結果、界面活性剤は低温ほど分解さ

れにくく、構成生物に及ぼす影響もそれに伴い低温ほど影響が観察された。このことから、水温の変動による化学物質の分解性の変化や生物への影響も、マイクロコズムを用いて評価できることを指摘している。また、鄭らは(1996) 微量汚染物質含排水として埋立地浸出水に着目し、ミジンコに対する影響とマイクロコズムシステムに及ぼす影響について評価を行っている。その結果、ミジンコの遊泳阻害に及ぼす影響については、NOEC は排水 2.5%、EC50 は排水 6.0%であり、マイクロコズム試験では構成生物の NOEC は排水 1~5%であることを明らかにし、マイクロコズム試験においてミジンコの NOEC に相当する影響が観察されているとしている。

Girling et. al.(2000)⁵⁾は、EC 公示物質に対する危険評価のレベル 2 に含まれるデータを得るための水系毒性試験の開発を目的に、藻、原生動物、ワムシ、甲殻類、双翅類に対する試験方法を検討した。著者らは、参照物質としてリンダン、3,4 ジクロロアニリン、アトラジン、銅を用いて、単一種による試験と、メソコズム試験(流水系:Stream、止水系:Pond)を実施した。その結果、物質により毒性値に差がみられ、リンダン、アトラジン、銅の無影響濃度(NOEC)は単一生物試験の測定値とメソコズム測定値で同じレベルであったものの、3,4 ジクロロアニリンの無影響濃度(NOEC)は実験室測定値がメソコズム測定値の 200 倍に達していた(表 1)。

表 1 単一種による室内試験とメソコズム試験による無影響濃度(NOEC)

単位:mg/L

物質名	単一種試験	メソコズム	
	室内	流水系(Stream)	止水系(Pond)
リンダン	0.00010	0.00060	<0.0010
3,4 ジクロロアニリン	0.17	0.060	0.0010
アトラジン	0.0020	0.011	<0.0060
銅	0.0010	0.0020	0.010

(2) マイクロコズム試験の測定項目についての検討事例

高松ら(1997)は、マイクロコズムに同様に LAS を添加し、生物化学的側面として個体群動態及び ATP、物理化学的側面として DO および pH の経日変化より影響評価を行った。その結果、生物学的側面である個体群動態による NOEC は 1.5mg/L で、物理化学的側面の DO による NOEC は 2.5mg/L と評価しており、影響評価のための測定項目として、DO や pH はシステムへの影響を統一的に評価することや連続モニタリングが可能であるが、個体群動態は生物間相互作用における評価対象物質の二次的影響やそれぞれの生物者・捕食者・分解者に対する影響も評価可能なため、個体群動態を測定することは有益な方法であることを明らかにした[稲森ら(1998)]。

3. 模擬生態系（マイクロコズム）試験の利点・限界及び今後の課題

模擬生態系試験の利点あるいは限界、課題については、稲森ら（1998）²⁾がとりまとめており、表2にその内容を転記した。

表2 評価対象物質の消長および構成生物への影響評価における
マイクロコズム試験の利点と限界

	評価対象物質の消長	評価対象物質の構成生物への影響
利点	自然生態系由来の物質循環が依存するモデル生態系であり、再現性と安定性が高く、同条件下で繰り返し実験が可能な系にある。対象系の生物相は最低でも1年程度は、同バイオマス・同種構成で安定しているため、一定条件下における評価対象物質の消長を適切に評価することが可能であり、他の評価対象物質の結果とも比較評価する上で有効である。	対象系の生物相は最低でも1年程度は、同バイオマス・同種構成で安定しているため、対象系内の物質循環の回転速度も一定であると考えられる。よって、物質循環が存在する中で生産者・捕食者・分解者に及ぼす影響や、物質循環におよぼす影響、また長期的な影響を評価することが可能である。
限界	種構成は、自然環境水から自然淘汰されて作製された種構成であるが現場の種とは必ずしも一致しない。化学物質等の消長には現場の細菌類による生分解が、その化学物質の消長に最も影響を及ぼすため、必要に応じて新規の模擬生態系の作製も考慮することが必要である。	自然環境水を自然淘汰させて作製した系であり、構成種も既知なモデルである。しかし海洋生態系への影響等この種構成のみで評価困難な場合があるため、必要に応じて新規の模擬生態系の作製も考慮することが必要である。

[検討すべき課題]

生産者、捕食者、分解者から構成されることを特徴としているが、さらに構成種について目的に応じた種構成の組み合わせの開発も検討する必要がある。

単一種を用いた二者培養試験等の影響評価法ではEC₅₀、LC₅₀というように値が数値化され比較評価が容易となっていることから、複数種による試験法の影響評価においても、その数理的解析法を明確化し比較評価の適正化をさらに図る必要がある。

