

課題名	5C-1102 適切なリスク管理対策の選択を可能にする農薬の定量的リスク評価法の開発
課題代表者名	稲生 圭哉（独立行政法人農業環境技術研究所農業環境インベントリーセンター）
研究実施期間	平成23～25年度
累計予算額	58,541千円（うち25年度19,222千円） 予算額は、間接経費を含む。
本研究のキーワード	農薬、生態リスク、数理モデル、GIS、種の感受性分布、水生昆虫、付着藻類、回復性、複合影響、リスク低減

研究体制

- (1) GISを活用した地域レベルでの曝露評価法の開発（（独）農業環境技術研究所）
- (2) 河川生態系の在来種を用いた新たな毒性試験法の開発（（独）農業環境技術研究所）
- (3) 確率論を導入した農薬の生物多様性影響評価法の開発（（独）農業環境技術研究所）
- (4) 生物多様性を対象とした地域レベルでの農薬のリスク指標の開発（（独）農業環境技術研究所）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

現在、わが国の農薬登録制度において、農薬取締法に基づき環境省が設定する「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準」により、農薬の河川生態系に対するリスク評価（生態リスク評価）が実施されている。この評価手法では、3種の試験生物（魚類、ミジンコ、緑藻）に対する急性毒性試験の結果と、簡単なシナリオに基づいて算定される環境中予測濃度とを比較し、リスクの有無を二者択一的に行っている。しかし、本評価手法は、リスクを定量的に表現できない、評価対象の生物種が限定されている、生物多様性への影響を考慮していない、などの課題がある。

一方、登録された農薬の使用時における適切なリスク

管理を行うためには、農薬使用に伴う生態リスクの程度を定量的に把握し、リスク低減効果の高い管理対策を選択していくことが望まれる。近年、農業生産の現場では環境保全型農業の一環として、農薬の節減、例えば慣行栽培に比べて農薬の使用成分数を5割以上削減した特別栽培が推進されている。また、農薬の環境負荷を削減するため、水田で使用する農薬について、散布後の落水や掛け流しを行わないとする止水期間を3日から7日に延長するなどの取り組みがなされている。しかし、これらの取り組みに対するリスクの低減効果を定量的に評価する手法は確立されていないのが実情であり、喫緊の課題となっている。

2. 研究開発目的

本研究では、農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価する手法を開発し、リスク低減効果の高い管理対策の選択を支援することを目的とした。本目的を達成するため、水稻栽培が盛んに行われている河川流域（特に小水域）を対象とした農薬挙動予測モデル（PADDY-Large）を開発し、水生生物に対する水稻用農薬の曝露濃度を評価する手法の開発を行うこととした。その際、流域特性に関する情報をGISにより解析し、これらをモデル計算に反映させた。また、河川生態系を構成する様々な生物種に対する農薬の感受性差を種の感受性分布（SSD）により表現し、農薬の生物多様性（種の多様性）に対する影響評価法の開発を行うこととした。SSD解析に必要な毒性データを効率的に得るため、従来法では毒性試験の実施が困難であったわが国の河川における優占種である付着藻類（5種）について、96穴マイクロプレートと蛍光プレートリーダーを用いた新たな毒性試験法の開発を行うこととした。既存のテストガイドラインでは急性毒性評価が難しいとされてきた昆虫成長制御剤を含む殺虫剤の急性毒性を適切に評価するため、わが国の河川に優占して生息する水生昆虫コガタシマトビケラを用い、成長段階別（卵期～幼虫期）および脱皮期の急性毒性試験法の開発を行うこととした。殺虫剤の一時

農薬登録制度における「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準」により、農薬の生態リスク評価が実施されている。

リスクの有無を二者択一的に評価

農薬の使用場面で適切なリスク管理を行うためには、
農薬使用に伴う生態リスクの程度を定量的に把握し、
リスク低減効果の高い管理対策を選択していくことが必要。

- 農薬の節減 例) 慣行→特別栽培（成分数5割減）
- 農薬の流出防止技術の導入 例) 水田使用農薬の止水期間3日→7日

リスクの低減効果を定量的に評価する手法は
確立されていない

図1 研究の背景

的な曝露からの回復性を考慮した個体群レベルでの毒性評価を行うために、コガタシマトビケラの個体群動態モデルの開発を行うこととした。本モデルを用いて個体群レベルでの影響評価を実施し、種の感受性分布(SSD)の解析結果と比較することにより、個体レベルでの急性毒性試験データを用いて行われるSSD解析の結果について、個体群レベルの観点から意義付けを行うこととした。実際の河川水中では多種多様な農薬が低濃度で同時に検出されるため、それらの組み合わせによる複合影響を評価することが必要である。しかし、この組み合わせは無限にあるため、実験的なアプローチでは適切な評価が困難であった。そこで、既存の複合影響予測モデルを用い、複数の農薬曝露による累積リスクを考慮したSSDの解析手法の開発を行うこととした。前述のPADDY-Largeモデルによる曝露評価法と、SSDによる影響評価法を活用し、特定の地域における農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価する手法の開発を行うこととした。これにより、農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果を相互に比較し、地域性を考慮した農薬の適切な管理対策の提示を行うこととした。

3. 研究開発の方法

(1) GISを活用した地域レベルでの曝露評価法の開発

河川における水稲用農薬の残留実態を把握するためのモニタリング調査によれば、田植え期の前後にまとめて広範囲に使用される除草剤などが高頻度で検出されている。河川流域における農薬の検出状況は、流域内における農薬の使用実態に加え、水田率(流域面積に占める水田面積の割合)や土壌の特性などの流域特性により大きく変動する。そこで、水稲栽培が盛んに行われている河川流域、特に、水田からの排水が直接流入する支流域の小河川を対象とした農薬挙動予測モデルを開発した。

河川流域における農薬濃度を精度良く予測するため、国土交通省の国土数値情報により河川の流域特性に関する情報(流域界、土地利用、河川流路および流路延長など)を入手し、地理情報システム(GIS)により解析した。また、個々の水田からの排水が河川に流入する地点を特定するため、最短距離解析による河川流路と水田面積の関連づけを行った。さらに、流域内の水田土壌について、1/50000デジタル農耕地土壌図による土壌統群別のデータを用い、前述の国土数値情報の流域界および土地利用データと重ね合わせることで、各支流域における土壌統群別の水田面積を明らかにした。

これらの流域特性に関する情報や農薬使用条件(散布日、散布面積等)を反映させ、実際の河川における農薬の挙動を精緻に予測する農薬挙動予測モデル(GIS結合型PADDY-Largeモデル)を開発した。また、モデルの入力パラメータの不確実性による計算結果(河川水中農薬濃度)の変動性を定量的に解析するために、モンテカルロ法を導入した予測手法を開発した。さらに、開発したモデルの有効性を検証するため、水稲栽培地域を流下する河川を対象とした農薬モニタリングを流域特性の異なる3河川(茨城県桜川、長野県千曲川支流の広井川、滋賀県白鳥川支流の藤間川)で行い、河川水中農薬濃度のモデルによる計算値とモニタリングによる実測値と比較した。

(2) 河川生態系の在来種を用いた新たな毒性試験法の開発

わが国の河川において、生態学的にも水産動物の餌震源としても重要な水生昆虫であるコガタシマトビケラ *Cheumatopsyche brevilineata* の1齢幼虫を用いて、水生動物に対する毒性データの少ない5種類の殺虫剤(エチプロール、スピノサド、ピリプロキシフェン、メトキシフェノジド、クロラントリニプロール)の急性毒性試験を実施し、得られた毒性データを既存の試験生物種であるオオミジンコのデータと比較することで、コガタシマトビケラの試験生物としての有用性を検討した。

水生昆虫の生活史を考慮した毒性評価を行うため、コガタシマトビケラの初期成長段階別毒性試験法を開発した。まず、卵期の急性毒性試験法を確立するため、曝露期間と曝露のタイミングについて検討を行った。曝露期間は産卵1日後のE1期から2, 4, 6, 8日間に設定した。曝露のタイミングについては、産卵1日後(E1期)、4日後(E4期)、7日後(E7期)から2日間曝露して感受性の違いを調べた。コガタシマトビケラ卵が殺虫剤の種類によってどのような応答を示すのか明らかにするため、神経系に作用するものや昆虫成長制御剤など幅広い作用機作の殺虫剤(カルボスルファン、エトフェンブロックス、ピリプロキシフェン、ブプロフェジン、テブフェノジド、クロラントリニプロール)を供試した。曝露期間、曝露濃度、死亡率の関係についてはcomplementary log-log(CLL)モデルを用いて解析した。次に、1齢幼虫から2齢幼虫、および2齢幼虫から3齢幼虫にかけての脱皮期に着目した脱皮期毒性試験法の検討を行った。

水生昆虫の成長に伴う感受性の変動と、農薬の一時的な曝露からの回復性を考慮した個体群レベルでの影響評価を行うため、コガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを構築した。まず、室内成長試験を実施し生活史パラメータを明らかにした。生活史パラメータから推移行列パラメータを算出し、レフコビッチ推移行列による室内個体群動態モデルを構築した。このモデルに密度依存性および急性毒性試験から得られた濃度-反応曲線の関数を組み込むことにより、農薬の一時的な曝露により減少した個体数がどのように回復するのかをシミュレ

ーションし、個体群レベルでの影響評価を行った。評価した殺虫剤は、作用機作の異なるフェニトロチオン、イミダクロプリド、クロラントラニリプロールの3剤を用いた。

河川在来の付着藻類群集を代表する試験生物種として、わが国の河川生態系に幅広く分布し、実際の種構成を反映した5種を選定した。また、これらの付着藻類に対する毒性データを効率的に得るための新しい毒性試験法を開発した。新たな試験法は、OECDで定められている試験ガイドライン(藻類生長阻害試験)を、付着藻類に適合するように改変したものである。培養容器を従来の三角フラスコから96穴透明マイクロプレートに変更し、藻類が持つ光合成色素の自家蛍光を蛍光プレートリーダーにより測定し、藻類の生物量の指標とすることが特徴である。本試験法を用いて、20種類の除草剤を用いて5種類の付着藻類に対する毒性試験を行い、感受性の特性を調べた。

また、実際の河川水中で見られる農薬の一過性の曝露からの回復性を評価するため、付着藻類の毒性試験による農薬曝露の後に、清浄な培地に移して回復性の評価を行う試験法を新たに開発した。なお、一時的な影響からの回復は藻類細胞の生理状態に依存するため、生理状態を測定する方法を検討した。

複合影響については、各種農薬を複数組み合わせ合わせた複合毒性試験を実施し、複合毒性をモデルにより予測する手法を開発した。複合毒性試験は、5種の付着藻類を用いて、各種除草剤を5種類組み合わせ合わせた試験系を2種類(作用機作が同じ除草剤を混合した場合と、作用機作が異なる除草剤を混合した場合)作成して実施した。既存の2つのモデル(作用機作が同じ農薬の複合影響は、毒性値で重み付けした農薬濃度を足し算するConcentration-Additive(CA)モデルと、作用機作が異なる農薬の複合影響は、それぞれの影響が独立に起こると仮定して影響率をかけ算するResponse-Additive(RA)モデル)を用い、前述の複合毒性試験結果と本モデルによる推定結果を比較した。

(3) 確率論を導入した農薬の生物多様性影響評価法の開発

種の感受性分布(species sensitivity distribution, SSD)とは、様々な生物種に対する個別の毒性試験結果を用いて統計学的な解析を行い、農薬濃度と影響を受ける生物種の割合とを関数化するものである。欧米において、SSDは基準値設定の根拠や生態リスク評価を行う際に幅広く用いられている。このSSDを用いることで、最終的に生態リスクは影響を受ける種の割合(Potentially Affected Fraction, PAF)として表現され、生物多様性の劣化指標とみなすことができる。ただし、この解析のためには多種類の毒性データが必要(高感受性のグループ内で最低5種類以上)となり、データが不足している農薬に適用できない問題があった。そこで、種間の感受性差は農薬の作用機作に特徴的であるという知見をもとに、緑藻の標準種*Pseudokirchneriella subcapitata*のEC₅₀値と作用機作の情報からSSDを推定する手法を開発した。

SSDは中央値(対数平均値)と傾き(対数標準偏差値)の2つのパラメータにより決定される。ここで、作用機作が同じ除草剤のSSDは平行であると仮定した。すなわち、作用機作ごとにSSDの傾きは一定の値をとり、SSDの中央値は緑藻標準種のEC₅₀値と直線関係にある、という仮定を用いた。この仮説を検証するため、92剤の除草剤を作用機作ごとに分類し、一元配置分散分析によってSSDの傾きが作用機作ごとに有意な差があるかどうかを検定した。また、緑藻標準種のEC₅₀値はSSDの中央値と有意な直線関係にあり、SSDの傾きとは有意な関係がないことを、作用機作ごとに検定した。

実際の河川水中では多種多様な農薬が低濃度で同時に検出されるため、それらの組み合わせによる累積リスクを評価することが必要である。そこで、SSDを用いた生態リスク評価法を改良し、複数の農薬に曝露された場合の累積リスクを計算する方法を開発した。これは、単一種の複合影響予測モデルとして開発された既存のモデル(CAモデルとRAモデル)を、同様の手順で複数の生物種に対する影響を評価するSSDに適用するものである。最終的に生態リスクは影響を受ける種の割合(PAF)により定量的に表現される。サブテーマ(2)で開発した5種類の付着藻類の毒性試験法による複合毒性試験を実施し、その結果とモデルによる予測結果の比較を行い、モデルの妥当性を検証した。

(4) 生物多様性を対象とした地域レベルでの農薬のリスク指標の開発

サブテーマ(1)で開発したPADDY-Largeモデルを用いて対象流域における河川水中濃度を計算し、最高濃度の流域内分布(超過確率曲線)を求めることにより、ある濃度を超過する地点が流域全体でどの程度の割合を占めるのかを把握した。得られた最高濃度の超過確率曲線と、サブテーマ(3)で解析した種の感受性分布(SSD)とを重ね合わせることで、二つの曲線の重なる部分の大きさがリスクの程度として表現される。次に、二つの曲線の重なる部分に対応した最高濃度の超過確率と影響を受ける種の割合(PAF)との関係を示す曲線を求めた。これは、ある割合の生物種に影響を及ぼすとされる農薬濃度の超過確率を示している。さらに、曲線の下面積を算出することにより、影響を受ける種の割合の期待値(Expected PAF、以下EPAF)として指標化した。

EPAFによる評価手法を活用し、特定の地域において水稻一作期間で使用される複数農薬の累積リスクを評

価する手法の開発を行った。対象流域において、水稻栽培における慣行の防除体系や、化学合成農薬と化学肥料の双方を慣行レベルに比べて5割以上減らして栽培された特別栽培での防除体系を把握し、各防除体系での農薬使用に伴う河川水中濃度を推定した。また、慣行栽培において農薬流出防止対策の導入によるリスクの低減効果を評価するため、水田における水管理や畦塗りを徹底した場合の河川水中濃度を同様に計算した。PADDY-Largeモデルを用い、流域内の河川を250 mごとに分割し、各河川セグメントにおける農薬濃度を計算した。各防除体系で使用される複数農薬による累積リスクは、前述の農薬濃度の計算結果から、サブテーマ(3)で開発したCA-RA混合モデルを用いた手法(魚類、節足動物および藻類について、「複数農薬により影響を受ける種の割合(msPAF)」をそれぞれ計算し、その平均値である「水圏生態系全体における影響を受ける種の割合(Overall PAF)」を求める)により、セグメントごとのOverall PAFを計算した。また、流域内での平均的なリスクを算定するため、各セグメントのOverall PAFの平均値を指標とする期待影響割合(Expected Overall PAF, EPAF)を推定した。

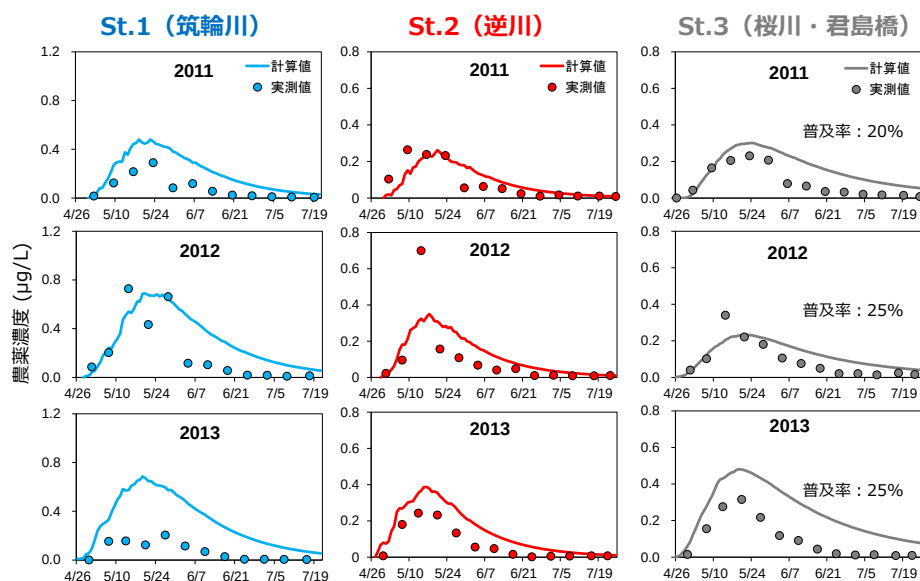
4. 結果及び考察

(1) GISを活用した地域レベルでの曝露評価法の開発

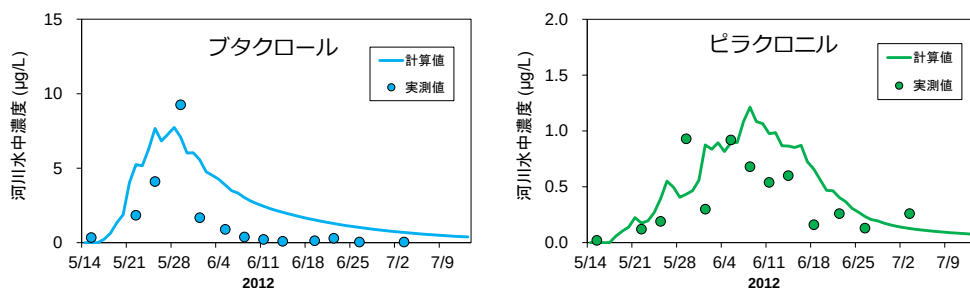
流域特性の異なる3流域(茨城県桜川、長野県千曲川支流の広井川、滋賀県白鳥川支流の藤間川)について、GISにより流域特性を解析した結果、水田率は桜川流域で28%、広井川流域で38%、藤間川流域で41%であった。250 mごとの河川セグメントに関連づけた水田面積の推定結果によると、水田の分布状況は支流域間で異なるとともに、支流域内でも一様ではなかった。1/50000デジタル農耕地土壌図による解析の結果、桜川本流沿いにある水田の大部分は、灰色低地土であり、上流部に一部グライ土が見られた。一方、中流西部の台地上には多湿黒ボク土と黒ボクグライ土が多く分布していた。広井川流域ではグライ土または灰色低地土が、藤間川流域では灰色低地土が分布していた。以上により、水田率や土壌の特性は流域により大きく異なり、これらの情報を適切に反映した農薬挙動予測モデルの必要性が示唆された。

前述の3流域における農薬モニタリングを行った結果、水稻栽培地域を流下する河川では、除草剤の使用時期を反映した検出ピークが見られることが確認された。一方、殺虫剤、殺菌剤についても各農薬の使用時期に対応すると考えられる濃度の上昇が確認されたが、除草剤に比べて検出濃度は低い傾向であった。この理由として、水田雑草の発生消長は毎年ほぼ同様であるため、各種除草剤が体系的に広く使用されるのに対し、殺虫、殺菌剤は、病害虫の発生時期に応じて流域内で局所的に集中して使用されることにあると考えられた。桜川本流における3年間の除草剤の検出状況は、ほぼ同様のパターンを示したが、流域面積の小さい支流域では、地域や年度によりバラツキが大きいことが示された。

前述の流域特性に関する情報や農薬使用条件を反映させたGIS結合型PADDY-Largeモデルを開発し、3流域における農薬モニタリング結果を用いて検証を行った。桜川流域における河川水中農薬濃度の計算値と実測値を比較した結果、本流では農薬濃度の計算値は実測値とよく一致したが、流域面積の小さい支川では計算値と実測値との間で一部解離が見られた(図(1)-1)。この理由として、モデル計算における農薬の使用量は、茨城県内出荷量を基に流域内で均一に散布されとした場合の予測結果であるが、実際の農薬使用は地域や年度により大きく変動することに起因するものと推察された。長野県広井川、滋賀県藤間川においても農薬濃度の実測値とモデルによる計算値を比較した。これらの流域においては、農薬の使用実態に関する詳細な情報が得られたため、これらの情報を反映させたモデルによる計算値は実測値の濃度レベルや検出期間を精度良く予測できることが示された(図(1)-2)。



図(1)-1 除草剤ペンシルフロメチルの河川水中濃度の計算値と実測値の比較(2011~2013年)



図(1)-2 2種類の除草剤の河川水中濃度の計算値と実測値の比較(広井川、2012年)