複数種による試験は生態系の機能面、構造面を可能な限りモデル化した系であるが、この系が実際の環境をどの程度反映しているのかをさらに明らかにするために、対象物質、微生物の種類を変えて実際の河川・湖沼水を用いた環境影響評価試験とフラスコ内試験の比較・評価の検討をさらに行う必要がある。

マイクロコズムシステムは生産者・捕食者・分解者から構成されているので、生態系でおこる種構成、栄養段階構造への変動のみでなく、物質循環とエネルギーの流れに着目したラジオアイソトープ等を活用した解析を行う必要がある。

マイクロコズム試験で得られた結果を野外データへ外挿するための安全係数について、OECD や EPA でも検討されているが、本マイクロコズムにおける安全係数についてさらに検討する必要がある。

生態系に及ぼす影響評価検討の重要性は理解されているにも関わらず、生態系の標準化は永遠の課題で不可能であるという認識が存在している。正確さを追求するならば、本来は人体による試験が必要であるにも関わらず、人間への影響をモデルとしてのラット、マウスを用いた毒性試験結果から評価しているのと同様に、生態系への影響をマイクロコズム試験で行うことが意味のあることであるという考え方をさらに認識する上でも生態系に着目した基礎的・応用的研究を行う必要がある。

4．米国における模擬生態系を用いた取組

ここでは、米国における模擬生態系を用いた事例として、The Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA)における生態リスク評価手法での模擬生態系モデルの位置づけを、米国環境保護庁より報告されている各種文書からとりまとめた^{6)~9)}。

FIFRA 科学諮問委員会 (FIFRA Scientific Advisory Panel : SAP) は、1996 年 5 月に、農薬プログラム部 (OPP) における生態リスク評価とガイドラインに関して、いくつかの科学的問題に取り組む委員会を開催し、OPP における生態リスク評価手法とその手続きを重要な課題の 1 つとして挙げた。OPP は委員会に対して、OPP がこれらの手法や手続きをどのように改良すべきか、コメントと再検討を依頼しており、委員会は、OPP に対して、生態系へのリスクに対して蓋然的な評価を行うための有効な手段と方法論を開発するよう強く求めた。

SAP は、生態学的な評価を見直すため、1988 年に設立されたリスク評価手法を検討する環境運命影響課 (the Environmental Fate and Effects Division's : EFED) に対して、検討を専任して行うことを求めた。

その後、関連機関との連携を踏まえて、SAP ではリスクに係わる諸問題について討議し、農薬によるリスク評価に関する提言を行った。それを受け、1997 年 6 月に FIFRA 生態リスク評価手法委員会 (ECOFRAM : The Ecological Committee on FIFRA Risk Assessment Methods、以下 ECOFRAM と称す) が設立され、農薬生態リスク評価手法に関する検討が開始された。この目的は、FIFRA の法令下での生態影響評価プロセスの核心要素を重点的に討議することにあった。ECOFRAM は、諸官庁をはじめ、学会、研究者、環境保護グループ、産業界から選ばれた専門家で構成されており、彼らは提案された手段や方法論を発展させるための作業を行った。

(1) FIFRA 生態リスク評価手法 (ECOFRAM) での位置づけ

ECOFRAM では生態影響の手法とツールを開発することを目的としている。それは、FIFRA の規定内で環境中に存在する農薬による非標的生物や陸域生物への悪影響やその規模を予測するためのものである。ECOFRAM が最初に取り組む問題としては、陸生・水生無脊椎動物群への農薬の急性・慢性的な影響を捉えることが挙げられている。

ECOFRAM には、米国環境省をはじめ、米国農務省、カナダ環境省他、環境に関する学術経験者、コンサルタントが参加しており(48名)、これら参加者はいくつかのワークショップ (Workshop Organizing Committee) を構成している。ワークショップは陸域と水域に分かれて活動し、さらに、暴露と影響特性評価のサブグループに分かれている。水域生態系への影響に関しては、水域影響サブ委員会が組織され、そこで水生生物に対するリスク評価プロセスが検討されている。ECOFRAM のリスク評価は、4つの段階が設定されており、その中で、模擬生態系については、最終段階 (Tier 4) で取り上げられている。

マイクロコズムとメソコズムの研究は、実施するのに費用がかかるものの、自然に近似した変動を再現できるとされている。マイクロコズムとメソコズムの利点として次の4つが挙げられる。

- ・農薬の分解・消失を含めて準現実的な暴露環境を再現できる
- ・多くの生物での反応を測定できる
- ・群集と生態系の反応を観察することができる
- ・生態系の回復を観察できること