開発したPADDY-Largeモデルの感度分析を行い、河川水中農薬濃度の計算値に大きく影響を及ぼす入力パラメータを特定した。物理化学性の異なる4種類の除草剤(モリネート、ダイムロン、メフェナセット、シメトリン)を対象とした感度分析の結果、農薬の普及率、水稻作付面積および河川流量が、河川水中最高濃度に対し最も感度の高いパラメータであることが示された。感度分析の結果を踏まえ、入力パラメータの変動性を表現するための確率分布を設定し、その分布に従って値をランダムに発生させ、PADDY-Largeモデルにより河川水中農薬濃度の計算を1000回繰り返して行った。除草剤ダイムロンの河川水中濃度(最高濃度)の5%タイル値、中央値、および95%タイル値は、それぞれ1.73、3.15、および5.49 $\mu\text{g/L}$ であった。2011、2012および2013年の最高濃度の実測値は、それぞれ1.09、2.22および1.07 $\mu\text{g/L}$ であり、モンテカルロ・シミュレーションによる濃度の確率分布と比較すると、最高濃度の実測値は20%タイル未満に位置づけられた。以上により、入力パラメータの不確実性を考慮したモンテカルロ・シミュレーションにより、農薬濃度の年次変動を考慮した曝露濃度の推定が可能となった。

(2) 河川生態系の在来種を用いた新たな毒性試験法の開発

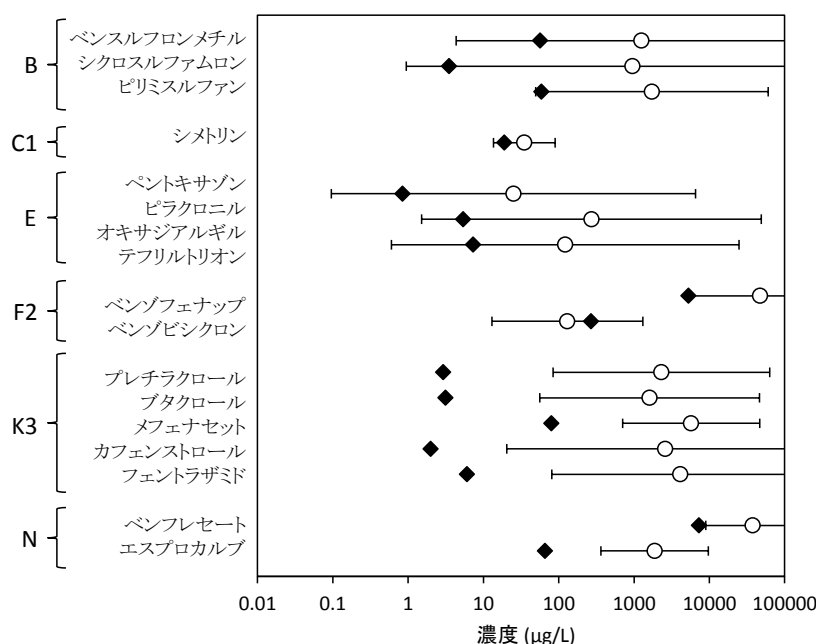
5剤の殺虫剤についてコガタシマトビケラ1齢幼虫に対する感受性を調べた結果、エチプロールとスピノサドにおいて、既存の試験生物種であるオオミジンコに比べてトビケラの方が1000倍以上も感受性が高かった。一方メトキシフェノジドとクロラントラニプロールではトビケラの方が低感受性で、ピリプロキシフェンでは同程度の感受性を示した。コガタシマトビケラは殺虫剤に対してオオミジンコとは異なる感受性を示し、わが国の河川生態系における殺虫剤感受性の種間差を適切に把握する上で、有用な試験生物であることが示唆された。

殺虫剤のカルボスルファン、エトフェンプロックス、ブプロフェジンについて卵期における曝露期間と毒性の関係をCLLモデルで調べた結果、神経系に作用するカルボスルファンとエトフェンプロックスでは曝露期間が長いほど毒性影響は大きくなったが、ブプロフェジンでは曝露期間と毒性に関連は見られなかった。曝露のタイミングを検討した結果、殺虫剤の作用機作によって高感受性の発生段階が異なることが判明した。ブプロフェジンの曝露期間と毒性との間に関連がみられなかったのは、E1期の感受性が最も高かったためであり、卵期の毒性評価では、曝露期間よりも殺虫剤の作用機作に依存した曝露のタイミング(作用点の形成時期)が重要であることが示された。曝露期間を2日間に固定し、少なくともE1、E4、E7期の3つの発生段階で試験を行うことにより、効率的かつ適切に卵期の毒性評価を行うことができると考えられる。昆虫成長制御剤メトキシフェノジドについて、脱皮期における毒性試験を実施したが、毒性影響は観察されなかった。しかし、試験期間中の対照区で高い脱皮率が得られ、試験法自体は的確に脱皮期を捉えていることから、作用機作の異なるその他の昆虫成長制御剤の毒性評価に対し本試験法を適用することが可能であると考えられた。

室内成長試験より得られた生活史パラメータに基づいて構築したコガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを解析した結果、ミジンコやユスリカに比べてトビケラの個体群増殖率 λ は10分の1程度と小さく、増殖が遅い、つまり回復性が小さい生物であることが判明した。このような増殖特性をもつコガタシマトビケラについて、開発したモデルを用い個体群閾値濃度(個体群が存続可能な最大曝露濃度)をエンドポイントとして個体群の影響の受けやすさ(感受性)を評価した結果、個体群の感受性は、殺虫剤の作用機作、成長に伴う感受性変動のパターンの違い、個体群の大きさ(個体密度)、個体群の年齢組成等の要因により変動することが示唆された。また、個体群閾値濃度とSSD解析結果を比較することにより、SSD解析について個体群レベルの観点から意義付けすることが可能となった。

わが国の河川に在来する付着藻類群集を代表する試験生物種として、以下の5種を選定した。緑藻1種(*Desmodesmus subspicatus*)、珪藻3種(*Achnanthes minutissimum*、*Nitzschia palea*、*Navicula pelliculosa*)、シアノバクテリア1種(*Pseudanabaena galeata*)。これらの種は新たに開発した毒性試験法に適合し、公的系統保存施設より入手可能なものである。開発した試験法の詳細をマニュアルに取りまとめ、農業環境技術研究所のウェブサイト(<http://www.niaes.affrc.go.jp/techdoc/algae/index.html>)から、本マニュアルの電子ファイル(PDF)を入手できるようにした。

本試験法により、わが国の河川一次生産者に対する毒性データを効率的に整備することが可能となった。20種類の除草剤を用いて5種類の付着藻類に対する毒性試験を行ったところ、除草剤の作用機作によって感受性の高い藻類種は明確に異なり、藻類種間の感受性差も作用機作によっては1000倍から10000倍にもなることが判明した(図(2)-1)。これは、現在のリスク評価で用いられている単一種の藻類に対する毒性値のみでは、リスクを適切に評価できないことを示しており、本試験法の活用が有効なアプローチと考えられる。



図(2)-1 16種類の除草剤の種の感受性分布(○とそのバーはSSDの50パーセンタイル値とその信頼区間(5-95パーセンタイル値)、◆は標準緑藻の EC_{50} 値を示し、除草剤名についている記号は作用機作のグルーピングを示している。なお、試験を実施した20種類の除草剤のうち、4種類は毒性が定量化できなかった。)

藻類細胞の生理状態を把握するための、マイクロプレートを用いた測定が可能な技術として、(1)生細胞数を評価対象とするATP発光の測定、(2)死細胞数を評価対象とするCellTox-Green蛍光の測定、(3)光合成活性を評価対象とするDCMU(PSII阻害剤)添加によるクロロフィル蛍光の増加量、の3つの適用可能性を調べた。その結果、光合成活性を測定する方法が最も感度が高く、藻類の回復性と良好な関係を得ることができた。この結果を踏まえ、新たに開発したマイクロプレートを用いた珪藻の回復性試験法では、48時間の毒性試験と、その後48時間の回復性試験を行い、その間の光合成活性の経時変化を評価することとした。以上により、光合成活性の回復の早さから、実際の藻類の回復性を予測するモデルを開発することが可能となる。

既存のCAモデルとRAモデルを用い、複合影響の予測結果と実際の試験結果を比較した。その結果、作用機作が同じ場合にはCAモデルの予測精度が良好であり、作用機作が異なる場合にはRAモデルの予測精度が良好であった。この結果は既存の知見と一致するものであり、低濃度多種類の複合影響は加算的である、というファンネル仮説(個々の組み合わせで相乗や拮抗効果が起こる一方で、その組み合わせが多いためにそれらが互いに相殺されて、見かけ上加算的な影響に近づいていく)を支持するものである。

(3)確率論を導入した農薬の生物多様性影響評価法の開発

SSD推定法の検証について、SSDの傾きは作用機作ごとに有意な差がある($P<0.001$)という結果が得られ、作用機作からの推定が可能であることが示された。作用機作ごとに、緑藻標準種の EC_{50} 値はSSDの中央値と有意な相関関係($P<0.05$)が見られたが、SSDの傾きとは有意な関係がなかった($P>0.05$)。以上の結果から、除草剤の作用機作ごとに解析した緑藻標準種の EC_{50} 値とSSDの中央値との回帰式および、作用機作ごとのSSDの傾きの平均値により、毒性データの少ない除草剤のSSDが推定できることが示唆された。開発したSSD推定方法を用いて、日本の水稲用除草剤12種のSSDパラメータ(中央値と傾き)を緑藻標準種の EC_{50} 値から推定し、さらに文献等より収集した毒性データから解析したSSDパラメータと比較を行った。推定されたSSDパラメータは、全毒性データを用いて解析した値と概ね一致しており、開発したSSD推定手法の有効性が確認された。この推定方法を用いることで、得られる毒性データの数が不十分な農薬についても、SSDを用いた生態リスク評価を行うことができるようになる。

累積リスクの評価方法の開発については、実際に行った5種類の藻類の複合毒性試験の結果からPAFを計算し、モデルによる予測結果と比較した。単一種に対する複合影響を予測する場合と同様に、作用機作が同じ場合にはCAモデルの予測精度が良好であり、作用機作が異なる場合には、RAモデルの予測精度が良好であった。SSDを用いた、複数の農薬による影響を受ける種の割合($msPAF$)の計算においても、CAとRAモデルが適用可能であることを示すことができた。ここで、例として6種類の農薬の使用を想定した累積リスクの計算方法を示す(図3-1)。まず、作用機作 (Mode of Action, MoA) 1の農薬a, b, cの累積リスク(PAF_{MoA1})と、作用機作2の農薬d, eの累積リスク(PAF_{MoA2})を、それぞれの農薬のSSDからCAモデルで計算する。次に、 PAF_{MoA1} 、 PAF_{MoA2} と農薬fの影響率(PAF_{MoA3})から、RAモデルによって $msPAF$ (複数農薬によって影響を受ける種の割合, multi-substance PAF)を計算する。農薬数がいくつであっても同様の方法で計算することが可能である。

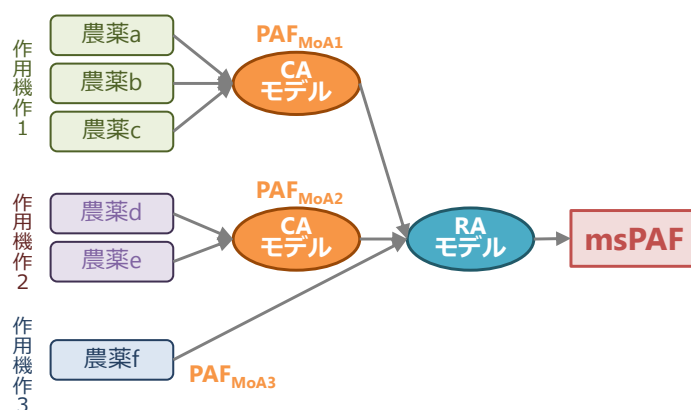
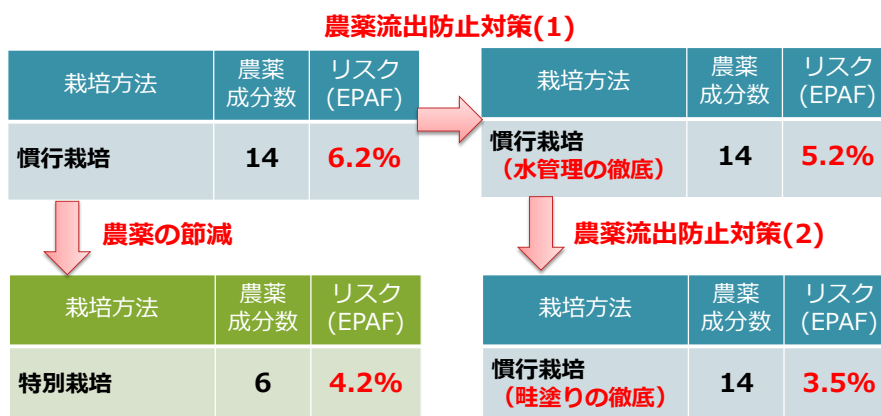


図3-1 CA-RA混合モデルによる累積リスク($msPAF$)の計算

(4) 生物多様性を対象とした地域レベルでの農薬のリスク指標の開発

GIS結合型PADDY-Largeモデルを用いて、除草剤イマゾスルフロンの桜川流域における河川水中農薬濃度を計算した。250 mごとに分割した各セグメントにおける最高濃度は0~3.51 $\mu\text{g/L}$ の範囲にあり、中央値は1.45 $\mu\text{g/L}$ であった。また、イマゾスルフロンは文献により8種類の一次生産者の毒性データが得られ、そのEC50値の対数平均値が6.70 $\mu\text{g/L}$ 、対数標準偏差が3.16であった。これらの毒性データを用いたSSDの解析結果、HC5が4.48、HC50が813、HC95が148000 $\mu\text{g/L}$ であった。得られた最高濃度の流域内分布とSSDの組み合わせにより、影響を受ける種の割合の期待値(EPAF)を算出したところ、流域内で平均的に1.8%、最大で4.3%の種が影響を受けると評価された。この指標を用いることで、地域レベルでの定量的なリスク評価が可能となった。

茨城県南部の桜川の支流である逆川流域とし、慣行および特別栽培における農薬使用に伴う生態リスクを評価した(図(4)-1)。慣行栽培でのリスク(EPAF)は6.2%であったのに対し、農薬成分数を半分以下に低減した特別栽培では、リスクは4.2%まで減少した。一方、慣行栽培において、水管理の徹底(農薬流出防止対策(1))することによるリスクは5.2%に減少し、さらに、畦塗りの徹底(農薬流出防止対策(2))により、河川への農薬流出量が大幅に減少するため、特別栽培と同程度の3.5%までリスクを低減できることが示された。以上のように、農業現場での様々な農薬使用に伴うリスクを定量的に評価することが可能となり、農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果を相互に比較することで、地域性を考慮した適切な農薬使用方法の提示が可能となった。



図(4)-1 農薬使用に伴う生態リスク評価結果(慣行および特別栽培との比較)

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- ・流域特性に関する情報をGISにより解析し、これらの情報を反映させた河川における農薬濃度予測モデル（GIS結合型PADDY-Large）を開発した。流域特性の異なる3河川の農薬モニタリング結果を用い、開発したモデルの妥当性を検証した結果、本モデルは実測濃度の推移を精度良く再現できることが示された。また、本モデルについて、入力データのバラツキに伴うモデル計算の不確実性を解析することで、対象流域における河川水中農薬濃度の年次変動を考慮した予測が可能となり、地域レベルでの曝露評価法を確立することができた。
- ・河川に在来する水生昆虫コガタシマトビケラを用いて、初期成長段階別毒性試験を開発し、成長段階や殺虫剤の作用機作の違いによって感受性が大きく変動することを明らかにした。また、コガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを構築し、成長に伴う感受性の変動や農薬の一時的曝露からの回復性を考慮した個体群レベルでの影響評価法を確立した。これらの成果は、個体レベルから個体群、群集、生態系レベルでの生態リスク評価手法の開発を促進するものであり、その科学的意義は大きい。
- ・従来法では毒性試験の実施が困難であった河川在来の付着藻類について、96穴マイクロプレートと蛍光プレートリーダーを用いた試験方法に適用しうる試験生物種5種を選定し、5種類の付着藻類に対し同時に実施可能な毒性試験法を開発した。これにより、種の感受性分布の解析に必要とされる毒性データを効率的に蓄積することが可能となった。
- ・実際の河川水中で見られる多種多様な農薬の低濃度曝露による複合影響について、既存の知見とおり作用機作の同じ農薬の場合はConcentration-Additive(CA)モデル、作用機作の異なる農薬の場合はResponse Additive(RA)モデルで予測可能であることが明らかとなった。
- ・種の感受性分布(SSD)の解析を行うためには、複数の生物種に対する毒性データが必要とされているが、多くの農薬ではデータ不足のためSSDの活用ができないのが実情である。本研究では、SSDの形状と除草剤の作用機作との関係を明らかにし、毒性データが不足する場合の除草剤のSSD推定方法を開発した。また、本推定結果が実際の感受性分布とおおむね一致することを確認した。推定の不確実性が定量化できるため、リスク評価の際の信頼性も担保可能となった。本手法は、殺虫剤など他の農薬にも適用しうる。
- ・SSDを用いた多種系の評価の場合においても、単独種の場合と同様に既存の複合影響予測モデルが適用可能であることを明らかにした。これは、過去に同様の報告例はなく画期的な成果である。これにより、複数の農薬の使用からなる様々な防除体系ごとの生態リスクの比較を可能とした。
- ・特定の地域における農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価する手法を開発した。これまでは評価不能であった農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果について、開発した評価手法を活用することで、リスクの大きさを相互に比較することが可能となり、地域性を考慮した農薬の適切な管理対策の提示が可能となった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- ・環境省の中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会において、水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準値の超過が懸念される農薬に対し、河川におけるモニタリングの必要性が指摘されているが、本研究で開発した「GISを活用した地域レベルでの曝露評価法」を活用し、河川水中農薬濃度が高くなる流域を提示することにより、環境省が実施する平成25および26年度水質農薬残留調査の計画策定に貢献した。
- ・平成26年2月5日開催の平成25年度水産動植物登録保留基準設定検討会委員等による勉強会において、サブテーマ(2)で開発した水生昆虫コガタシマトビケラの成長段階別毒性試験法および付着藻類の毒性試験法、さらにサブテーマ(3)で開発した種の感受性分布(SSD)を用いた影響評価法について報告し、現行の評価手法では対応が困難な農薬について、感受性の種間差を適切に反映した評価が可能な手法として提示した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ・本研究では、国土交通省の国土数値情報より土地利用や流域界などに関する情報を入手し、地理情報システム(GIS)により河川流域ごとの水田面積を解析する手法を開発した。本手法により全国の河川流域における水田率を把握し、各河川の流量データと合わせて「流域Index=水田率/比流量」を比較することで、河川水中農薬濃度が相対的に高くなる流域を推定することが可能となり、今後、環境省が実施する農薬モニタリングを行う際に適切な調査地点を選定できる。
- ・農薬等化学物質の生物に対する感受性は成長に伴い変動する。本研究で開発した水生昆虫の成長段階別

毒性試験法を用いることにより、成長に伴う感受性変動を把握し、既存のテストガイドラインでは急性毒性評価が難しいとされてきた昆虫成長制御剤を含む様々な殺虫剤について、水生昆虫に対する毒性を適切に評価できる。

- ・わが国の河川生態系の一次生産者として優占する付着藻類の代表種5種を選定し、これらの毒性データを効率的に得るための新たな毒性試験法を開発するとともに、詳細をマニュアルにまとめて公開した。現在使用されている標準の藻類種とは異なる感受性が得られるため、本試験法の活用により生態リスクをより適切に評価することができる。
- ・種の感受性分布を用いた生態リスク評価法を改良し、複数の農薬に曝露された場合の累積リスクを計算する方法を開発した。これは、実際の河川水中で見られる多種多様な農薬の低濃度曝露による生物多様性に対する複合影響を評価するのに有用である。
- ・農業の現場において農薬の適切なリスク管理を行うためには、各種の管理対策によるリスク低減効果を把握する必要がある。本研究で開発した農薬使用に伴う生態リスクの定量的評価手法により、農薬の節減、使用農薬の変更、農薬流出防止技術の導入などによるリスク低減効果を相互に比較することで、地域性を考慮した適切な農薬の管理対策を選定することが可能となる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) N. IWASAKI, K. INAO, T. IWAFUNE, T. HORIO, H. OBARA: *Limnology*, 13, 221–235 (2012)
“Coupling of the PADDY–Large model with geospatial information for predicting paddy pesticide behavior in river basins”
- 2) T. NAGAI and A. YOKOYAMA: *Journal of Pesticide Science*, 37, 233–239 (2012)
“Comparison of ecological risks of insecticides for nursery–box application using species sensitivity distribution”
- 3) T. NAGAI, K. TAYA, H. ANNOH and S. ISHIHARA: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 37–44 (2013)
“Application of a fluorometric microplate algal toxicity assays for riverine periphytic algal species”
- 4) T. NAGAI: *Human and Ecological Risk Assessment*, 20(3), 641–657 (2014)
“Algal population growth model integrated with toxicokinetics for ecological risk assessment under time–varying pesticide exposure”
- 5) 稲生圭哉、永井孝志、岩崎亘典: *環境科学会誌* (2014) (印刷中)
「農薬の定量的生態リスク評価における動態予測モデルの活用」

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 稲生圭哉、永井孝志、堀尾 剛、岩崎亘典、横山淳史: 日本農薬学会第37回大会 (2012)
「PADDY–Largeモデルによる水稻用農薬を対象とした河川水中濃度の不確実性解析」
- 2) 永井孝志、横山淳史: 日本農薬学会第37回大会 (2012)
「種の感受性分布法を用いた育苗箱施用殺虫剤の生態リスク比較」
- 3) 永井孝志: 第56回日本応用動物昆虫学会大会 (2012)
「統計学的手法を用いた育苗箱施用殺虫剤の生態リスク評価」
- 4) N. IWASAKI, K. INAO, T. IWAFUNE, H. OBARA: SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Development of the PADDY–Large model linked with GIS for predicting paddy pesticide behavior in river basins”
- 5) A. YOKOYAMA, T. NAGAI and T. HORIO: SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Acute toxicity of some insecticides to eggs of a net–spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata*”
- 6) T. NAGAI, K. TAYA, A. YOKOYAMA and S. ISHIHARA: SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Development of high–throughput and multi–species algal toxicity assay for probabilistic ecological risk assessment of pesticides”
- 7) 横山淳史: 日本農薬学会第37回大会 (2012)
「河川水生昆虫に対する農薬の影響に関する研究」
- 8) 堀尾剛、稲生圭哉、岩崎亘典、横山淳史、永井孝志、依田育子: 日本農薬学会第38回大会 (2013)
「茨城県桜川流域における水稻用農薬の挙動 一本流および支流における水中濃度の比較」
- 9) 永井孝志、安納弘親: 日本農薬学会第38回大会 (2013)

「藻類生長阻害試験の統計解析方法：RExcelで行う非線形回帰分析」

10) 稲生圭哉：環境科学会2013年会（2013）

「農薬の水域生態リスク評価における動態予測モデルの活用と今後の課題」

11) 横山淳史、依田育子：第31回農薬環境科学会（2013）

「水生昆虫コガタシマトビケラの卵に対する殺虫剤の毒性評価－曝露期間と曝露のタイミングによる影響の違いについて－」

12) 永井孝志：第19回日本環境毒性学会研究発表会企画シンポジウム（2013）

「情報基盤としての農薬インベントリーとその出口としての生態リスク評価」

13) 永井孝志、多屋清志、依田育子：日本陸水学会第78回大会（2013）

「蛍光マイクロプレートアッセイを用いた各種除草剤に対する河川付着藻類の感受性差の評価」

14) 岩崎亘典：農業環境技術研究所 第4回農業環境インベントリー研究会（2014）

「地理空間に関するオープンデータの現状と暴露評価への活用」

15) 永井孝志：農業環境技術研究所 第4回農業環境インベントリー研究会（2014）

「農薬インベントリーを構成する様々なデータベースの構築と生態リスク評価への活用」

16) 稲生圭哉、堀尾 剛、岩崎亘典、横山淳史、永井孝志、依田育子：日本農薬学会第39回大会（2014）

「PADDY-Large モデルを用いた茨城県桜川流域での水稲用農薬の動態予測－流域内における農薬濃度の変動性とモデルによる予測精度－」

7. 研究者略歴

課題代表者：稲生 圭哉

関西大学工学部卒業、農学博士、現在、(独)農業環境技術研究所主任研究員

研究分担者

1) 堀尾 剛

北海道大学農学部卒業、農学博士、現在、(独)農業環境技術研究所主任研究員

2) 岩崎 亘典

東京都立大学理学部卒業、理学博士、現在、(独)農業環境技術研究所主任研究員

3) 横山 淳史

信州大学理学部卒業、理学博士、現在、(独)農業環境技術研究所主任研究員

4) 永井 孝志

筑波大学生物学類卒業、理学博士、現在、(独)農業環境技術研究所主任研究員

5C-1102 適切なリスク管理対策の選択を可能にする農薬の定量的リスク評価法の開発**(1) GISを活用した地域レベルでの曝露評価法の開発**

(独) 農業環境技術研究所

農業環境インベントリーセンター

有機化学物質研究領域

生態系計測研究領域

稲生 圭哉

堀尾 剛

岩崎 亘典

平成23～25年度累計予算額：32,625千円

(うち、平成25年度予算額：11,845千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

河川における水稻用農薬の残留実態を把握するためのモニタリング調査によれば、田植え期の前後にまとまって広範囲に使用される除草剤などが高頻度で検出されている。従って、農業生産現場において、このような水稻用農薬の河川生態系を対象とした適切なリスク管理を行うためには、地域特性や農薬の使用条件などを考慮し、一作期を通した河川における農薬の濃度レベル、検出期間およびこれらの変動性を適切に把握するための曝露評価法の開発が求められる。本研究では、水稻栽培が盛んに行われている河川流域、特に、水田からの排水が直接流入する支流の小河川を対象とした農薬挙動予測モデルを開発し、水生生物に対する農薬の曝露濃度の推定に活用することを目的とした。河川流域における農薬濃度を精度良く予測するため、流域特性に関する情報（流域界、水田面積、河川流路および流路延長、土壌の種類等）をGISにより解析し、これらの情報を反映させた農薬挙動予測モデル（GIS結合型PADDY-Largeモデル）を開発した。また、モデルの入力パラメータの不確実性による計算結果（河川水中農薬濃度）の変動性を定量的に解析するために、モンテカルロ法を導入した予測手法を開発した。さらに、開発したモデルの妥当性を検証するため、流域特性の異なる3河川において農薬モニタリングを行った。モニタリング結果による農薬濃度の実測値とモデルによる計算値を比較した結果、本モデルは実測濃度の推移を精度良く再現できることが示された。また、本モデルについて、入力データのバラツキに伴うモデル計算の不確実性を解析することで、対象流域における河川水中農薬濃度の年次変動を考慮した予測が可能となり、地域レベルでの曝露評価法を構築することができた。

[キーワード]

数理モデル、GIS、流域特性、河川モニタリング、曝露濃度

1. はじめに

農耕地等で使用される農薬成分の大部分は土壌に達し、土壌中を移動・拡散しながらしだいに分解するが、その一部が水系などへ移行した場合、飲料水源の汚染や生態系への悪影響が懸念される。このような農薬による影響を評価するためには、「農薬の毒性」と「人や生態系を構成する生物が曝露する農薬濃度」の両者を把握する必要がある。河川水中での農薬濃度を把握する手

法として、水質モニタリングが一般的に行われているが、これにはかなりの費用、時間、労力を要し、得られた結果はある特定の農薬使用および環境条件におけるデータでしかなく、農薬の環境動態およびそれを支配する要因を把握することは困難である。

このような問題に対応するため、欧米では1980年頃より農薬の物理化学性、土壌の特性、気象要因などを用いて農耕地（普通畑、樹園地など）における農薬の動態を予測する数理モデルの開発研究が進められ、農薬登録審査におけるリスク評価に活用されている^{1,2)}。しかし、わが国の主要な農耕地である水田で使用する農薬の環境動態を予測する数理モデルの開発事例は非常に少ないのが実情である。

水田では水稻栽培期間の大半を湛水状態にし、その排水が農業排水路を経由して河川に流入する。このため、水田は普通畑にくらべて農薬が表面流出しやすく、水稻を主要作物とするわが国を含むアジア諸国では、水田からの農薬流出量を予測する数理モデルの必要性は非常に高い。わが国において、河川や湖沼における水稻用農薬の残留実態を把握するためのモニタリング調査がこれまでに多数行われており、田植え期の前後にまとまって広範囲に使用される除草剤や、出穂期前に有人ヘリコプターにより空中散布される殺虫剤、殺菌剤が高頻度で検出されていることが確認されている。従って、農業生産現場において、このような水稻用農薬の河川生態系を対象とした適切なリスク管理を行うためには、地域特性や農薬の使用条件などを考慮し、一作期を通じた河川における農薬の濃度レベル、検出期間およびこれらの変動性を適切に把握するための曝露評価法の開発が求められる。

2. 研究開発目的

本研究では、水稻栽培が盛んに行われている河川流域、特に、水田からの排水が直接流入する支流の小河川を対象とした農薬挙動予測モデル（PADDY-Large）を開発し、サブテーマ（4）の「生物多様性を対象とした地域レベルでの農薬のリスク指標の開発」において、水生生物に対する農薬の曝露濃度の推定に活用することを目的とした。

河川流域における農薬の検出状況は、流域内における農薬の使用実態に加え、水田率（流域面積に占める水田面積の割合）や土壌の特性などの流域特性により大きく変動する。近年、地理情報システム（GIS）の技術が飛躍的に進歩し、土地利用や河川の河道など複雑な地理情報を容易に取り扱えるようになってきた。これに伴い、わが国でも流域レベルでの化学物質の濃度を予測する際に、GISとリンクさせた数理モデルの開発が進められている³⁻⁵⁾。そこで、河川流域での農薬濃度予測モデルに活用するためのGIS情報（流域界、水田面積、河川流路延長・流路、土壌特性等）を整備した。

これまでに開発した河川における農薬挙動予測モデルのプロトタイプ^{6,7)}に、前述の流域特性に関するGIS情報や農薬使用条件（散布日、散布面積等）を反映させ、実際の河川における農薬の挙動を精緻に予測する数理モデル（GIS結合型PADDY-Large）を開発した。また、モデルの入力パラメータの不確実性による計算結果（河川水中農薬濃度）の変動性を定量的に解析するために、モンテカルロ法を導入した予測手法を開発した。

開発したモデル計算の有効性を検証するため、水稻栽培地域を流下する河川を対象とした農薬モニタリングを流域特性の異なる3流域で行い、河川水中農薬濃度のモデルによる計算値とモニタリングによる実測値と比較した。

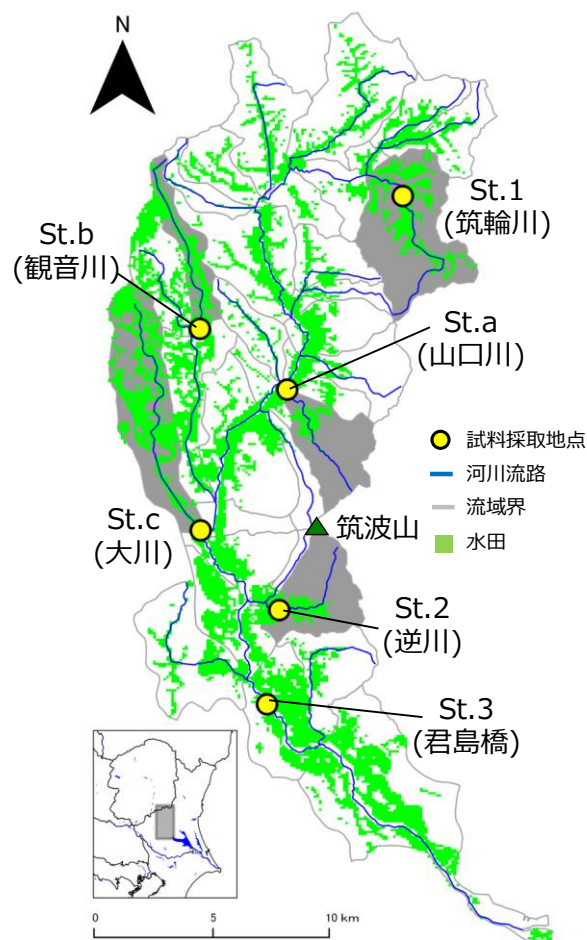
3. 研究開発方法

(1) GISによる河川の流域特性に関する情報の整備

河川流域における農薬濃度を適切に予測するためには、流域内で大きく変動する様々な特性（土地利用、土壌の理化学性など）をモデル計算に適切に反映させる必要がある。本研究では、茨城県南部の水稻栽培地域を流下する桜川を対象とし、河川流域における農薬挙動予測モデル

（PADDY-Large）の計算に必要な流域特性に関する情報（流域界、水田面積、河川流路延長・流路、土壌の種類等）をGISにより解析した。対象とする桜川流域を図(1)-1に示す。本流域は、筑波山系をなす山地、桜川本流に沿って分布する沖積低地、稲敷台地により構成され、水田は沖積低地と稲敷台地表面上に分布している。

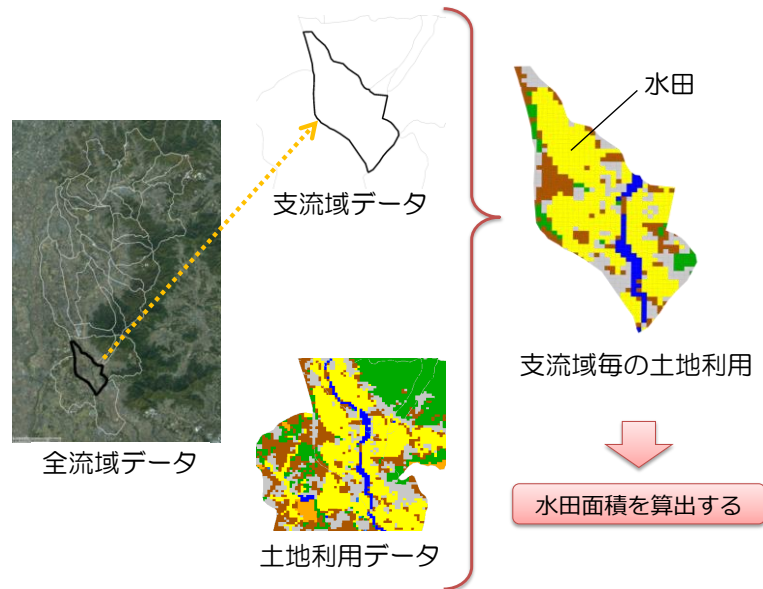
GISによる解析対象項目を表(1)-1に示す。桜川流域を含む茨城県について、国土交通省の国土数値情報ダウンロードサービス⁸⁾より、土地利用細分メッシュデータ、流域界・非集水域および流路のデータを入手した。土地利用細分メッシュデータは、最新のものが整備されているJPGIS形式を、流域界・非集水域および流路は、国土数値情報統一フォーマットを用いた。これらはそのままの形式ではGISソフトで利用できないため、shpファイル形式に変換した。変換したファイルから解析対象である桜川流域のデータを抽出し、GRASSのGISデータベースにインポートした。インポートしたデータについて、各支流域内の土地利用、土壌の種類および河川流路と水田の関係について解析を行った。支流域コードに基づき、流域および流路データを各支流域単位に分割し、分割した支流域データと土地利用細分メッシュデータのオーバーレイを行い、支流域ごとに土地利用データを分割した（図(1)-2）。



図(1)-1 桜川流域および試料採取地点

表(1)-1 GIS 解析に用いる解析項目と使用データ

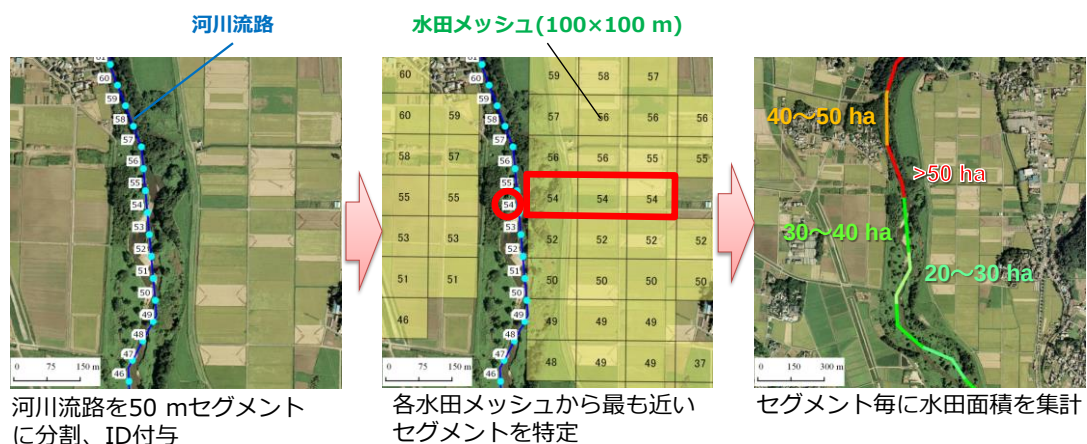
解析項目	使用データ名	出典
土地利用	土地利用細分メッシュデータ	国土数値情報(国土交通省、2007)
流域	流域界・非集水域	国土数値情報(国土交通省、2007)
河川流路	流路	国土数値情報(国土交通省、2007)
流路幅	空中写真	空中写真閲覧サービス(国土交通省、2006) および独自撮影写真
土壌統群	デジタル耕作地土壌図	デジタル耕作地土壌図(農業環境技術研究所、2009)



図(1)-2 GISによる支流域ごとの水田面積の算出方法の模式図

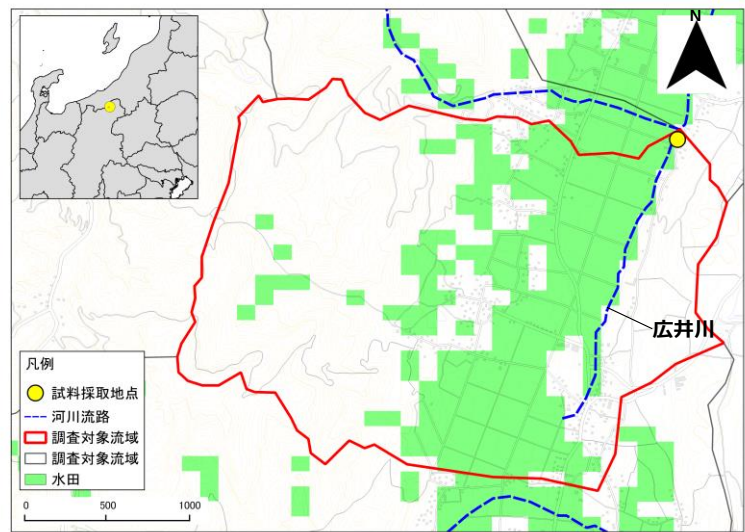
以上の情報をPADDY-Largeモデルによる計算に適切に反映させるためには、個々の水田からの排水が河川に流入する地点を特定する必要がある。そこで、最短距離解析による河川流路と水田面積の関連づけを行った（図(1)-3）。まず、河川流路データを50 mごとの線分（セグメント）に分割しIDを付与した。次に、100×100 mの個々の水田メッシュから最も近い線分を特定し、線分IDを水田メッシュデータに関連づけた。PADDY-Largeモデルでは、河川流路を250 mごとのセグメントに分割して計算するため、250 mごとに水田面積を集計した。なお、国土数値情報による土地利用は地目を表しており、実際に水稻を作付している水田を表していない。そこで、農林水産省の統計データ⁹⁾による茨城県の水稲作付面積を基に補正を行った。河川幅については、国土交通省の空中写真閲覧サービスおよび独自に撮影した空中写真を用いて、250 mごとに目視判読した。

流域内の水田土壌について、農環研が公表している1/50000デジタル農耕地土壌図¹⁰⁾による土壌統群別のデータを用い、前述の国土数値情報の流域界データおよび細密土地利用メッシュデータと重ね合わせることで、各支流域における土壌統群別の水田面積を明らかにした。



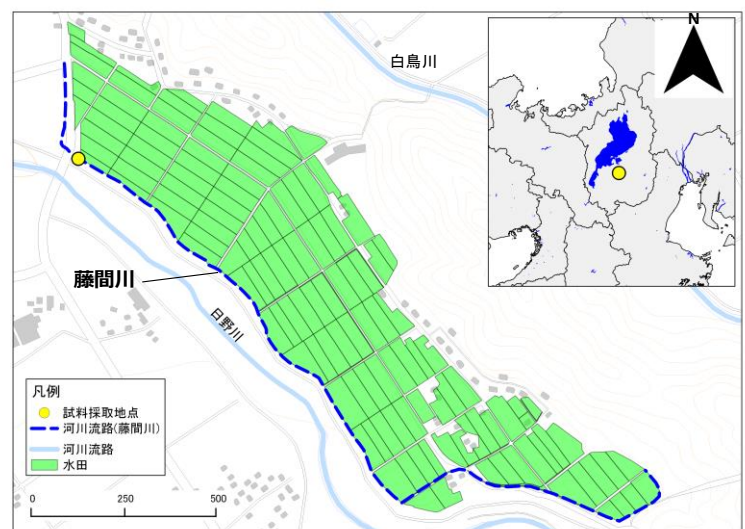
図(1)-3 最短距離解析による河川流路と水田面積の関連づけ

また、流域特性の異なる以下の2流域についても、桜川流域と同様にGISによる流域特性の解析を行った。一つの流域は、長野県北部の飯山市にある広井川（千曲川支流）を解析の対象とした（図(1)-4）。対象とした支流域の面積は約600 haで、広井川に沿って西側に水田が分布しており、これらの水田からの排水を集水する幹線排水路として機能している。個々の水田からの排水が河川に流入する地点を特定するため、前述の国土数値情報を用いた最短距離解析により河川流路と水田面積の関連づけを行った。



図(1)-4 長野県広井川流域および試料採取地点

もう一つの流域は、滋賀県中部に位置し、琵琶湖へ東岸より流入する白鳥川支流の藤間川（浄土寺・倉橋部地区）についても解析を行った（図(1)-5）。本流域は、北側を流入河川である白鳥川、南側を日野川に挟まれた地域で、流域面積は約90 haと規模の小さい流域である。藤間川に沿って北東側に水田が分布しており、これらの水田からの排水を集水する幹線排水路として機能している。藤間川はかつて日野川に流入していたが、治水工事により日野川の北東側に大規模な堤防が築かれたため、現在は独立した流域となっている。しかし、国土数値情報の流域界データでは堤防が考慮されておらず、日野川の流域に含まれている。そのため、国土数値情報のデータは本流域における特性解析に不適切であった。そこで、本流域については1/2500の国土基本図および現地調査により、河川流路と水田面積の関連づけを行った。国土基本図では、藤間川に流入する支線排水路についても流路を特定できるため、圃場一筆ごとに水田排水が流入する支線排水路を特定し、250 mごとに分割した河川セグメントに関連づけた水田面積を計算した。本手法は多少煩雑であるため、流域面積の小さい場合にしか適用できないが、前述の国土数値情報による100×100 mのメッシュデータを用いた場合に比べて精度の高い解析が可能である。