メソコズムとマイクロコズムは、自然界での生態系の動態をシミュレートする目的で用いられているもので、生態系の複数の構成要素を含んでいることが特徴とされており、相対的な規模の違いにより区分されているものの、決定的な違いは問題視されていない。ECOFRAM では、室内あるいは野外における様々なサイズの生態系をモデル化するために適用される原理は同じであるとして、便宜上全てマイクロコズムとして扱っている。

農薬の生態リスク評価に関して、マイクロコズムは従来での室内での毒性試験や環境運命実験に基づく情報を拡大し、裏付け、統合するために利用されており、下記に示す準自然状況下での数多くの生物群に対する農薬の影響を測定するために用いられてきている。

生物の感受性や環境プロセスの識別

生態系の回復状態の観察

生態系に影響を及ぼさない農薬暴露の限界の決定

マイクロコズムの適用に関しては、環境関連の研究者により継続的に検討され (Giesy 1980; Giddings 1983; Franco et al. 1984)、最近では農薬規則策定の担当者等の中で承認されている手法となっている (SETAC-Europe 1992; Crossland et al. 1994; OECD 1996; Campbell et al. 1999)。

(2) マイクロコズムスタンダードの展開

マイクロコズムは、基礎生態学的な実験の応用という長い歴史を持っており、生態毒性学でのスクリーニングとして実験室内での標準的なマイクロコズムの開発は 1970 年代に始められた。

1970～80年代にかけて、生態毒性学実験は野外の大規模なシステムを用いて行われた。野外システムでの成果は、FIFRA のガイドライン検討において野外の状態をシミュレートするための基礎となっていた。ガイドラインでは、リスク管理を行うために、必要なエンドポイントを提供し、生態系の指標として魚類を掲げていた。

本ガイドラインでは、魚類が再生産されることを前提として 30m³ 以上の池での実験が含まれており、これらの実験では魚類以外にも、測定する最小限のパラメータとして、水質、総生産量、群集の呼吸量（連続 24 時間の pH と溶存酸素から推定）、植物プランクトン、付着生物、動物プランクトン（体長別の枝角類）、水生昆虫、草類、底生無脊椎動物を含んでいた。

推奨された実験計画では、最小限 12 池で、3 段階の暴露レベルをそれぞれ 3 ケース（9 ケース）さらに 3 段階のコントロールを設定していた。

しかし、農薬登録を行う際に、このガイドラインでの技術的な課題や政策上の問題点が表面化した。技術的な問題としては、無影響測定に対する用量反応試験計画や、自然変動に基づいた農薬の影響を検出するための統計的な手法を含んでいないこと、結果の解釈や取り組みでの課題に適したシステムの設計がなされていないことが挙げられた。

水生生物影響検討グループ（AEDG）では、これらの問題に関して検討を重ね、多くの勧告を提出し、特に小規模システム、さらにはより焦点を明確にした実験による技術を開発することを提案した。一方で、登録やリスク管理に対する実験の目的や有効性に関する政策的な問題も表面化し、EPA は登録プロセスにおける生態学的な野外実験の使用を中止した。

AEDG の推奨に答えて、農薬リスク評価に対する小規模のマイクロコズムの利用に関するワークショップが 1991 年にバージニア州ウインターグリーンで開催された。ワークショップの報告書（SETAC/RESOLVE1992）は、野外のマイクロコズムに対するガイドラインを含んでいた。同時期に英国では the Monks Wood Experimental Station が開催され、同様なガイドラインを提案するに至っている（SETAC-Europe 1992）。

1992 年に開催された The European Workshop on Freshwater Field Tests (EWOFFT) では、Wintergreen や Monks Wood からの参加者が他の専門家と、推奨する統一セットについて議論を展開した（Crossland et al, 1994）。

SETAC の水生生態系モデル諮問委員会の後援で、EWOFFT は、OECD が提案するガイドラインに変更することを推奨した。このガイドライン原案は、加盟国によって未だ検討されているものの、現在マイクロコズムの試験計画や活動の基本原理を反映しているとされているものである。

最近のマイクロコズム・メソコズム研究に関する専門家会合としては、HARAP (Higher-

Tier Aquatic Risk Assessment for Pesticides : 1986 年以降に開催) と CLASSIC (1999 年に開催) があり、マイクロコズムやメソコズムの実験計画に関する検討を継続するために開催が続けられている。

また、FIFRA ガイドラインが提案された The George Mason Workshop の前に EPA によって配布されたバックグラウンド情報では、生態リスク評価のプロセスのより高い段階での野外研究の役割が示された。野外試験は、生物群集や生態系への影響を十分考慮し、生態学的な潜在的な影響評価を改善することが期待されている。マイクロコズム・メソコズム試験は、農薬のあらゆる暴露での生物学的な影響を徹底的に調べることを可能にしている。