図(1)-5 滋賀県藤間川流域および試料採取地点

（２）農薬モニタリング

１）茨城県桜川流域における農薬モニタリング

河川流域における農薬挙動予測モデル（PADDY-Large）の検証に必要な水稻用農薬濃度の実測データを得るため、前述の桜川を対象とした農薬モニタリングを2011～2013年の3年間実施した（図(1)-1）。桜川は茨城県桜川市の鏡ヶ池を水源とし、霞ヶ浦に注ぐ一級河川であり、流域内では流路に沿って水田が広く分布しており、例年4月下旬から9月中旬にかけて約8割の水田で水稻栽培が行われている。本研究では、桜川の上流および中流域にある2支川（St.1：筑輪川、St.2：逆川）および、中流域の本川1地点（St.3：君島橋）を試料採取地点に設定した。また、2013年は水田率が異なる3支川（St.a：山口川、St.b：観音川、St.c：大川）を試料採取地点に追加した（写真(1)-1）。



写真(1)-1 茨城県桜川流域における試料採取地点の状況（左上より St.1筑輪川、St.2逆川、St.3君島橋（桜川本流）。左下より St.a山口川、St.b観音川、St.c大川）

河川水の採水は、流域内で農薬が使用される直前の4月上旬から、落水が終了する8月下旬にかけて、週1回の頻度で行った。約3000 mLの河川水を流心よりポリバケツを用いて採取し、ガラス容器に入れクーラーボックスに保存し、実験室に搬入後は速やかに農薬の分析に供した。また、5支川（St.1：筑輪川、St.2：逆川、St.a：山口川、St.b：観音川、St.c：大川）において、試料採取時の流速、流路断面形状を測定し、河川流量を把握した。

分析対象とする農薬は、茨城県内への出荷量の多い水稻用農薬（除草剤32種、殺虫剤9種、殺菌剤2種、代謝分解物15種）とした。分析方法は、ガラス繊維ろ紙によりろ過した河川水をpH6.5に調整後、固相抽出カートリッジ（Waters社製、Sep-Pak PS-2およびOasis HLB）に通水し、Sep-Pak PS-2はジクロロメタン、Oasis HLBはメタノールおよびアセトニトリルにより分析対象農薬を溶出し、LC-MS/MSにより各農薬の濃度を測定した¹¹⁾。定量下限値は0.0001～0.025 $\mu\text{g/L}$ 、添加回収試験による回収率は一部の農薬を除き70.2%～105.0%、変動係数は10%未満であった。

農耕地に散布された農薬の動態は土壌の種類により大きく異なるため、PADDY-Largeモデルによる計算においても、土壌の理化学性が重要な入力パラメータとなっている。土壌の理化学性は、

支流域内でも地点によって異なることが想定される。そこで、前述の2支流域（St.1：筑輪川、St.2：逆川）における水田土壌の理化学性（容積重、全炭素など）を複数の地点（筑輪川：17地点、逆川：10地点）で調査し、これらの流域内での変動性を把握した。

2）長野県千曲川支流域における農薬モニタリング

茨城県桜川流域と同様に、前述の長野県広井川においても水稻用農薬濃度のモニタリングを2012および2013年の2年間実施した（図(1)-4）。広井川流域では、例年5月中旬から6月上旬にかけて田植えが行われ、10月上旬に収穫が行われている。試料採取地点を広井川の中流域に設定し（写真(1)-2）、5月中旬から7月上旬にかけて週1～2回の頻度で行った。河川水の採取は、河川の流心から褐色ガラスビンに直接河川水を採取した。採取した試料は密封保存し、輸送の際には冷蔵・暗所保存状態にて行い、試験室に搬入後は速やかに分析に供試した。また、採水時の河川流量を測定した。



写真(1)-2 広井川における試料採取地点の状況

調査対象農薬は、調査地域内での使用が想定される除草剤3種および殺虫剤1種を選定した。分析方法は、ガラス繊維ろ紙によりろ過した河川水をpH3以下に調整後、固相抽出カートリッジ（Waters社製、Oasis HLB）に通水し、アセトニトリルにより分析対象農薬を溶出し、GC-MS/MSまたはLC-MS/MSにより各農薬の濃度を測定した。定量下限値は0.01 µg/L、添加回収試験による回収率（添加濃度1µg/L）は83%～103%と良好であった。

3）滋賀県白鳥川支流域における農薬モニタリング

藤間川（浄土寺・倉橋部地区）においても水稻用農薬濃度のモニタリングを2012および2013年の2年間実施した（図(1)-5）。同流域では、例年5月上旬から中旬にかけて田植えが行われている。試料採取地点を浄土寺・倉橋部地区の流域末端に設定し（写真(1)-3）、自動採水機（ISCO社製、Water Sampler Model 6100）により4月27日（2013年は5月1日）から6月15日までは毎日、それ以降6月30日までは2日に1回の頻度で採水を行った。採水時に河川流量および水位を測定するとともに、自記式水位計による水位の連続測定を行った。



写真(1)-3 藤間川における試料採取地点の状況

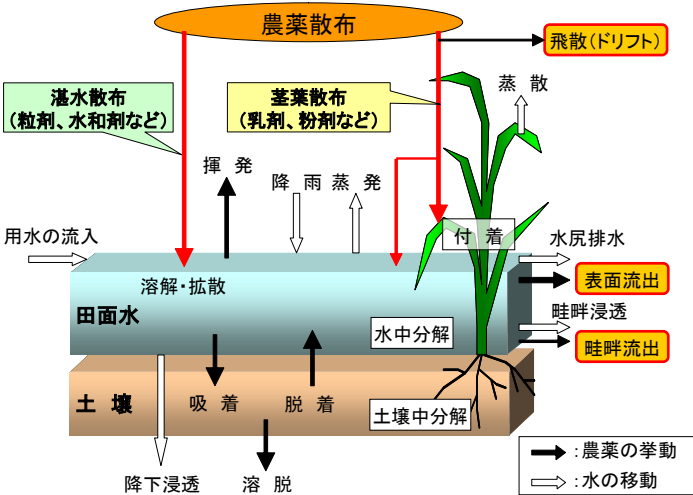
調査対象農薬は、調査地域内での使用が想定される除草剤3種を選定した。分析方法は、採取した河川水をガラス繊維ろ紙によりろ過した後、固相抽出カートリッジ（Waters社製、Sep-Pak

PS-2)に通水し、アセトンおよびジクロロメタンにより分析対象農薬を溶出し、GC-MSにより各農薬の濃度を測定した。なお、定量下限値は 0.01 µg/L であった。

(3) 河川流域における農薬の挙動予測モデルの開発

1) 水田における農薬の挙動予測モデル (PADDY モデル)

水田使用農薬の河川における濃度予測では、水田圃場内での農薬の濃度予測が基本となる。水田における水の移動や農薬の挙動要因を図(1)-6 に示す。水稻用除草剤などの農薬製剤(粒剤など)を水田に湛水散布すると、製剤から農薬の有効成分が田面水に徐々に溶出する。溶出した農薬の大部分は土壌表層へ吸着し、時間の経過とともに分解していくが、その一部が水尻排水に伴う流出、田面水の降下浸透に伴う土壌下層への移動、大気への揮発により圃場外へ移行する。これらの要因を用いてモデル化することで、田面水および土壌中の濃度変化を計算



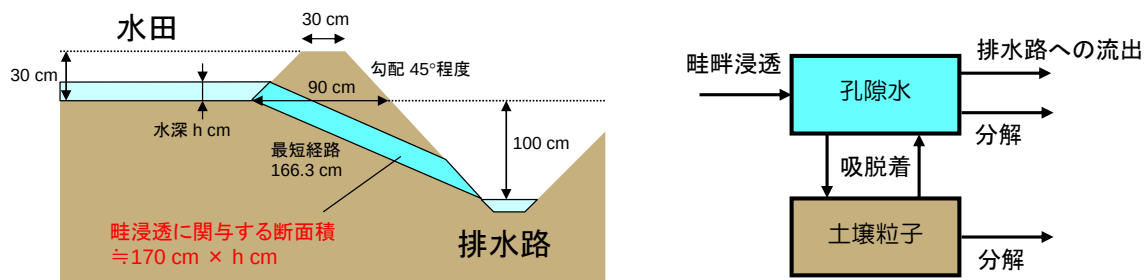
図(1)-6 PADDYモデルで考慮する水田における水収支と農薬の挙動

する (PADDY モデル) ¹²⁻¹⁴⁾。モデル計算に必要な入力データを表(1)-2 に示す。農薬の物理化学性のうち、土壌吸着係数や土壌中での分解半減期は、土壌の種類により大きく異なる。多くの農薬は非イオン性で水に溶けにくい性質を持つため、農薬の土壌への吸着は土壌有機物への疎水結合が主体である ¹⁵⁾。一般に、土壌中の有機炭素量が多いほど農薬の土壌吸着量が多くなる傾向を示すことから、農薬の動態を予測するうえで有機炭素量は重要なパラメータとなっている。

表(1)-2 PADDY モデルで使用する入力データ

項目	パラメータ
農薬データ	
使用条件	製剤の種類、使用量、散布方法など
物理化学性	分子量、水溶解度、蒸気圧、土壌吸着係数、ヘンリー定数 水中および土壌中における分解半減期
環境データ	
圃場条件	面積、田面水深、用水量、排水量など
気象条件	気温、降水量、日射量など
土壌の特性	有機炭素含有率、仮比重、孔隙率など
栽培管理条件	水管理(止水期間、かけ流しの有無)など

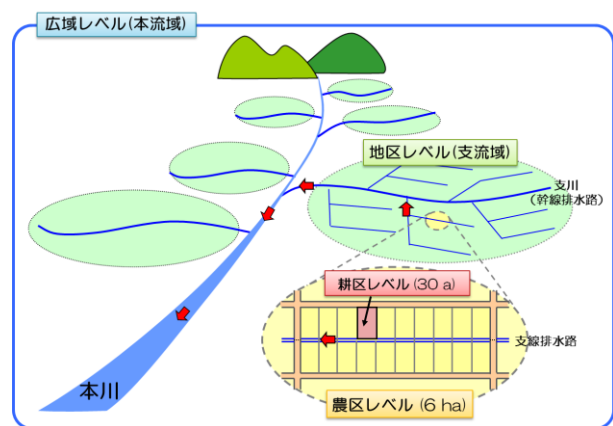
これまでの調査報告によれば、畦畔浸透による水田から河川への農薬流出の寄与が大きいとされている¹⁶⁾。また、環境大臣が定める水質汚濁および水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に際し、一定の環境条件下での河川水中予測濃度を算定しているが、算定シナリオにおいて畦畔浸透による農薬の流出経路が考慮されている¹⁷⁾。そこで、畦畔浸透による農薬流出プロセスを考慮した挙動予測が行えるようにモデルの改良を行った。一般的な水田畦畔（土畦畔）の構造を想定し、畦畔浸透に関与する畦土壌コンパートメント（孔隙水、土壌粒子）を定義し、孔隙水／土壌粒子間における農薬の吸脱着、分解プロセスを考慮することにより、畦畔浸透による農薬流出濃度を計算した（図(1)-7）。



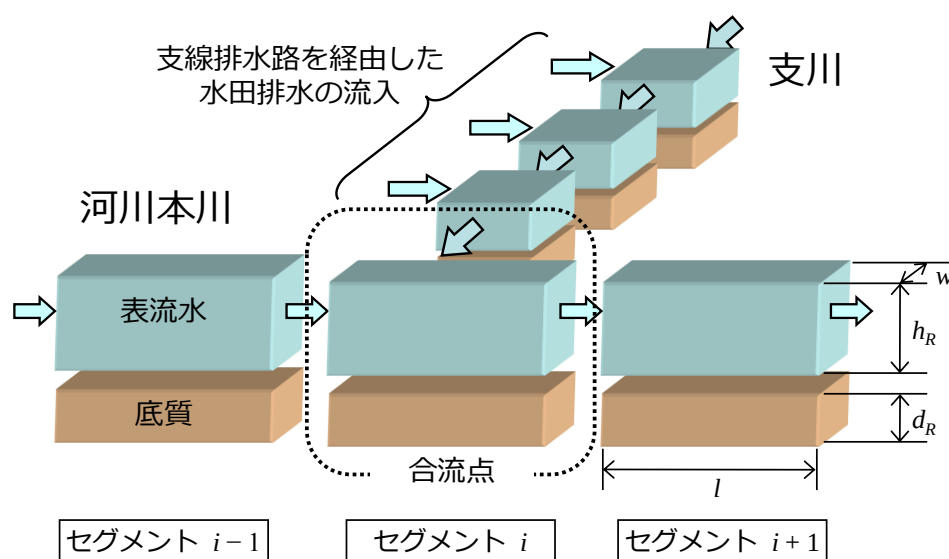
図(1)-7 一般的な水田畦畔（土畦畔）の断面（左）と PADDY モデルで考慮する畦土壌コンパートメントにおける農薬の挙動（右）（左図の出典：山路(1992)、水田の圃場整備、「新版 農地工学」、文永堂出版）

2) GIS 情報を活用した河川における農薬の挙動予測モデル（GIS 結合型 PADDY-Large）

河川流域における農薬の挙動を予測するため、流域内の水田を農業水利の観点から「耕区」、 「農区」、 「地区」、 「広域」の4つのレベルに分類した標準シナリオを設定した（図(1)-8）。 「耕区」は畦畔で囲まれた水田一筆を表し、圃場整備後の標準的な面積は 0.3 ha である。一般的な「農区」は、20 筆程度の耕区と支線排水路で構成され、農道で囲まれている（面積 6 ha）。 「地区」は、幹線排水路として機能する支川に沿って多くの農区が集まった支流域を表す。「広域」は、多くの支川が合流する本川を含む流域を表す。水田から流出した農薬は、支線排水路を経由して支流域内の幹線排水路に流入し、最終的に河川本川に達する。河川流域における農薬の挙動予測モデル（PADDY-Large）^{6,7)}では、河川流路を流れの方向に沿って多数の区画（幅 w (m)、長さ $l = 250$ m）に分割し、各区画は表流水と底質で構成されるとした（図(1)-9）。表流水の移流、水／底質間の吸脱着および分解を考慮し、図(1)-9 に示す支川と本川の合流点である区画 i における農薬の収支は、式(1.1)および(1.3)の常微分方程式で表される。



図(1)-8 PADDY-Largeモデルによる河川流域での農薬の挙動予測（標準シナリオ）



図(1)-9 PADDY-Large モデルで考慮する河川流路（表流水、底質コンパートメント）の模式図

表流水コンパートメント

$$A_{R,i} h_{R,i} \frac{dC_{W,R,i}}{dt} = Q_{C,i} C_{W,C,i} + Q_{R,i-1} C_{W,R,i-1} - Q_{R,i} C_{W,R,i} - A_{R,i} d_{R,i} \rho_{b,R} (k_{ads} K_f C_{W,R,i}^{1/n} - k_{des} C_{S,R,i}) - K_L A_{R,i} C_{W,R,i} - A_{R,i} h_{R,i} k_{dw} C_{W,R,i} \quad (1.1)$$

$$Q_{R,i} = Q_{R,i-1} + Q_{C,i} \quad (1.2)$$

底質コンパートメント

$$A_{R,i} d_{R,i} \rho_{b,R} \frac{dC_{S,R,i}}{dt} = A_{R,i} d_{R,i} \rho_{b,R} (k_{ads} K_f C_{W,R,i}^{1/n} - k_{des} C_{S,R,i} - k_{ds} C_{S,R,i}) \quad (1.3)$$

ここで、添え字 C および R は、それぞれ支川および本川を表す。また、

C_W : 河川水中農薬濃度 (mg L^{-1})

C_S : 底質中農薬濃度 (mg kg^{-1})

t : 時間 (day)

A_R : 河川セグメントの表面積 (m^2)

h_R : 河川水位 (m)

d_R : 底質深さ (m)

$\rho_{b,R}$: 底質の仮比重 (g cm^{-3})

Q_C : 支川の流量 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)

Q_R : 本川の流量 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)

k_{ads} : 吸着速度定数 (day^{-1})

k_{des} : 脱着速度定数 (day^{-1})

K_f : フロインドリッヒ吸着係数 ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)

- $1/n$: 非線形度 (-)
 K_L : 揮発速度定数 (m day^{-1})
 k_{dw} : 水中における分解速度定数 (day^{-1})
 k_{ds} : 底質における分解速度定数 (day^{-1})

なお、区画 i が合流点でない場合、式(1.2)において $Q_{C,i} = 0$ および $Q_{R,i} = Q_{R,i-1}$ となる。

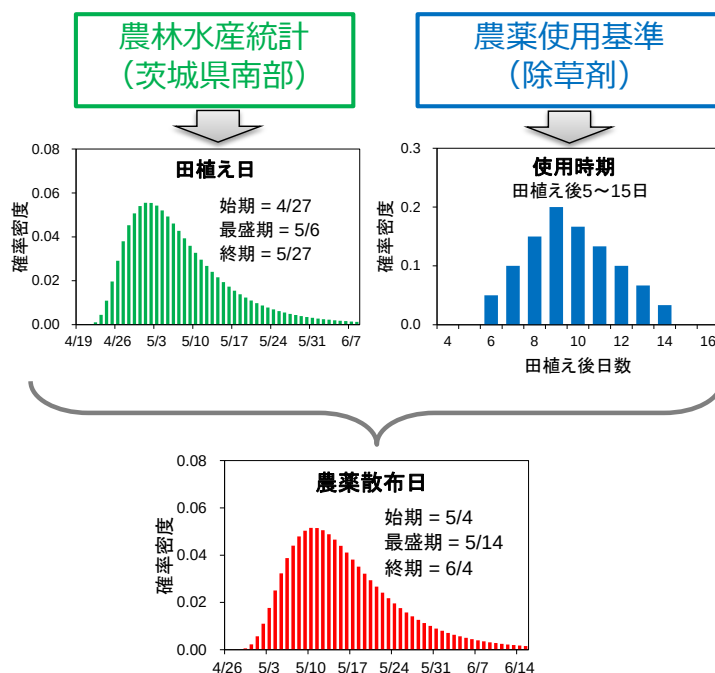
表(1)-3 に示す入力パラメータを用いて、式(1.1)および(1.3)の常微分方程式を数値解法（ルンゲ・クッタ・ジル法）により解くことで、表流水および底質における農薬の濃度変化が求められる。計算用のコンピュータプログラムは、Microsoft Excel の Visual Basic for Application を用いて作成した。

表(1)-3 PADDY-Large モデルの計算に必要な入力パラメータ

農薬データ	水田圃場データ	流域特性データ
使用量	水田一筆面積	水稻作付面積
分子量	田面水深	農薬普及率
水溶解度	水田排水量	水位(支線排水路)
蒸気圧	浸透水量	河川流路長・幅
水中分解半減期	止水期間	河川水位
土壌中分解半減期	土壌仮比重	河川流量
土壌吸着定数(Koc)	土壌孔隙率	底質深さ
	土壌全炭素%	底質仮比重

広大な流域面積を持つ河川における農薬濃度を予測するためには、流域内で大きく変動するさまざまな特性（土地利用、土壌の特性など）をモデル計算に適切に反映させる必要がある。そこで、これまでに開発した PADDY-Large モデルのプロトタイプ^{6,7)}に、前述の GIS による桜川の流域特性の情報を反映させた農薬挙動予測モデル（GIS 結合型 PADDY-Large モデル）を開発した。

モデル計算において、対象流域内における農薬散布日の設定は、農林水産省の統計データ⁹⁾による茨城県南部の田植え日の状況を基に分布を設定するとともに、農薬ごとに定められている使用基準（水稻用除草剤の多くは、田植え日を基準とした使用時期が定められている）を基に使用時期の分布を設定し、両者を重ね合わせることで、農薬散布日の分布を推定した（図(1)-10）



図(1)-10 流域内における農薬散布日の推定方法の例（水稻用除草剤の場合）

3）モンテカルロ法を導入した PADDY-Large モデルによる不確実性解析

不確実性解析のための予備的な検討として、PADDY-Large モデルの感度分析を行い、河川水中農薬濃度の計算値に大きく影響を及ぼす入力パラメータを特定した。PADDY-Large モデルの各種入力パラメータ（水田の水収支、農薬の物理化学性・使用量、土壌特性、河川流量など）について、標準シナリオの設定値から+10%変動させた場合の河川水中農薬濃度の変動を式(1.4)により算定し、感度の高い入力パラメータを特定した。

$$SR = \frac{(Y' - Y)/Y}{(X' - X)/X} \quad (1.4)$$

ここで、

SR : 感度比 (Sensitivity Ratio)

X : 標準シナリオにおける入力パラメータの設定値

X' : X から+10%変動させた入力パラメータの値

Y : 標準シナリオにおける計算結果（河川水中最高濃度）

Y' : 入力パラメータ値を X' とした場合の計算結果

である。なお、感度比 SR の絶対値が大きいほど感度の高い入力パラメータであることを示し、計算結果である河川水中最高濃度に与える影響が大きい。

表(1)-4 に感度分析の対象とした環境条件（水田圃場条件、流域特性）に関する入力パラメータを示す。各パラメータの値は、桜川支流の逆川（St. 2）を想定し標準的な値を設定した。また、解析の対象とした農薬は、茨城県内で広く使用されており、物理化学性の異なる 4 種の水稲用除草剤とした（表(1)-5）。

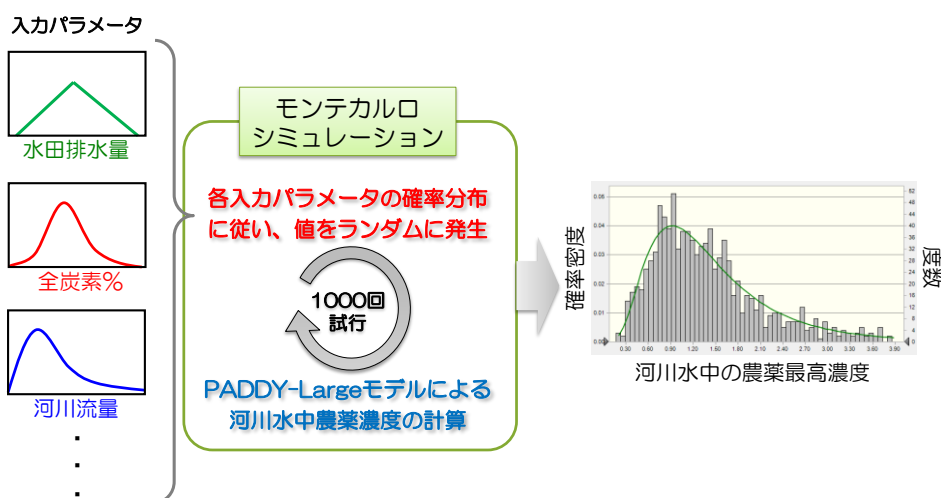
表(1)-4 感度分析の対象とした水田圃場条件および流域特性に係るパラメータ

水田圃場条件	標準値	流域特性	標準値
田面水深 (mm)	47	水稻作付面積 (ha)	77.3
水尻排水量 (mm/day)	2.5	農薬普及率 (%)	10
畦畔浸透量 (mm/day)	2.2	排水路コンパートメント容積 (m ³)	40
降下浸透量 (mm/day)	1.1	河川水コンパートメント容積 (m ³)	150
止水期間 (day)	7	河川底質コンパートメント容積 (m ³)	7.5
土壌仮比重 (g/cm ³)	1.22	河川底質の仮比重 (g/cm ³)	1
土壌孔隙率 (cm ³ /cm ³)	0.61	河川流量 (m ³ /s)	0.22
土壌全炭素%	1.71		

表(1)-5 感度分析の対象とした水稻用除草剤の物理化学性に係るパラメータ

農薬パラメータ	モリネート	ダイムロン	メフェナセット	シメトリン
水溶解度 (mg/L)	800	0.79	5.2	482
土壌吸着定数 (Koc)	371	940	1099	6915
水中分解半減期 (day)	安定	2.68	20	安定
土壌中分解半減期 (day)	51	77	10	53

感度分析の結果を踏まえ、感度の高い入力パラメータの変動を統計学的な分布（正規分布、一様分布、三角分布など）で表現し、その分布に従ってランダムに発生させた入力値を用い、シミュレーションを繰り返すモンテカルロ法により河川水中農薬濃度分布を推定した（図(1)-11）。各パラメータの分布設定は、実測値、統計データ、文献値¹⁸⁾などを考慮して設定した。ソフトウェアは Oracle Crystal Ball を用い、試行回数は 1000 回、サンプリングはラテンハイパーキューブ法にて行った。



図(1)-11 PADDY-Large モデルを用いたモンテカルロ法による河川水中農薬濃度の不確実性解析

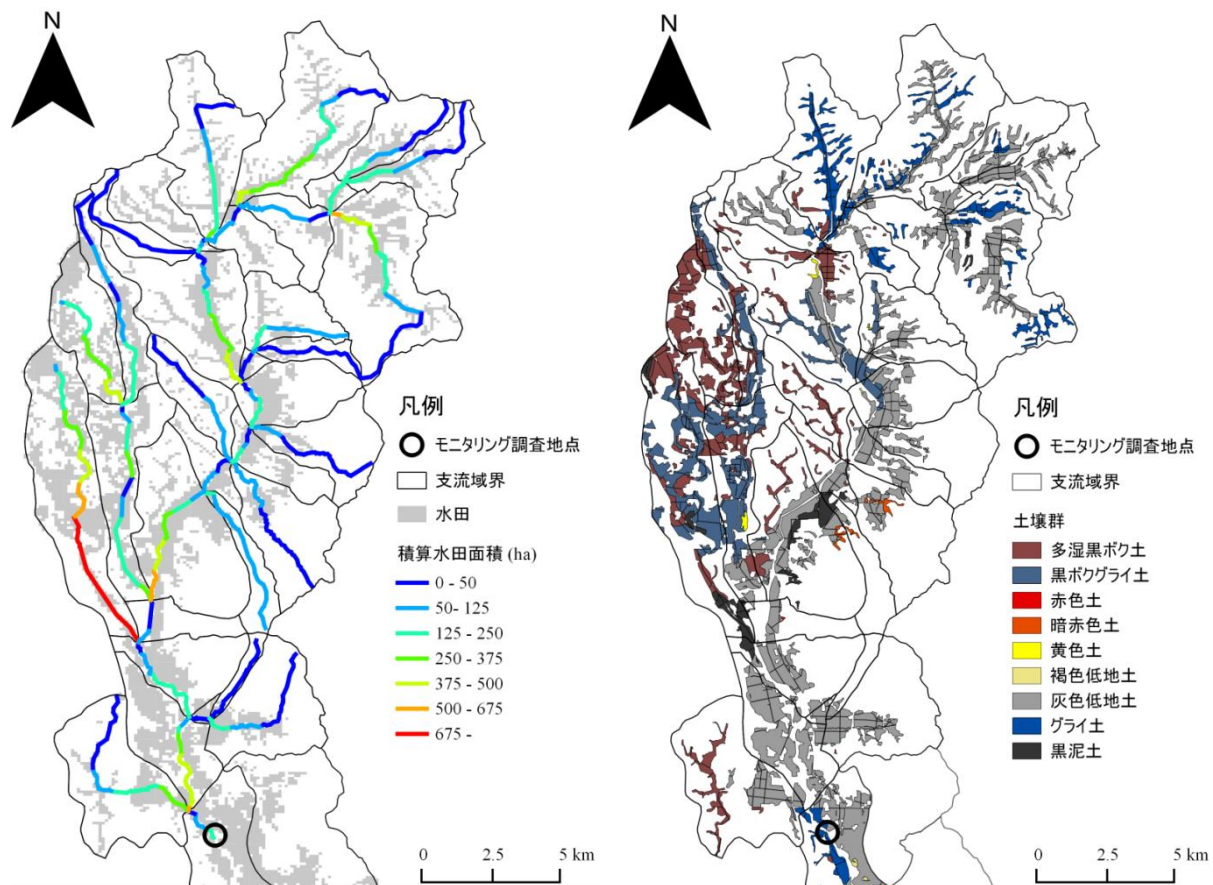
4. 結果及び考察

(1) GIS による河川の流域特性に関する情報の整備

桜川流域を対象とした GIS 解析結果によると、桜川本流の流路延長 53.4 km、流域面積 335 km² であった。このうち、約 28%の 95 km² は水田で占められていた。図(1)-12 左に 250 m ごとの河川セグメントに関連づけた積算の水田面積を示す。1 セグメントあたりの水田面積の平均値は 12.1 ha、標準偏差は 16.0 であり、セグメント間の変動は大きかった。水田の分布状況は、支流域間で異なるとともに、支流域内でも一様ではなかった。大きな水田面積を持つセグメントは、本流部と支流の台地・低地部分に多かった。一方、流域西部の稲敷台地面上を除き、各支流の上流部は山地であったため、水田面積が小さかった。以上により、対象流域における水田の大部分は、幹線排水路として機能する支川沿いに分布していることが示された。

対象流域における水田土壌の分布を図(1)-12 右に示す。桜川本流沿いにある水田の大部分は、灰色低地土であり、上流部に一部グライ土が見られた。一方、中流西部の台地上には多湿黒ボク土と黒ボクグライ土が多く分布していた。これは、沖積低地と台地の違いを反映したものであると考えられた。

なお、PADDY-Largeモデルの計算に必要な容積重および全炭素含量は、農林水産省が行った地力保全基本調査の標準土壌断面およびデータベース¹⁹⁾を用い、支流域ごとに土壌統群別の面積割合による加重平均値を算出した。



図(1)-12 桜川流域における250 mごとの河川セグメントに関連づけた積算水田面積（左）および水田土壌の分布（右）

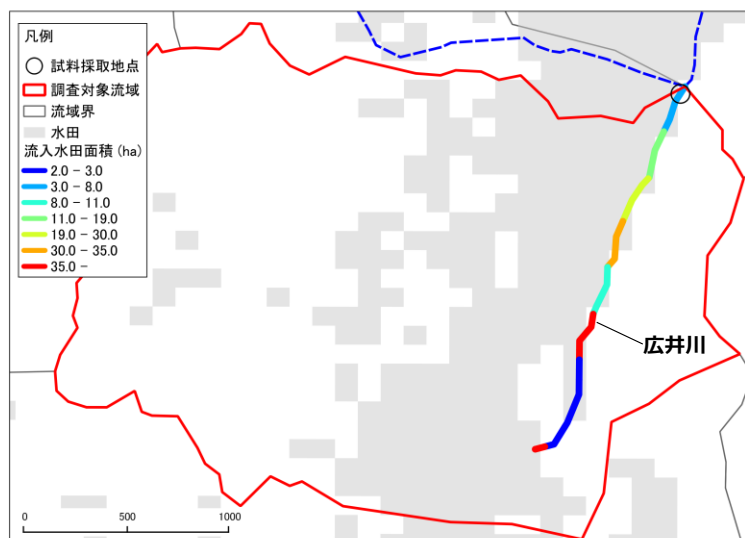
長野県広井川流域を対象としたGIS解析結果によると、面積は590 ha、水田面積は225 haであり、水田率（＝水田面積／流域面積）は38.1%であった。図(1)-13に250 mごとの河川セグメントに関連づけた水田面積を示す。1セグメントあたりの水田面積の平均値は25.1 ha、標準偏差は23.7haであり、広井川においてもセグメント間の変動が大きかった。1/50000デジタル農耕地土壌図¹⁰⁾によると、調査対象流域の水田土壌は、川沿いの平坦部でグライ土、山間部で灰色低地土が分布していた。

藤間川流域を対象としたGIS解析結果によると、流域面積は88 haと桜川の各支流域、広井川流域と比べて小さかった。1/2500の国土基本図より解析した水田面積は36 ha、水田率は40.9%であり、広井川と同様に水田の占める割合が高い流域である。ただし、毎年、水田圃場の一部（3割程度）は小麦に転作されており、水稻作付面積はこれより小さい。図(1)-14に250 mごとの河川セグメントに関連づけた水田面積を示す。1セグメントあたりの水田面積の平均は5.21 ha、標準偏差は3.22 haであり、こちらも桜川、広井川流域に比べて小さな値となった。1/50000デジタル農耕地土壌図¹⁰⁾によると、調査対象流域の水田土壌は、全域で灰色低地土が分布していた。土壌の理化学性は、全炭素含量1.24%、pH5.8であった。

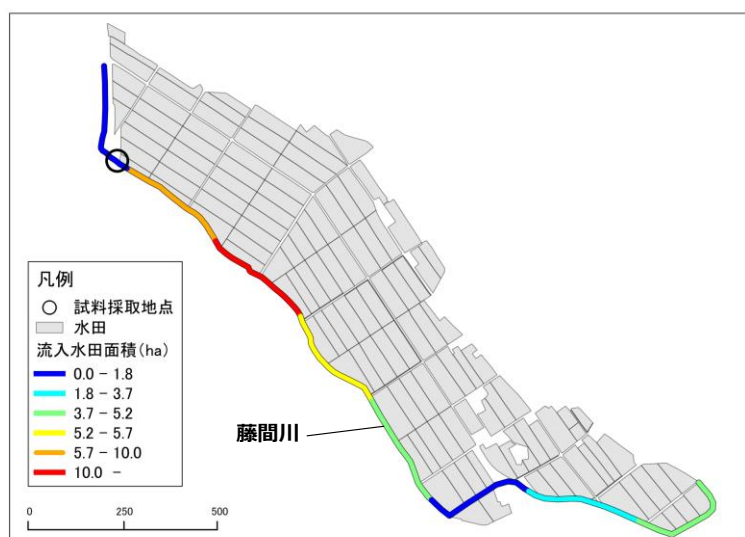
（２）農業モニタリング

１）茨城県桜川流域における農業モニタリング

桜川の2支流域（St.1：筑輪川、St.2：逆川）における水田土壌の理化学性を調査した結果のうち、容積重および全炭素含量の測定結果を表(1)-6に示す。2支流域ともに容積重のバラツキは正規分布、全炭素は対数正規分布で表現できることが示されたが、逆川流域に比べて筑輪川流域の変動が大きいことが確認された。得られた情報は、後述のPADDY-Largeモデルで計算する際の入力パラメータとして活用した。



図(1)-13 広井川流域における250 mごとの河川セグメントに関連づけた水田面積



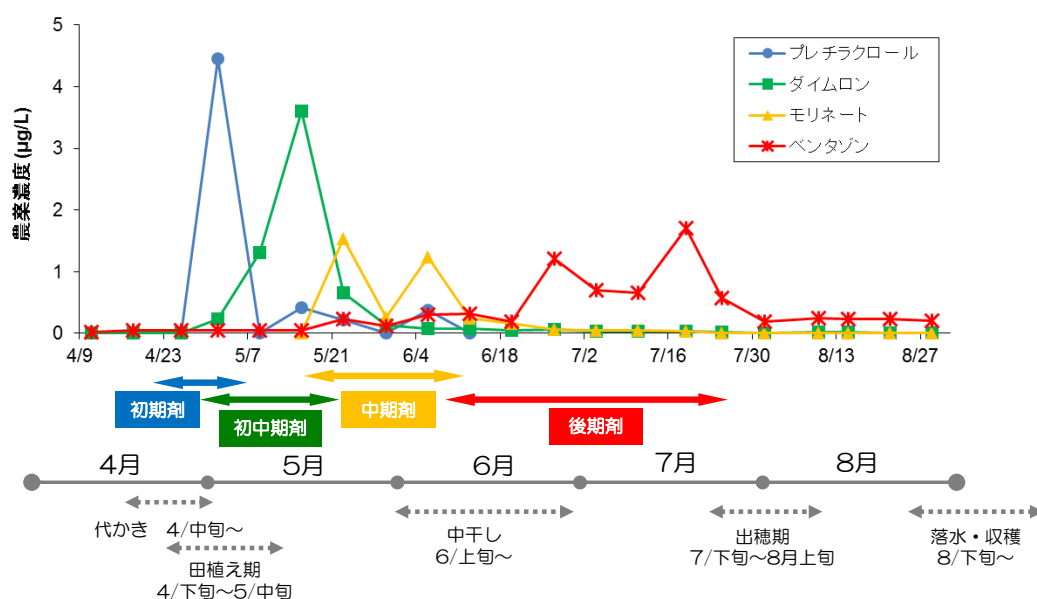
図(1)-14 藤間川流域における250 mごとの河川セグメントに関連づけた水田面積

表(1)-6 桜川支流域における水田土壌の容積重および全炭素

測定項目	分布型	筑輪川 (St.1)			逆川 (St.2)		
		平均	標準偏差	データ数	平均	標準偏差	データ数
容積重 (g/cm ³)	正規分布	0.95	0.15	17	1.22	0.07	10
全炭素 (%)	対数正規分布	3.19	1.09	17	1.71	0.19	10

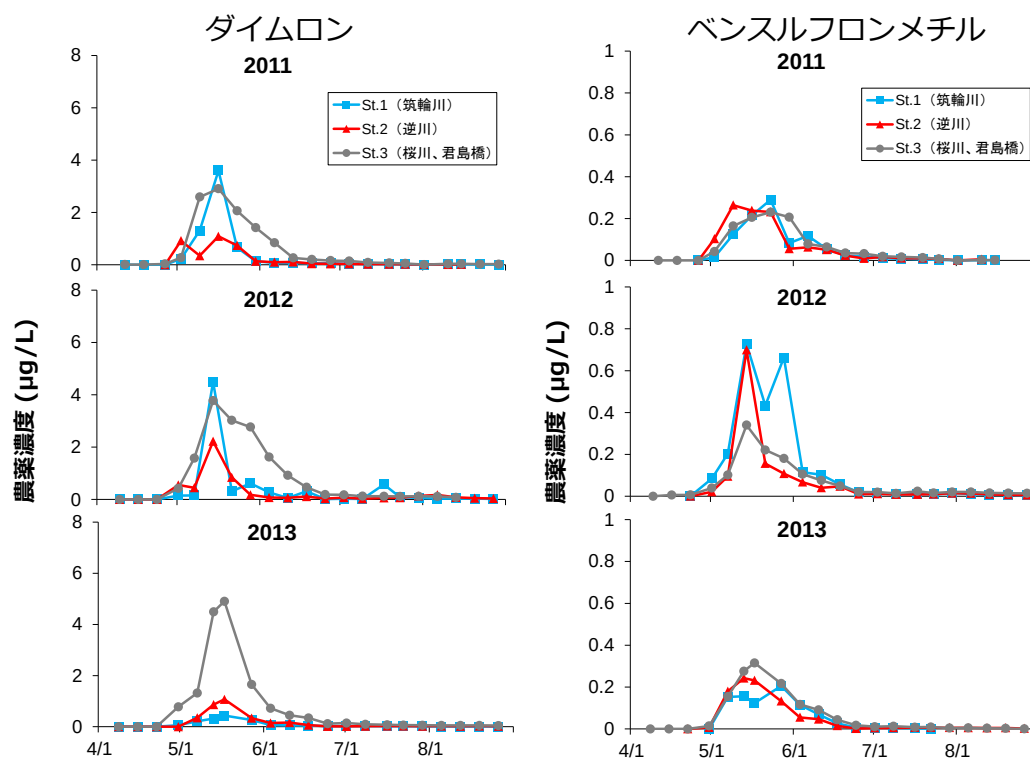
図(1)-15にSt.1（筑輪川）における水稻用除草剤の河川水中での濃度推移（2011年）を示す。桜川流域では、代かきが4月中～下旬、田植えが4月下旬～5月上旬に行われていた。水稻用除草剤は、代かきまたは田植え日を基準とした使用時期が除草剤ごとに定められおり、各除草剤の濃度もそれぞれの使用時期に対応した検出ピークが確認された。まず、4月下旬より代かき時に使用される初期剤のプレチラクロールが検出され、次いで田植え直後～2週間後に使用されるダイムロン（初中期剤）の検出ピークが5月中旬に確認された。その後、田植え2～4週間後に使用される中期剤モリネートが5月下旬～6月上旬に検出され、中干し期である田植え1ヶ月以降に使用される後期剤ペンタゾンが6月中旬～7月下旬に検出された。なお、St.2（逆川）およびSt.3（君島橋）での各除草剤の検出時期は、St.1とほぼ同様の傾向を示した。このように、水稻栽培地域を流下する河川では、除草剤の使用時期を反映した検出ピークが見られることが確認された。

一方、殺虫剤、殺菌剤についても各農薬の使用時期に対応すると考えられる濃度の上昇が確認されたが、除草剤に比べて検出濃度は低い傾向であった。この理由として、水田雑草の発消長は毎年ほぼ同様であるため、各種除草剤が体系的に広く使用されるのに対し、殺虫、殺菌剤は、育苗箱に施用する場合を除き、病害虫の発生時期に応じて流域内で局所的に集中して使用されることにあると考えられた。

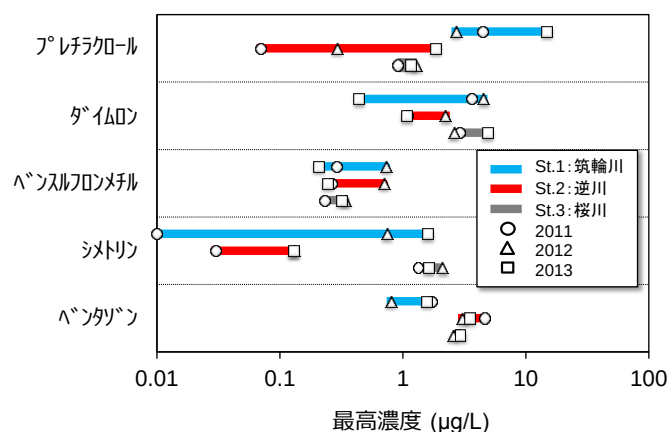


図(1)-15 桜川支流（筑輪川、St.1）における水稻用除草剤の河川水中濃度推移（2011年）

図(1)-16に各試料採取地点における除草剤ダイムロンとベンスルフロンメチルの2011～2013年の濃度推移を示す。桜川本流（St.3：君島橋）における3年間の検出状況は、2農薬ともに同様のパターンを示したが、2支川（St.1：筑輪川、St.2：逆川）では地点や年度によりバラツキが大きいことが示された。これらの除草剤が使用される4～5月の積算降水量は、2011年が348.5 mm、2012年が403.5 mm、2013年が219.5 mmであったが、2支川での検出状況に対する降雨条件との関連性は見られなかった。図(1)-17に5種類の除草剤の河川水中最高濃度の年次変動を示す。桜川の本流（St.3：君島橋）では最高濃度の年次変動は小さいが、2支川（St.1：筑輪川、St.2：逆川）では本流に比べて年次変動が大きかった。



図(1)-16 桜川流域における除草剤ダイムロンおよびベンスルフロンメチルの河川水中濃度推移（2011～2013年）



図(1)-17 除草剤5種の河川水中最高濃度の地点別年次変動（2011～2013年）

2013年に農薬モニタリングの対象とした5支川の流域特性と、各種除草剤の最高濃度とを比較した結果を表(1)-7に示す。水田割合や比流量は支流域によって大きく異なった。「水田割合／比流量」で表される指標は、流域内での農薬使用状況が同じである場合、その値が大きいほど農薬が高濃度で検出されやすいことを示す。「水田割合／比流量」の値と各除草剤の最高濃度とを比較すると、一部の除草剤（プレチラクロール、ダイムロン）で流域特性に応じた最高濃度を示したが、多くの除草剤ではその傾向は見られず、支流域によって農薬の使用状況が大きく異なることが示唆された。