マイクロコズム・メソコズム計画における試験は生態系の構造や要素に対する微妙な変化の評価が可能となり、暴露が推定された場合には、その結果を影響領域と農薬の使用範囲を外挿することができる。マイクロコズム・メソコズム試験の暴露範囲での水生生物への影響は、生態的な安全濃度を定める目的で用いられている。こういった概念は今日では広く受け入れられている。

しかし、マイクロコズム・メソコズムの研究では、生態系への外挿方法に関して有益な情報が示されなかったため、広範囲の暴露影響や影響を推定するための暴露手法を確立することができなかった。

FIFRA のガイドラインの役割は 2 つあり、1 つは登録に際しての許容できないリスクに関するもので、もう 1 つはリスク管理者に対するリスク便益分析で評価される水生生物への影響の時間と大きさに関する情報の提供である。しかし、専門家の多くはこれらの目的が実験計画を展開するために十分に明瞭に定義されなかったと評しており、FIFRA SAP は、ガイドラインでは試験方法の目的が明瞭に示されず、かなりデータの使用に関して混乱のあったことを指摘している。

メソコズムの経験から、産業界や行政においては生態系全体のモデルに対して否定的である。しかし、大部分の専門家と ECOFRAM は、現在、測定する化学薬品に対する特有の影響を明確にできれば、マイクロコズムとメソコズムがより高い生態リスク評価に対して有益な情報を供給すると考えている。

(3) マイクロコズムの農薬の生態リスク評価に対する手法としての判定

より高い段階での農薬の生態リスク評価にマイクロコズムが有効であることは、数多くの研究者により提唱されており、マイクロコズムによるアプローチは、FIFRA のリスク評価での不確実性を減少させるための手法の開発と関連して、次のように要約されている。

マイクロコズムアプローチには歴史的な展開があった。

OECD で提案されているガイドラインは、現時点ではリスク評価に使うことができるものの、技術的に完成されてはならず、今後も改訂されていくことが予想される。1 つの手法で生態系全ての状況を適切に表すことはできず、それぞれの実験は特定の化学薬品に対して具体的なリスク評価ができるように行わなくてはならない。

マイクロコズムの実験は比較的成本がかかり、時間を消費する。

マイクロコズムによる実験は、専門家の生態学的な解釈を必要とする幅広いデータを提供する。

マイクロコズムはより高い段階でのリスク評価に適切である。

マイクロコズムの技術は主として、止水域での生態系に対して開発されたものであり、流水あるいは沿岸、海洋あるいは河口域に対しては開発された事例は少ない。

マイクロコズムアプローチは全ての化学物質や農薬使用に適用可能であるべきである。

マイクロコズムは、リスク評価において、生態系に対する潜在的な影響に関し生態系を維持できる濃度を定めることができるという点で有用である。

5 引用文献

- 1) 後藤幹保・高松みつ子(1986): エコトキシコロジーとその試験法, 吉田多摩夫編 環境化学物質と沿岸生態系, 水産学シリーズ 58, 恒星社厚生閣: 16-29.
- 2) 稲森悠平・高松良江・須藤隆一(1998): マイクロコズムによる生態系影響評価, 廃棄物学会誌, Vol.9(5): 368-378.
- 3) 杉浦 柱(2000): 多様度の異なるマイクロコズムへのAl³⁺イオンとCu²⁺イオンの影響, 相模女子大学紀要 自然系 63B:53-65.
- 4) 府馬正一・武田洋・宮本霧子・柳沢啓・井上義和・石井伸昌・菅井一憲・石井千歳(2000): マイクロコズムを用いたマンガンの生態系影響評価, 水環境学会要旨集: 479.
- 5) Girling A. E., D. Pascoe, C. R. Janssen, A. Peilther, H. Schafer, B. Neumeier, Mitchell G. C., E. J. Taylor, S. J. Maound, J. P. Lay, N.O. Crossland, R. R. Stephenson and G. Persoone (2000): Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, (45):148-176.
- 6) OPP(1999): Process for Developing Probabilistic Tools and Methodologies for Ecological Assessments
<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/backgrnd.htm>
- 7) OPP(1999): 1998 SETAC Interactive Poster Session. Initiative to Revise EPA's Pesticide Ecological Assessment Process.
<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/1poster.pdf>
- 8) OPP(1999): ECOFRAM Draft Reports.
<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/aquareport.pdf>
- 9) SETAC(1997): ECOFRAM Aquatic Effects Subcommittee. Preliminary Findings of the Ecological Committee on FIFRA Risk Assessment Methods (ECOFRAM): VI. Aquatic Effects Analysis
<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/setac98a.pdf>