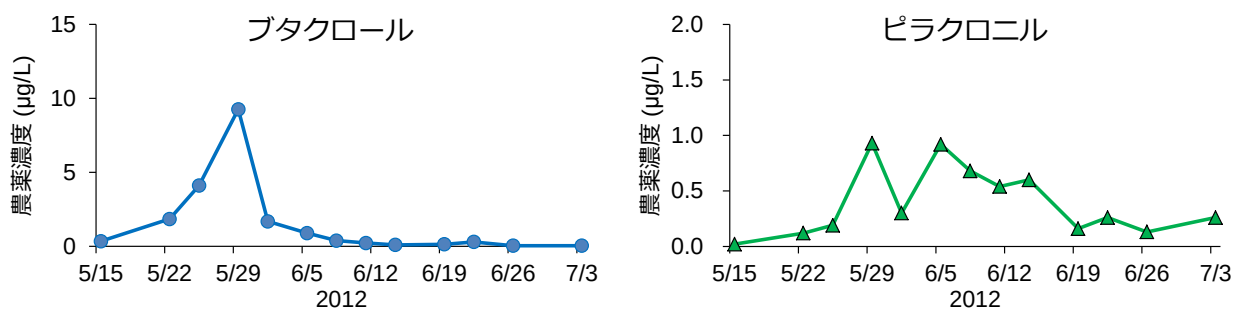
表(1)-7 桜川支流域の特性と除草剤の最高濃度との比較（2013）

流域特性	筑輪川	大川	山口川	観音川	逆川
水田割合	0.24	0.46	0.11	0.50	0.17
比流量 (m ³ /s/100km ²)*	0.22	2.48	0.64	2.97	1.30
水田割合/比流量	1.11	0.19	0.17	0.17	0.13
農薬名	河川水中最高濃度 (μg/L)				
プレチラクロール	14.7	0.50	0.20	1.72	1.83
ブロモブチド	14.5	6.45	11.8	8.07	8.37
ダイムロン	0.44	13.5	0.10	15.8	1.07
ベンスルフロンメチル	0.21	0.14	0.15	0.16	0.24
カフェンストール	0.07	0.71	0.23	0.60	0.04
メフェナセット	0.49	1.76	0.32	1.08	0.04
シメトリン	1.60	5.92	1.81	1.83	0.13
ベンタゾン	1.56	2.02	2.35	4.79	3.51

*調査期間における平水時の値(中央値)

2) 長野県千曲川支流域における農薬モニタリング

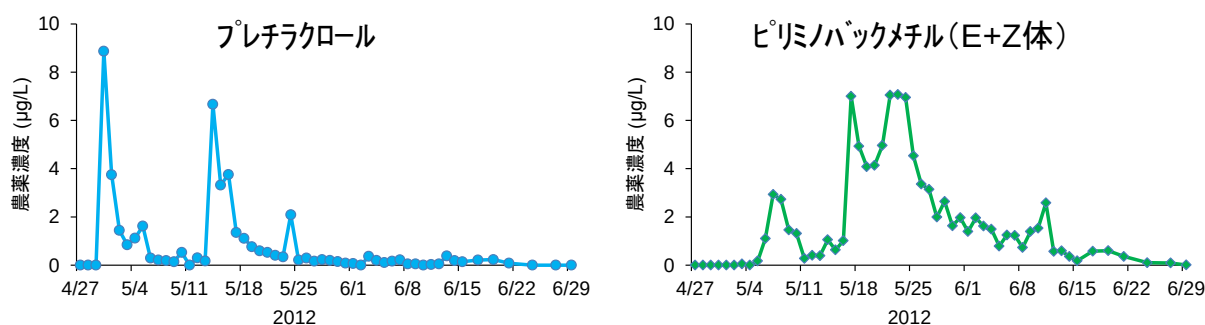
長野県広井川におけるモニタリング調査の結果、桜川流域と同様に除草剤の使用時期を反映した検出ピークが確認された。まず、5月中旬より代かき時に使用される初期剤のブタクロールが検出され、次いで田植え直後～2週間後に使用されるピラクロニル（初中期剤）の検出ピークが5月下旬～6月上旬に確認された（図(1)-18）。その後、田植え2～4週間後に使用される中期剤シメトリンやベンフレセットが6月中下旬に検出された。育苗箱に施用する殺虫剤フィプロニルは、田植えが始まる5月下旬より検出されたが、除草剤に比較して検出濃度は低かった（最高0.02 μg/L）。広井川においては、試料採取地点近傍の水田圃場における水管理（田面水深、止水板の高さなど）や、水田排水を集水する支線排水路の流量などの情報を得た。



図(1)-18 広井川における水稲用除草剤の河川水中濃度推移 (2012年)

3) 滋賀県白鳥川支流域における農薬モニタリング

滋賀県藤間川の調査対象流域における水稲作付面積は、2012年が20.0 ha、2013年が23.4 haであった。本流域においても、除草剤の使用時期を反映した検出ピークが確認された。まず、5月上旬より代かき時に使用される初期剤のプレチクロールが検出され、次いで田植え直後～2週間後に使用されるピリミノバックメチル(初中期剤)の検出ピークが5月中下旬に確認された(図(1)-19)。その後、田植え2～4週間後に使用される中期剤シメトリンが5月下旬～6月中旬に検出された。水田圃場の栽培管理日誌がJAのトレーサビリティシステムに提出されており、これによりほぼすべての水稲作付圃場において使用した除草剤の種類と散布量等の情報を得ることができた。



図(1)-19 藤間川における水稲用除草剤の河川水中濃度推移 (2012年)

4) 調査対象流域における水田の水収支に関する標準シナリオ

開発したPADDY-Largeモデルにより河川水中農薬濃度を精度良く予測するためには、対象流域における水田圃場での水収支をモデル計算に適切に反映させる必要がある。そこで、前述の3流域における水田圃場の水収支に関する調査結果や文献値¹⁸⁾などにより、対象流域内における水田の水収支に関する標準シナリオを作成した(表(1)-8)。茨城県逆川流域では、余剰貯留水深(田面水深と水尻の止水板との差)が5 mmと他の流域に比べて小さく、用水の過剰な供給やまとまった降雨により田面水がオーバーフローしやすい状況にある。一方、滋賀県藤間川流域では、余剰貯留水深が30 mmと他の流域に比べて大きいため、水尻排水量が少ないのが特徴である。これは、環境こだわり農業(滋賀県での環境保全型農業)が対象地域において広く推進されており(2012年: 17%、2013年: 38%)、水田からの排水を極力琵琶湖に流入させない措置が講じられているためである。また、長野県広井川流域では、傾斜地に水田圃場が立地しているため、平野部に立地して

いる他の流域に比べて畦畔浸透量や降下浸透量が大きいのが特徴である。

表(1)-8 調査対象流域における水田の水収支に関する標準シナリオ

都道府県 流域名 河川名	茨城 桜川 逆川	長野 千曲川 広井川	滋賀 白鳥川 藤間川
水尻高さ (mm)	52	73	70
田面水深 (mm)	47	65	40
余剰貯留水深* (mm)	5	8	30
水尻排水量 (mm/d)	2.5	4	1.1
畦畔浸透量 (mm/d)	2.2	6	2.8
降下浸透量 (mm/d)	1.1	10	0.1

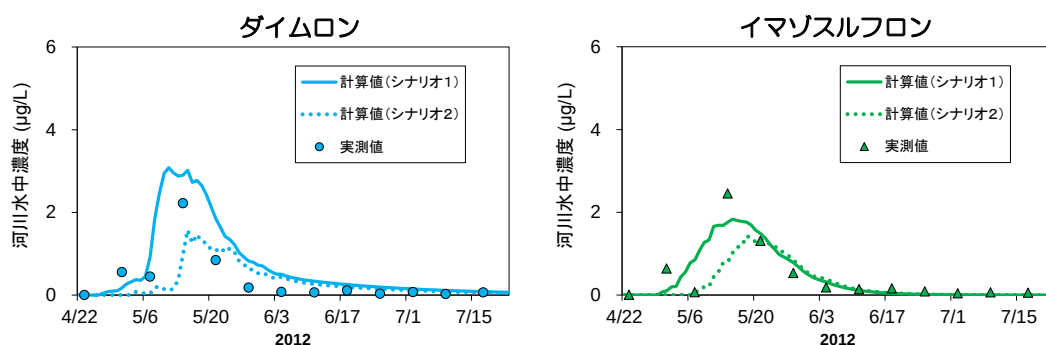
*「田面水深」と「水尻の止水板高さ」との差

（３）河川流域における農薬挙動予測モデル（GIS 結合型 PADDY-Large）の検証

１）茨城県桜川流域におけるモデルの検証

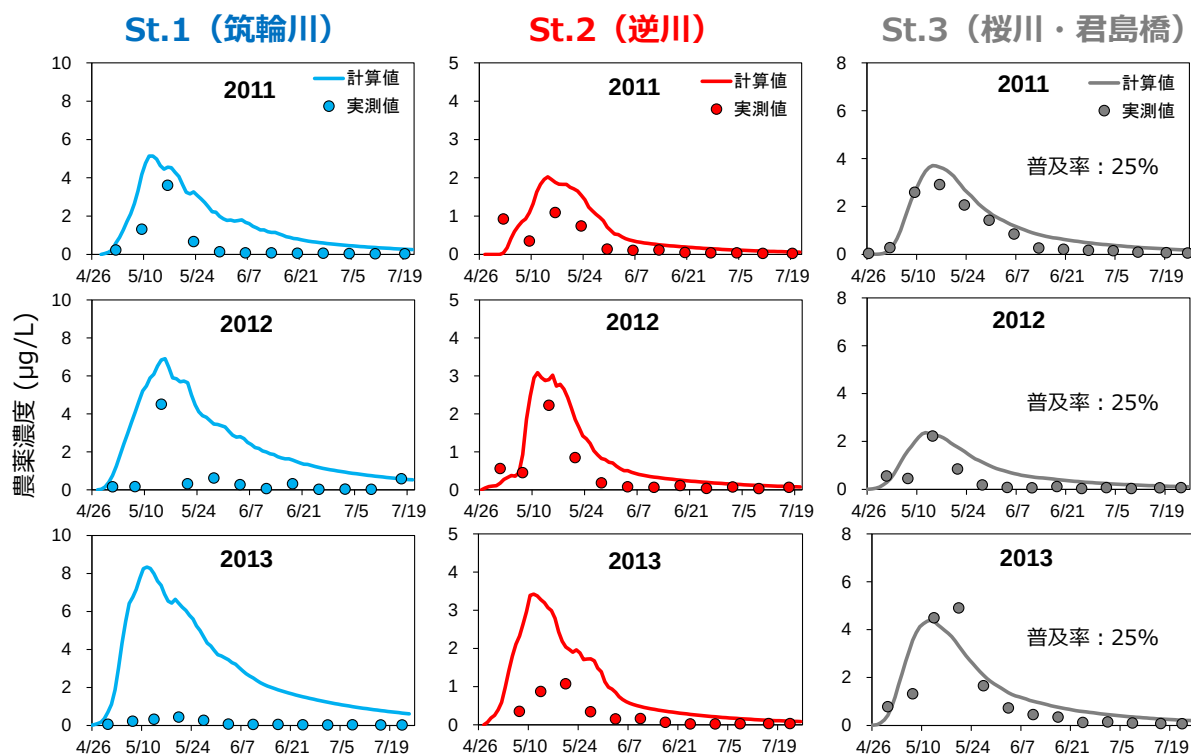
桜川流域を対象とした2011～2013年の農薬モニタリング結果を用い、開発した河川流域における農薬挙動予測モデル（GIS結合型PADDY-Large）の検証を行った。モデル計算において、水田における水収支（田面水深、水尻排水量、畦畔浸透量、降下浸透量）は、表(1)-8に示す標準シナリオの値を用いた。また、土壌の理化学性（容積重、全炭素含量）および河川流量は、流域内での平均的な値を設定した。また、農薬の使用量は農薬要覧による茨城県内出荷量を基に推定し、図(1)-9で推定した農薬散布日の分布に従い、対象流域内で均一に散布されたとした。

まず、畦畔浸透による水田から河川への農薬流出プロセスを追加した改良PADDY-Largeモデルの検証を行った。検証データに、茨城県逆川（St.2）における農薬モニタリング結果を用いた。その際、水尻排水に加え畦畔浸透を考慮して計算した場合（シナリオ１）と、水尻排水のみを考慮して計算した場合（シナリオ２）の２条件を設定し、実測値との比較を行った（図(1)-20）。畦畔浸透を考慮しない場合の計算値（シナリオ２）は、除草剤ダイムロンおよびイマゾスルフロンとともに、実測値に比べて濃度のピークが遅れて現れ、最高濃度も過小評価する結果となった。一方、畦畔浸透を考慮した場合の計算値（シナリオ１）は、実測値の濃度ピークが出現する時期と一致し、最高濃度もほぼ一致する結果となった。以上により、畦畔浸透による水田から河川への農薬流出の寄与は大きいことが示され、畦畔浸透に伴う農薬流出プロセスを考慮したモデル計算を行うことの妥当性が示唆された。

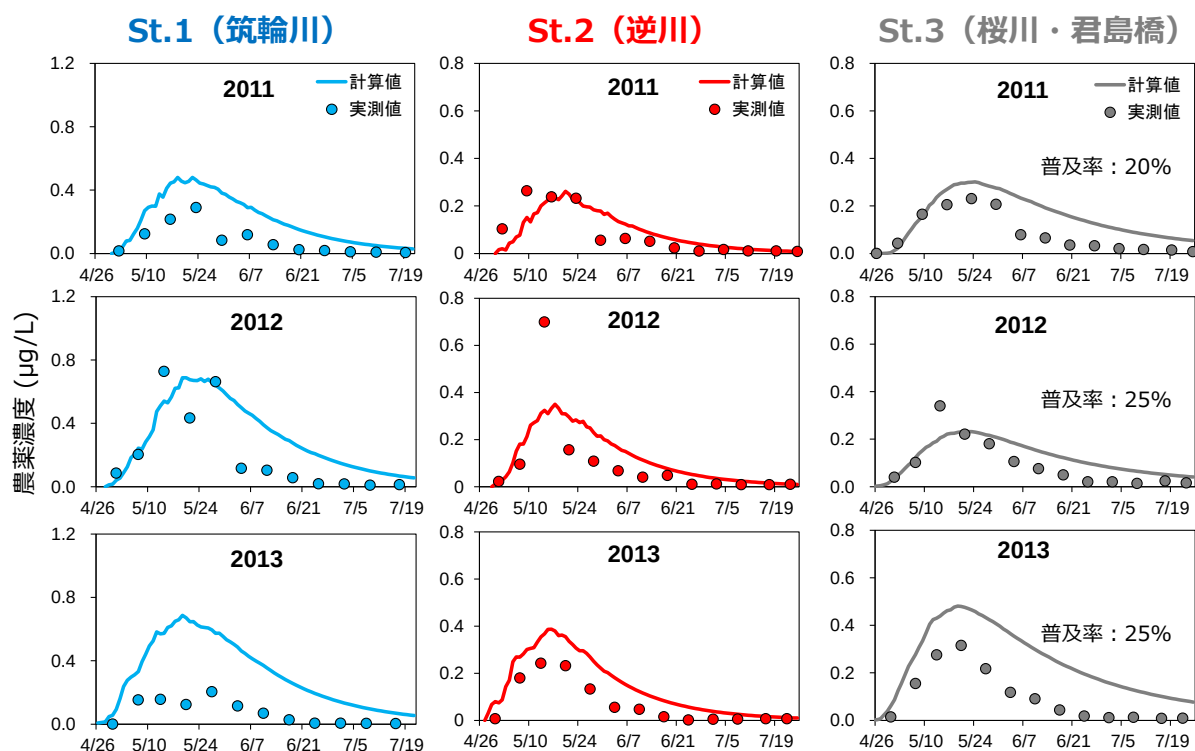


図(1)-20 除草剤ダイムロンとイマゾスルフロンの河川水中濃度の計算値と実測値の比較（シナリオ1：水尻排水＋畦畔浸透を考慮した場合、シナリオ2：水尻排水のみを考慮した場合）

図(1)-21に除草剤ダイムロンについて、2支川（St.1：筑輪川、St.2：逆川）および本川1地点（St.3：君島橋）における河川水中濃度の計算値と実測値を比較した。桜川の本流（St.3：君島橋）では、3年間ともに農薬濃度の計算値と実測値はよく一致した。一方、2支川では計算値と実測値との間で一部解離が見られ、特に、2013年の1支川（St.1：筑輪川）では、計算値が実測値に比べて過大評価する結果となった。この理由として、モデル計算における農薬の使用量は、茨城県内出荷量を基に対象流域内で均一に散布されとした場合の予測結果であるが、実際の農薬使用は地域や年度により大きく変動することに起因するものと推察された。また、除草剤ベンスルフロンメチルについても河川水中濃度の計算値と実測値を比較した結果、ダイムロンと同様の結果を示した（図(1)-22）。



図(1)-21 除草剤ダイムロンの河川水中濃度の計算値と実測値の比較（2011～2013年）

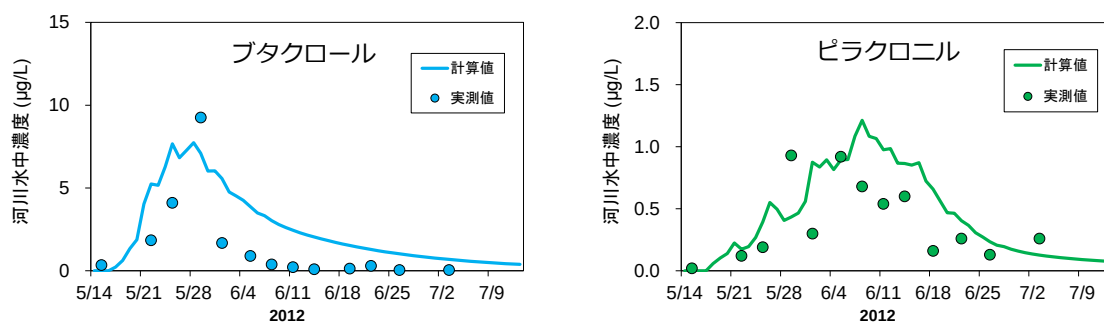


図(1)-22 除草剤ベンスルフロンメチルの河川水中濃度の計算値と実測値の比較（2011～2013年）

2) 長野県千曲川流域におけるモデルの検証

長野県広井川流域を対象とした2012および2013年の農薬モニタリング結果を用い、開発したGIS結合型PADDY-Largeの検証を行った。モデル計算において、水田における水収支は、表(1)-8に示す標準シナリオを用いた。また、土壌の理化学性（容積重、全炭素含量）および河川流量は、流域内での平均的な値を設定した。また、農薬の使用量は、調査地域を管轄するJAより聞き取り調査を行った結果により推定した。

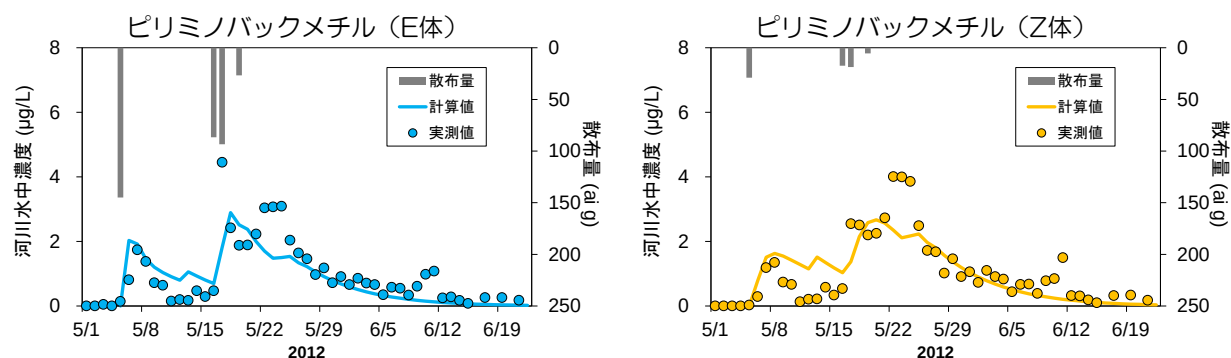
除草剤ブタクロールおよびピラクロニルについて、モデルによる河川水中濃度の計算値と実測値を比較した結果、PADDY-Largeモデルによる計算値は、実測値の濃度レベルや検出期間を精度良く予測できることが示された（図(1)-23）。



図(1)-23 2種類の除草剤の河川水中濃度の計算値と実測値の比較（広井川、2012年）

3) 滋賀県白鳥川流域におけるモデルの検証

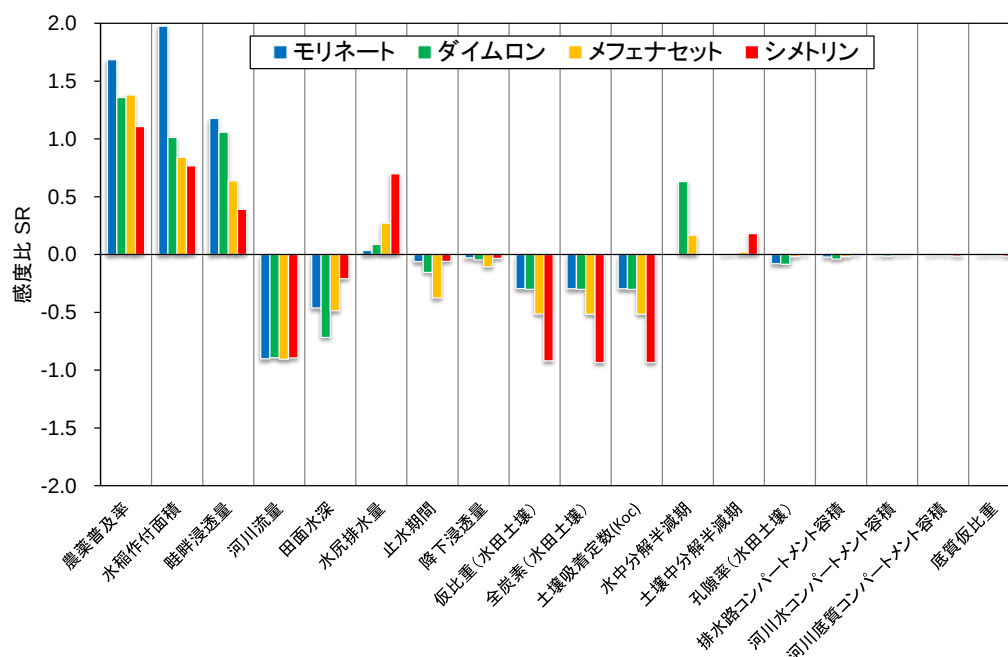
滋賀県藤間川流域を対象とした2012および2013年の農薬モニタリング結果を用い、開発したGIS結合型PADDY-Largeの検証を行った。モデル計算において、水田における水収支は、表(1)-8に示す標準シナリオを用いた。また、土壌の理化学性（容積重、全炭素含量）および河川流量は、流域内での平均的な値を設定した。また、農薬の使用実態は、JAのトレーサビリティシステムにおける栽培管理日誌により、圃場一筆ごとの散布除草剤の種類、散布量および散布日を設定した。除草剤ピリミノバックメチル（E体およびZ体）について、モデルによる河川水中濃度の計算値と実測値を比較した結果、PADDY-Largeモデルによる計算値は、実測値の濃度レベルや検出期間を精度良く予測できることが示された（図(1)-24）。このように、対象流域内における詳細な農薬の使用実態に関する情報（圃場一筆ごとの農薬の種類、散布量および散布日）が得られれば、本モデルにより農薬濃度を非常に精度良く予測できることが示唆された。



図(1)-24 除草剤ピリミノバックメチル（E体およびZ体）の河川水中濃度の計算値と実測値の比較（藤間川、2012年）

4) モンテカルロ法を導入した PADDY-Large モデルによる不確実性解析結果

図(1)-25に4種類の除草剤（モリネート、ダイムロン、メフェナセット、シメトリン）を対象とした感度分析の結果を示す。入力パラメータのうち、農薬の普及率、水稻作付面積および河川流量が、河川水中最高濃度に対し最も感度の高いパラメータであることが示された。続いて感度が高いのは、水田からの畦畔浸透量、田面水深であった。また、土壌に関連するパラメータ（仮比重、全炭素および土壌吸着定数）は、土壌吸着性が高い農薬ほど感度が高いことが示された。なお、田面水の降下浸透量、水田土壌の孔隙率、河川底質の仮比重、河川水および底質のコンパートメント容積などは、計算結果に対しほとんど影響を及ぼさないパラメータであることが示された。



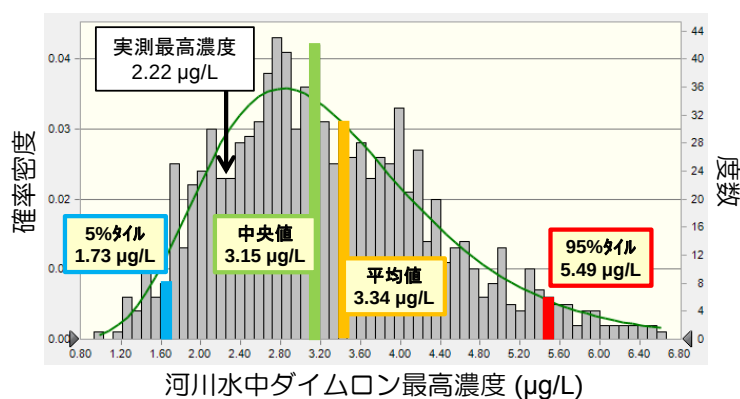
図(1)-25 4種の除草剤を対象としたPADDY-Largeモデルの感度分析結果（棒グラフは、各パラメータの河川水中最高濃度に対する感度比SRを示す）

農薬モニタリングを実施した茨城県桜川支流の逆川流域を対象とし、PADDY-Largeモデルを用いたモンテカルロ・シミュレーションによる河川水中濃度の不確実性解析を行った。感度分析の結果を踏まえ、入力パラメータの変動性を表現するための確率分布を表(1)-9のとおり設定した。

表(1)-9 入力パラメータの確率分布（逆川、除草剤ダイムロン）

パラメータ	単位	標準値	分布型	分布パラメータ	設定根拠
田面水深	mm	4.7	三角	Mode=47, Min=35, Max=52	標準シナリオ
水尻排水量	mm/day	0.25	三角	Mode=2.5, Min=1.0, Max=4.0	降雨パターンによる変動解析結果
畦畔浸透量	mm/day	2.2	一樣	Min=1.8, Max=2.6	標準値 ± 20%
降下浸透量	mm/day	1.1	一樣	Min=0.9, Max=1.3	標準値 ± 20%
止水期間	day	7	三角	Mode=7, Min=3, Max=9	使用上の注意事項
土壌仮比重	g/cm ³	1.22	正規	Mean=1.22, SD=0.07	実測データ
土壌全炭素	%	1.71	対数正規	Mean=1.71, SD=0.19	実測データ
水中分解半減期	day	2.68	三角	Mode=2.68, Min=2.41, Max=2.95	標準値 ± 10%
土壌中分解半減期	day	77	一樣	Min=69, Max=85	標準値 ± 10%
農薬普及率	%	25	三角	Mode=25, Min=15, Max=35	茨城県内出荷量(農薬要覧2012)
農薬散布日	—	5/11	対数正規	Mean=5/11, SD=6	田植期(農林水産統計2012) + 散布適期(農薬ラベル)
河川流量	m ³ /s	0.23	対数正規	Mean=0.23, SD=0.09	実測データ(2012)

表(1)-9に示す入力パラメータの確率分布に従って値をランダムに発生させ、PADDY-Largeモデルにより河川水中農薬濃度の計算を1000回繰り返して行った。除草剤ダイムロンの河川水中濃度（最高濃度）の5%タイル値、中央値、平均値および95%タイル値は、それぞれ1.73、3.15、3.34および5.49 $\mu\text{g/L}$ であった（図(1)-26）。2011、2012および2013年の最高濃度の実測値は、それぞれ1.09、2.22および1.07 $\mu\text{g/L}$ であり、モンテカルロ・シミュレーションによる濃度の確率分布と比較すると、最高濃度の実測値は20%タイル未満に位置づけられた。以上により、入力パラメータの不確実性を考慮したモンテカルロ・シミュレーションにより、農薬濃度の年次変動を考慮した曝露濃度の推定が可能となった。



図(1)-26 モンテカルロ・シミュレーションによる除草剤ダイムロンの河川水中濃度の確率分布

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

流域特性に関する情報をGISにより解析し、これらの情報を反映させた河川における農薬濃度予測モデル（GIS結合型PADDY-Large）を開発した。流域特性の異なる3河川の農薬モニタリング結果を用い、開発したモデルの妥当性を検証した結果、本モデルは実測濃度の推移を精度良く再現できることが示された。また、本モデルについて、入力データのバラツキに伴うモデル計算の不確実性を解析することで、対象流域における河川水中農薬濃度の年次変動を考慮した予測が可能となり、地域レベルでの曝露評価法を確立することができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省の中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会において、水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準値の超過が懸念される農薬に対し、河川におけるモニタリングの必要性が指摘されているが、本研究で開発した「GISを活用した地域レベルでの曝露評価法」を活用し、河川水中農薬濃度が高くなる流域を提示することにより、環境省が実施する平成25および26年度水質農薬残留調査の計画策定に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究では、国土交通省の国土数値情報より土地利用や流域界などに関する情報を入手し、地理情報システム（GIS）により河川流域ごとの水田面積を解析する手法を開発した。本手法により全国の河川流域における水田率を把握し、各河川の流量データを用い「流域Index＝水田率／比流量」を比較することで、河川水中農薬濃度が相対的に高くなる流域を推定することが可能となり、今後、環境省が実施する農薬モニタリングを行う際に適切な調査地点を選定できる。

6．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) N. IWASAKI, K. INAO, T. IWAFUNE, T. HORIO, H. OBARA: Limnology, 13, 221-235 (2012)
“Coupling of the PADDY-Large model with geospatial information for predicting paddy pesticide behavior in river basins“

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 稲生圭哉：農林水産研究ジャーナル，34, 7, 21-24 (2011)
「土壌情報と数理モデルを利用した河川における農薬濃度の推定」
- 2) 稲生圭哉：植調，45, 11, 461-468 (2012)
「水稻用除草剤の河川流域における挙動予測モデル(PADDY-Large)の開発」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 稲生圭哉，永井孝志，堀尾 剛，岩崎亘典，横山淳史：日本農薬学会第37回大会（2012）
「PADDY-Largeモデルによる水稻用農薬を対象とした河川水中濃度の不確実性解析」
- 2) N. IWASAKI, K. INAO, T. IWAFUNE, H. OBARA：SETAC Asia Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Development of the PADDY-Large model linked with GIS for predicting paddy pesticide behavior in river basins”
- 3) 堀尾剛、稲生圭哉、岩崎亘典、横山淳史、永井孝志、依田育子：日本農薬学会第38回大会（2013）
「茨城県桜川流域における水稻用農薬の挙動 一本流および支流における水中濃度の比較」
- 4) 稲生圭哉：環境科学会2013年会（2013）
「農薬の水域生態リスク評価における動態予測モデルの活用と今後の課題」
- 5) 岩崎亘典：農業環境技術研究所 第4回農業環境インベントリー研究会（2014）
「地理空間に関するオープンデータの現状と暴露評価への活用」
- 6) 稲生圭哉，堀尾 剛，岩崎亘典，横山淳史，永井孝志，依田育子：日本農薬学会第39回大会（2014）
「PADDY-Largeモデルを用いた茨城県桜川流域での水稻用農薬の動態予測－流域内における

農薬濃度の変動性とモデルによる予測精度－」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) FOCUS, <http://viso.ei.jrc.it/focus/index.html>
- 2) USEPA, <http://www.epa.gov/oppefed1/models/water/>
- 3) Y. MATSUI, S. ITOSHIRO, M. BUMA, T. MATSUSHITA, K. HOSOGOE, A. YUASA and T. INOUE: Water Science and Technology, 45(9), 141-148 (2002)
 “Predicting pesticide concentrations in river water with a hydrologically calibrated basin-scale runoff model”
- 4) 鈴木規之、村澤香織、松橋啓介、南齋規介、桜井健郎、森口祐一、田邊 潔、中杉修身、森田昌敏：環境化学、15、385-395 (2005)
 「全国河川の河道構造データに基づく化学物質の GIS 河川動態モデル（G-CIEMS）の開発と空間分布評価の試み」
- 5) 石川百合子、東海明宏：水環境学会誌、29、797-807 (2006)
 「河川流域における化学物質リスク評価のための産総研－水系曝露解析モデルの開発」
- 6) K. INAO, Y. ISHII, Y. KOBARA and Y. KITAMURA: Journal of Pesticide Science, 28, 24-32 (2003)
 “Landscape-scale simulation of pesticide behavior in river basin due to runoff from paddy fields using pesticide paddy field model (PADDY)”
- 7) 稲生圭哉・北條敏彦・安納弘親・宮崎さとえ・斎藤武司・朴 虎東：日本農薬学会誌、36、413-427 (2011)
 「シミュレーションモデル（PADDY-Large）を用いた水稻用農薬の河川流域における挙動予測：千曲川支流流域への適用」
- 8) 国土交通省：国土数値情報ダウンロードサービス
<http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/index.html>
- 9) 農林水産省：統計情報
<http://www.maff.go.jp/j/tokei/index.html>

- 10) 農業環境技術研究所：土壌情報閲覧システム
http://agrimesh.dc.affrc.go.jp/soil_db/
- 11) T. IWAFUNE, K. INAO, T. HORIO, N. IWASAKI, A. YOKOYAMA and T. NAGAI: Journal of Pesticide Science, 35, 114-123 (2010)
 “Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura River, Ibaraki, Japan”
- 12) K. INAO and Y. KITAMURA: Pesticide Science, 55, 38-46 (1999)
 “Pesticide paddy field model (PADDY) for predicting pesticide concentrations in water and soil in paddy fields”
- 13) K. INAO, Y. ISHII, Y. KOBARA and Y. KITAMURA: Journal of Pesticide Science, 26, 229-235 (2001)
 “Prediction of pesticide behavior in paddy field by water balance on the water management using pesticide paddy field model (PADDY)”
- 14) K. INAO., H. MIZUTANI, Y. YOGO and M. IKEDA: Journal of Pesticide Science, 34, 273-282 (2009)
 “Improved PADDY model including photoisomerization and metabolic pathways for predicting pesticide behavior in paddy fields: Application to the herbicide pyriminobac-methyl”
- 15) 鍬塚昭三、山本広基：土と農薬、（社）日本植物防疫協会、84-97 (1998)
- 16) M. SUDO, Y. GOTO, T. OKAJIMA, R. HORIUCHI and H. ODANI: Journal of Pesticide Science, 37, 140-147 (2012)
 “Effect of percolation flow on herbicide loss from rice paddies”
- 17) 環境省：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の改定について
<http://www.env.go.jp/water/dojo/sui-kaitei.pdf/>
- 18) S. H. VU, S. ISHIHARA and H. WATANABE: Pest Management Science, 62, 1193-1206 (2006)
 “Exposure risk assessment and evaluation of the best management practice for controlling pesticide runoff from paddy fields. Part 1: Paddy watershed monitoring”
- 19) 日本土壌協会：地力保全土壌図データ CD-ROM

（２）河川生態系の在来種を用いた新たな毒性試験法の開発

（独）農業環境技術研究所

有機化学物質研究領域

横山 淳史・永井 孝志

平成23～25年度累計予算額：24,788千円

（うち、平成25年度予算額：6,658千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

生態学的に重要な河川在来の水生昆虫であるコガタシマトビケラを用い、卵から若齢幼虫期の初期成長段階別急性毒性試験法を開発した。開発した試験法を用い、各種殺虫剤に対する感受性を評価した結果、成長に伴い殺虫剤に対する感受性が大きく変動することや、殺虫剤の作用機作によって高感受性の成長段階が異なることが判明した。また、コガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを開発し、殺虫剤の一時的な曝露からの回復性を考慮した個体群レベルでの毒性評価手法を開発した。開発したモデルを用い、個体群閾値濃度（個体群が存続可能な最大曝露濃度）をエンドポイントとして個体群の影響の受けやすさ（感受性）を評価した結果、個体群の感受性は、殺虫剤の作用機作、成長に伴う感受性変動パターンの違い、個体群の大きさ（個体密度）、個体群の年齢組成などの要因により変動することが示唆された。

わが国の河川付着藻類群集を代表する5種を試験生物として選定し、96穴マイクロプレートと蛍光プレートリーダーを用いた効率的な毒性試験法を開発した。作用機作の異なる様々な除草剤について毒性試験を行った結果、除草剤の作用機作により感受性の高い藻類種は明確に異なり、藻類種間の感受性差が1000～10000倍になる場合も見られた。開発した毒性試験法を活用することで、感受性の種間差を適切に反映した評価が可能となった。また、毒性試験による農薬曝露の後に、清浄な培地に移して回復性の評価を行う試験法を開発した。本試験法により付着藻類の生理状態と一過性の曝露からの回復性との関係を調べた結果、光合成活性（クロロフィル蛍光増加量）を指標とすることで、付着藻類の回復性を評価できる可能性が示唆された。5種の付着藻類について、各種除草剤を複数組み合わせ合わせた複合毒性試験を実施した結果、既存の知見とおり、作用機作が同じ農薬の場合はConcentration-Additive（CA）モデル、作用機作が異なる農薬の場合はResponse-Additive（RA）モデルで複合影響を予測可能であることが確認された。

〔キーワード〕

水生昆虫、個体群動態、付着藻類、回復性、複合影響

1. はじめに

近年、より適切な生態リスク評価を実施するために、比較的入手しやすい急性毒性データを活用して、感受性の種間差を統計学的に表現する種の感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）を用いた解析手法の検討が国内外で行われている。SSD解析において、除草剤は高等植物や藻類の急性毒性データを、殺虫剤は水生節足動物の急性毒性データを活用することが望ましい¹⁾。しかし、

これらの毒性データを得るための毒性試験法については、様々な課題が残されている。

わが国の水域生態リスク評価の対象として重要な河川生態系に注目すると、利用可能な試験生物種や試験法が非常に少ない。特に、河川生態系の生産者として重要な付着藻類については利用可能な試験生物種や試験法が整備されておらず、河川生態系における除草剤の生態リスクを適切に評価するためには、付着藻類の試験生物化と試験法の確立が求められている。一方、水生節足動物については、河川にも生息するヌカエビ、ヨコエビ、ユスリカの農薬テストガイドラインが整備されており、近年では河川生態系の重要な水生昆虫であるコガタシマトビケラ

(*Cheumatopsyche brevilineata*) の試験生物化に成功し、その有用性の検討やテストガイドライン化に向けた努力が行われている²⁾。このように水生節足動物では、SSD解析による感受性の種間差を評価する基礎的知見が得られつつある。しかし水生節足動物の中でも特に生態学的に重要な水生昆虫は藻類とは異なり生活史が複雑で、成長段階が分かれた構造化された個体群であることが多く、特定の成長段階にある個体のみを用いた毒性試験では、適切に毒性を評価できない可能性がある。したがって水生昆虫については新たな試験生物の整備よりも、生活史を考慮した毒性試験の高度化が優先的に求められている。

一方、農薬という評価対象化学物質に注目すると、農薬の使用は一年の決まった時期に限られるため、環境中の生物は常に農薬に曝露されているわけではない。より現実的に即した農薬の生態影響評価においては、一時的な曝露からの回復性を考慮する必要があるが、OECDテストガイドライン等の従来の毒性試験法では、回復性を適切に評価できない。付着藻類、水生昆虫ともに回復性を評価する毒性試験法の確立が求められている。また複数の農薬が水系に流出した場合、水生生物が複合曝露される可能性がある。特に除草剤では、複数の剤が数 $\mu\text{g/L}$ のオーダーで同時に河川水中から検出されることがあり³⁾、付着藻類に対する複合影響を評価することが喫緊の課題となっている。

毒性評価における解決すべき課題をまとめると、水生昆虫においては生活史を考慮した毒性評価法を高度化し、一時的曝露からの回復性を評価することができる個体群レベルでの影響評価法を開発することが求められている。一方、付着藻類については新たな試験生物種・試験法を確立し、回復性および複合影響を評価する手法の開発が求められている。

2. 研究開発目的

コガタシマトビケラは試験生物化に成功した数少ない在来の河川棲水生昆虫であり、生態学的にも水産動物の餌震源としても重要な生物の一つである。本研究ではコガタシマトビケラを用いて、水生動物に対する毒性データの少ない殺虫剤の急性毒性データを整備し、コガタシマトビケラの試験生物としての有用性を検討した。より適切なリスク評価手法の確立に向け水生昆虫の毒性評価手法を高度化することを目的として、トビケラの初期成長段階別毒性試験法を開発し、殺虫剤感受性の成長に伴う変動を評価した。また、殺虫剤の一時的曝露からの回復を考慮した個体群レベルでの毒性評価を行うために、コガタシマトビケラの個体群動態モデルを開発した。個体群動態モデルを用いて個体群レベルでの影響評価を実施し、種の感受性分布(SSD)の解析結果と比較することにより、個体レベル試験の急性毒性データのみを用いて行われるSSD解析について、個体群レベルの観点から意義づけを行った。

河川生態系における除草剤の適切な影響評価法の開発に資するため、河川生態系の一次生産者

として重要な付着藻類について、わが国の河川付着藻類群集を代表する5種を試験生物として選定し、至適培養条件等の確立を行うとともに、効率的な毒性試験法を開発した。また、付着藻類の毒性試験による農薬曝露の後に、清浄な培地に移して回復性の評価を行う試験法を開発した。さらに、各種農薬を複数組み合わせ合わせた複合毒性試験を実施するとともに、複数農薬の曝露による複合毒性を予測する手法を開発した。

3. 研究開発方法

(1) 水生昆虫を用いた毒性評価法の開発

1) 1齢幼虫に対する殺虫剤の毒性評価

コガタシマトビケラ1齢幼虫の感受性データは、古くから上市されている殺虫剤を中心にこれまでに整備され、特に、ネオニコチノイド系およびネライストキシシン系殺虫剤に対するトビケラの感受性は、標準試験生物種であるオオミジンコに比べて非常に高いことが報告されている²⁾。これらの殺虫剤については、トビケラ以外の様々な水生生物の毒性データが整備されており、SSD解析手法を用いたリスク評価に活用されている⁴⁾。一方、上市されて間もない殺虫剤については、トビケラを含めその他の水生節足動物についても毒性データがほとんど整備されていない。そこで、コガタシマトビケラの試験生物種としての有用性を検討し、リスク評価に活用可能な毒性データを整備するために、比較的新しい剤を中心に5剤の殺虫剤（クロラントラニリプロール、エチプロール、スピノサド、メトキシフェノジド、ピリプロキシフェン）を選定し、コガタシマトビケラの1齢幼虫（ふ化24時間以内）を用いた48時間の急性毒性試験を実施した。毒性試験法は「コガタシマトビケラ1齢幼虫を用いた農薬の急性毒性試験法マニュアル」⁵⁾に従った。試験結果とミジンコ類の感受性を比較することにより、コガタシマトビケラの有用性の検討を行った。

2) 初期成長段階別毒性試験法の開発

水生生物は初期成長段階ほど化学物質に対する感受性が高い傾向にあると言われている⁶⁾。例えば、セスジユスリカ1齢幼虫は4齢幼虫に比べ有機リン系殺虫剤のフェンチオンに数十倍も感受性が高いことが報告されている⁷⁾。しかし、ヨコエビの一種*Hyalomma azteca*では若齢個体でダイアジノン感受性が低いことが知られており⁸⁾、成長に伴う感受性変動は化学物質の種類や生物種により大きく異なる。河川生態系で重要な位置を占める水生昆虫については、成長に伴う感受性変動に関する知見は少ない。特に、卵期は生活史において活発に器官形成（薬剤の作用点形成）が行われる特筆すべき成長段階であるにもかかわらず、卵期における農薬等化学物質の影響を評価した研究例はほとんどない⁹⁾。水生昆虫の種類によってはトビケラのように卵期が比較的長く、この時期に化学物質に曝露されると忌避行動をとれずに、その影響を直接受け続ける可能性がある。また、特定の成長段階の個体のみを用いた急性毒性試験の結果に基づいて実施される現行の農薬の生態リスク評価では、成長に伴う感受性の変動が考慮されていないため、リスクを過大もしくは過小評価する可能性がある。水生昆虫の毒性評価を高度化し適切な農薬の生態リスク評価法の確立に資するため、本研究ではまず、コガタシマトビケラを用いた卵期の急性毒性試験法の開発を試みた。

卵期急性毒性試験における曝露期間、曝露のタイミングを決定するにあたり、コガタシマトビケラ卵を産卵用基板から剥離させ、胚発生を光学顕微鏡で観察した。その結果、ヒゲナガカワト

ビケラ *Stenopsyche marmorata* の発生過程¹⁰⁾と比定することができた。以下に室温20℃におけるコガタシマトビケラ卵の発生過程について概説する(図(2)-1)。産卵1日後(E1期)は胚盤形成期に比定され、胚体は細胞性の羊漿膜で保護されていると考えられる。産卵2日後(E2期)にはコガタシマトビケラ卵は吸水し体積が増大する。産卵2～3日後は胚体が縦に伸長し、付属肢の形成が始まる。



図(2)-1 コガタシマトビケラ卵の発生過程

産卵4日後(E4期)は胚体が横に拡張する前胚反転期に比定される。産卵5日後(E5期)から昆虫胚特有の胚運動である胚反転(トビケラの場合、「姿勢転換」ともいう)が始まるとともに、神経系が発達しはじめる。産卵6日後(E6期)には胚反転が終了するが、胚体を包む羊漿膜はまだ存在する。産卵7日後(E7期)は後胚反転期に比定される。胚体を包んでいた羊漿膜が消失し、二次背器が形成される。この時期には胚体をくねらせるなどの筋肉運動が活発となる。産卵8日(E8期)以降、二次背器は次第に縮小し消失する。背閉鎖が完了し胚体の体壁が完全に閉じた状態となる。卵黄は胚体の消化管内に取り込まれる。産卵9日(E9期)以降、消化管内に取り込まれた卵黄が消費され、胚体の構造はかなり1齢幼虫に近くなる。産卵9日後には体毛が可視化するとともに大顎が赤褐色に色づき、翌日の10日後に一斉にふ化を開始する。ふ化開始の半日ほど前から胚の咽頭が拍動し始めて体内に水分を取り込み、頭部を膨張させる。ふ化時には全身を細かく振るわせ卵歯を卵殻にこすりつけ、卵殻を破ってふ化する。なお産卵用基板から卵塊を剥離させずに胚発生させると、ふ化までの時間が1～2日程度長い傾向が見られた。剥離させた場合は卵の全面から溶存酸素が供給され胚発生が促進されると推測された。

曝露期間の検討では、曝露期間を産卵1日後から各々2、4、6、8日間に設定した。曝露のタイミングの検討では曝露期間を2日間に固定し、異なる発生段階で曝露を行った。試験対象とする発生段階については、化学物質の取り込みに関係すると考えられる羊漿膜の有無や殺虫剤が作用する器官の形成・発達などに注目し、前述の発生過程の特徴からE1、E4、E7期の卵に決定した。E1期は曝露期間中、卵膨張時に試験水を吸収し被験物質の取り込みが増加する可能性がある発生段階である。E4期は曝露期間中に胚反転が起こり、神経系が発達し始める時期である。これらの変化は殺虫剤の取り込みや感受性に影響を及ぼす可能性があると考えられる。E7期は曝露期間中に羊漿膜が消失し、胚体の神経系・筋肉系器官が発達して1齢幼虫に近い体の構造となる。つまり各種殺虫剤の器官(作用点)がほぼ完成する時期であると考えられる。

試験に使用する卵は、農業環境技術研究所で室内継代飼育されているM系統を用いた¹¹⁾。毎日採卵し、光学顕微鏡で発生段階を確認したのち、実体顕微鏡下でタングステン針を用いて卵塊を5～20卵の断片に裁断して試験に用いた。

処理区ごとにガラス製ビーカーに200 mLの試験水を調整し、これに20個の卵を投入し所定の期

間曝露した。曝露期間中、ロータリーシェーカーで70 rpmの回転速度で試験水を攪拌した。曝露終了後に試験卵を清浄な飼育水200mLで通水洗浄し、清浄な飼育水（3 mL/穴）を満たしたポリスチレン製24穴プレートに洗浄卵を移してふ化期まで蓄養した。蓄養水は毎日交換した。各処理区のふ化率およびふ化幼虫の48時間後生存率をエンドポイントとし半数致死濃度（LC₅₀）を算出した。対照区のふ化が始まってから7日経過してもふ化しない卵は死亡と判定した。試験水の薬剤濃度は、曝露開始時と終了時にLC/MS/MS分析により確認し、実測濃度をもとにLC₅₀値の計算を行った。各曝露期間のLC₅₀値は、SAS ver.9.3を用いてロジットモデルにより算出した。曝露期間、曝露濃度、死亡率の関係については、式(2.1)のcomplementary log-logモデル¹²⁾により解析を行った。

$$\text{死亡率} P = 1 - \exp(-\exp(\alpha \times \log_{10}(\text{曝露期間}) + \beta \times \log_{10}(\text{曝露濃度}) + \gamma)) \quad (2.1)$$

ここで、 α および β は偏回帰係数を、 γ は切片を表している。

コガタシマトビケラ卵の殺虫剤に対する応答を把握するために、供試薬剤には幅広い作用機作の殺虫剤を選定した（表(2)-1）。曝露期間の検討試験では、神経系に作用するカーバメート系殺虫剤のカルボスルファン、合成ピレスロイド系殺虫剤のエトフェンプロックス、昆虫成長制御剤のブプロフェジンの3剤を用いた。曝露のタイミングに関する試験では上記3剤に加え、昆虫成長制御剤のピリプロキシフェン、テブフェノジド、主に筋肉系に作用するジアミド系殺虫剤のクロラントラニリプロールの計6剤を試験に供した。

表(2)-1 卵期急性毒性試験に供試した殺虫剤の特性

供試薬剤	IRACによる作用機作分類			水 溶 解 度 (mg/L)
カルボスルファン	1A	アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	神経系に作用	3
エトフェンプロックス	3A	ナトリウムチャンネルモジュレーター	神経系に作用	0.0225
ピリプロキシフェン	7C	幼若ホルモン類似剤	成長調節	0.367
ブプロフェジン	16	キチン生合成阻害剤タイプI	成長調節	0.387
テブフェノジド	18	脱皮ホルモン受容体アゴニスト	成長調節	0.83
クロラントラニリプロール	28	リアノジン受容体モジュレーター	神経及び筋肉系に作用	1.023

*作用機構の分類は引用文献13に従った。

コガタシマトビケラの1齢幼虫は成長に伴い、ふ化の約8日後より2齢幼虫に、約16日後より3齢幼虫に脱皮することが判明している。従って8日齢、16日齢前後の幼虫を用いた毒性試験法を開発すれば、脱皮期における殺虫剤の影響を評価することが可能である。そこで9日齢および15日齢幼虫を用いた48時間急性毒性試験を検討した。9日齢幼虫（試験開始時1齢幼虫）の試験法は、「コガタシマトビケラ1齢幼虫を用いた農薬の急性毒性試験法マニュアル」⁵⁾に従った。15日齢幼虫（試験開始時2齢幼虫）の試験では、試験容器の容量を拡大するとともに、ロータリーシェーカーで試験液を攪拌し、流水環境を再現して毒性試験を実施した。供試薬剤には昆虫成長制御剤のメトキシフェノジドを使用した。

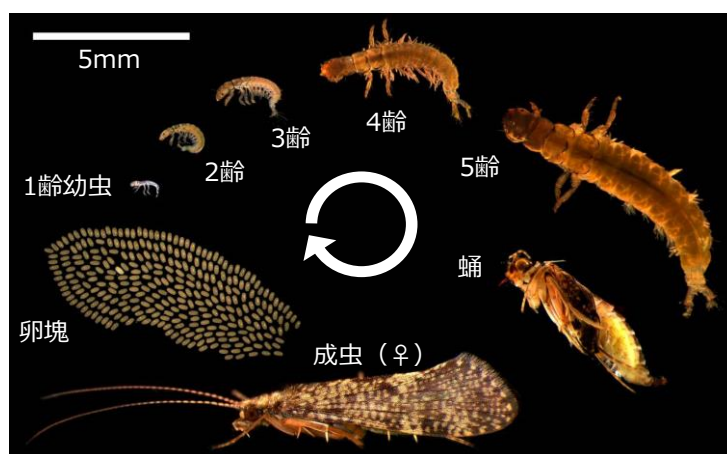
3) 個体群レベルでの影響評価法の開発

前述のように、農薬等化学物質の生物に対する感受性は成長に伴い変動するため、ある一定の成長段階の個体のみで化学物質の影響を評価すると、リスクを過小あるいは過大評価する可能性

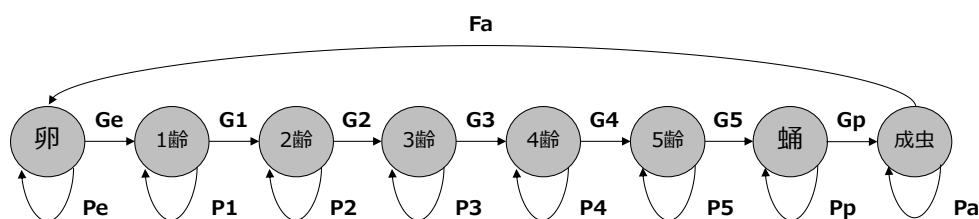
がある。より望ましい生態リスク評価では、個体群の持続や生態系の保全を目標とすることから、対象生物の生活史を考慮した適切な成長段階を含む個体群レベルでの影響評価を行う必要がある。河川棲水生昆虫の個体群レベルでの影響評価法を確立するためには、対象生物の生活史パラメータ（各齢期の死亡率、羽化率、産卵率等）を把握し個体群動態モデルを開発する必要がある。しかしながら、害虫に比べると河川棲水生昆虫の生活史パラメータについてはこれまでほとんど研究されていなかった。

本研究では、試験生物化に成功した数少ない河川棲水生昆虫であるコガタシマトビケラの幼虫を用いて成長試験を実施し、生活史パラメータを調査した。ふ化24時間以内の1齢幼虫50個体を飼育水（水深5 cm）の入ったガラス製結晶皿（直径12 cm、高さ8 cm）に投入し、室温20℃の恒温室で飼育を行った。飼育容器には底質としてガラスビーズを入れ、飼育水をスターラーで攪拌した。成長試験は2反復で行い、個体数および齢期を2日ごとに記録した。給餌と水替えは「コガタシマトビケラの飼育法マニュアル」¹¹⁾に準じた。得られた成長段階別個体数頻度分布データを基に、各齢期の死亡率¹⁴⁾および平均期間¹⁵⁾を算出した。成虫の性比、産卵率、産卵数、ふ化率については、農業環境技術研究所で維持しているM系統（F37～F40世代）の室内累代飼育記録より算出した。

コガタシマトビケラの生活史を図(2)-2に示す。コガタシマトビケラは卵、幼虫（1齢～5齢）、蛹および成虫の成長段階を持つ完全変態昆虫であり、成虫以外は水中で生活する。



図(2)-2 コガタシマトビケラの生活史



図(2)-3 コガタシマトビケラの生活史の流れ図

Ge～Gp：ステージ間の移行率（時間tからt+1にかけて次ステージに成長する個体の割合）、Pe～Pa：ステージ内の生存率（時間tからt+1にかけて同一ステージ内に留まっている生存個体の割合）、Fa：繁殖率

各成長段階の関係性を流れ図で示すと図(2)-3のようになる。この流れ図を基にレフコビッチ推移行列モデル¹⁶⁾を構築し、コガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを開発した。レフコビッチ推移行列モデルは齢、ステージ、サイズ等、構造のある個体群を扱うことができ、ネットアイシマカの個体群動態研究などに利用されている¹⁷⁾。図(2)-3に示した行列モデルの各パラメータ（Ge～Gp、Pe～Pa、Fa）は、室内飼育個体群の生活史パラメータより推定した。

ステージ間の移行率(G_i)およびステージ内の生存率(P_i)は、式(2.2)および(2.3)により算出した¹⁷⁾。

$$G_i = \frac{s_i^{d_i}(1-s_i)}{1-s_i^{d_i}} \quad (2.2)$$

$$P_i = \frac{s_i(1-s_i^{d_i-1})}{1-s_i^{d_i}} \quad (2.3)$$

ここで、 d_i は成長ステージ i の平均期間、 S_i は成長ステージ i の生存率から求めた日生存率を表す。繁殖率(F_a)は1個体の成虫が1日に産む卵数であり、性比と♀1個体あたりの産卵数から算出した。これらの行列パラメータから、コガタシマトビケラのレフコビッチ推移行列 A は式(2.4)で表される。

$$A = \begin{pmatrix} P_e & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & F_a \\ G_e & P_1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & G_1 & P_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & G_2 & P_3 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & G_3 & P_4 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & G_4 & P_5 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & G_5 & P_p & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & G_p & P_a \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

式(2.4)の最大固有値 λ 、安定年齢組成および繁殖価は、数値計算ソフトウェアMatlabで求めた。また各行列パラメータの感度と弾力性を計算した。

式(2.4)は個体数が無限に増大するモデルであるが、実際の室内飼育個体群は環境収容力に制限があるため無制限に個体数が増加することはない。そこで式(2.4)に密度依存性を組み込んだ。トビケラ室内個体群の密度効果はコンテスト型（勝ち残り型）を想定し、幼虫期に作用すると仮定した。コンテスト型として一般的に知られており、式(2.5)で表されるBeverton-Holt関数を適用した。

$$N_{t+1} = N_t \times \lambda \times K / (\lambda \times N_t - N_t + K) \quad (2.5)$$

ここで、 N_t は時間 t における個体数、 N_{t+1} は時間 $t+1$ における個体数、 K は上限値を示す。室内飼育記録の成虫数と、密度依存性を考慮したレフコビッチ推移行列モデルの成虫数がほぼ一致するように K の値を設定した。コガタシマトビケラの室内飼育では成虫数と産卵数が毎日記録されている。この室内飼育記録の卵数と成虫数の比率をモデルのシミュレーションで得られた卵／成虫比と比較することにより、開発した個体群動態モデルの妥当性を評価した。

有機リン系殺虫剤フェニトロチオン、ネオニコチノイド系殺虫剤イミダクロプリド、ジアミド系殺虫剤クロラントラニリプロールの3剤について、開発した個体群動態モデルによる個体群レベルでの影響評価を行った。1齢～5齢幼虫に対するフェニトロチオンおよびイミダクロプリドの濃度-反応曲線は、Yokoyamaら¹⁸⁾の結果を引用した。この2剤の卵期における濃度-反応曲線およびクロラントラニリプロールの2～5齢幼虫に対する濃度-反応曲線は、Yokoyamaら¹⁸⁾の方法に準じて48時間急性毒性試験により整備した。得られた濃度-反応曲線の関数を個体群動態モデルに組み込むことにより、任意の殺虫剤濃度で48時間曝露されたときの個体数の変動を計算した。

さらに、個体群レベルでの毒性評価結果とSSD解析結果を比較することにより、個体レベル試験の急性毒性データのみを用いて行われるSSD解析について、個体群レベルの観点から意義付けを行った。

（２）付着藻類を用いた毒性評価法の開発

１）試験候補種の選定と効率的な毒性試験法の開発

湖沼では水中に浮遊するプランクトン性藻類が優占するのに対し、流れのある河川では河床の砂や石に付着して生活する付着藻類が優占する。河川生態系においては、川底の石の表面に付着藻類が群体（いわゆる水苔）を形成し、一次生産者としてや、水生昆虫、魚類の餌として重要な生物群となっている。しかしながら、これまでの毒性評価には、主として湖沼で優占する緑藻の毒性データが利用されてきたため、わが国の河川生態系の重要な生産者である付着藻類種に対する毒性データはほとんど整備されていなかった。そこで、複数の付着藻類の試験生物種の選定を行い、生物種による感受性の変動性を明らかにすることが必要となる。しかし、OECDテストガイドラインに代表される従来の毒性試験法では、複数の藻類種に対し多数の試験を行うには多大な労力がかかり、そもそも付着藻類の試験には適さない。そこで、マイクロプレートと蛍光プレートリーダーを用いるハイスループット（時間と経費を節約するための高速な化学物質評価）の試験系を構築し、本試験系に適用可能な付着藻類種を選定した。

候補種の選定根拠として以下の事項を考慮した。①わが国の河川に広く分布している種であり、河川の生物調査でよく観察されること、②幅広い分類群からの種を含むこと（珪藻、緑藻、藍藻など、実際の河川における種数のバランスを考慮する）、③幅広い適応環境から種を選定すること（好清水性種、広適応性種、好汚濁性種など）。これらの条件を満たす候補種として、表(2)-2に掲げる8種11株を用いて検討を行った。

表(2)-2 感受性検定を行った藻類の候補種名と維持管理条件

種名	株名		保存培地	寒天培地 での保存	寒天保存の 植継期間	液体保存の 植継期間	液体 植継量	保存時 光強度	温度
					月	日	ml/15ml	lux	℃
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NIES-35	緑藻	C	○	3	28	0.2	1000	23
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	NIES-797	緑藻	C	○	3	28	0.2	1000	23
<i>Mayamaea atoms</i>	NIAES K11-11	珪藻	CSi	○	1	28	1	1000	20
<i>Nitzschia palea</i>	NIAES PD3	珪藻	CSi	○	1	×	×	1000	20
<i>Nitzschia palea</i>	NIAES U3-3	珪藻	CSi	○	1	×	×	1000	20
<i>Nitzschia palea</i>	NIES-487	珪藻	CSi	○	1	28	1	1000	20
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	NIES-71	珪藻	CSi	○	1	28	1	1000	20
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	NIES-414	珪藻	CSi	○	1	28	1	1000	20
<i>Navicula pelliculosa</i>	UTEX-B673	珪藻	CSi	○	1	28	1	1000	20
<i>Pseudanabaena galeata</i>	NIES-512	藍藻	CT	×	×	14	1	500	23
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NIES-73	藍藻	CB	×	×	20	1	1000	23

候補種として選定した各藻類株の維持保存条件と試験条件を検討した（表(2)-2）。寒天培地での継代保存は、藍藻2株を除いて可能であった。液体培地での継代保存は、珪藻*Nitzschia palea*の2株を除いて可能であった。この2株については、前培養も寒天培地で行うこととした。次に、96穴のマイクロプレートによる培養条件と、蛍光プレートリーダーによる藻類の自家蛍光測定の方法を決定し、藻類の毒性試験における標準物質の3,5-ジクロロフェノール（DCP）を用いて感受性検定を行った。以上の結果を踏まえ、試験生物種として以下の5種を選定した。*Desmodesmus subspicatus* NIES-797、*Nitzschia palea* NIES-487、*Achnanthydium minutissimum* NIES-71、*Navicula pelliculosa* UTEX-B673、*Pseudanabaena galeata* NIES-512。

選定した5種の試験生物種を用いて、蛍光マイクロプレートアッセイを応用した効率的な毒性試

験法を開発した。選定種を用いた毒性試験の効率化を図るため、光や温度、培地などの試験条件を可能な限り統一させるための検討を行った。その結果、光強度を3000 lux、温度を22℃、CSi培地を用いるとした条件より、選定5種全てにおいてOECDガイドライン201に記載された試験の妥当性基準（試験期間の増殖率、コントロール試験の再現性、増殖の直線性）を達成可能であることを確認した。このように、統一した条件下で5種同時毒性試験が可能となるため、毒性試験を効率化することが可能となった。

開発した試験法を用いて、表(2)-3に示す20種類の除草剤の毒性試験を行った。96穴マイクロプレートを用いて藻類を培養し、細胞の増殖は蛍光プレートリーダーを用いて測定した。試験期間は4日間とし、期間中の対数増殖期の増殖速度の阻害率をエンドポイントとして、EC₁₀とEC₅₀を計算した。被験液の濃度分析はLC-MS/MSを用いて行い、試験期間の最初と最後の濃度の幾何平均値を解析濃度とした。各種除草剤の5種のEC₅₀値を対数正規分布に適合させ、種の感受性分布（species sensitivity distribution, SSD）のパラメータである対数平均（ln Mean）と対数標準偏差（ln SD）を決定した。

表(2)-3 毒性試験の対象とした20種類の除草剤の特性

除草剤	CAS No.	作用機作 ^a	水溶解度 (mg/L)	緑藻標準種のEC50 (μg/L)
シハロホップブチル	122008-85-9	A	0.44	>1000
ベンスルフロンメチル	83055-99-6	B	6.7	56.6
シクロスルフアムロン	136849-15-5	B	6.5	3.5
ピリミスルファン	221205-90-9	B	89	59
フルセトスルフロン	412928-75-7	B	16.5	>98800
シメトリン	1014-70-6	C1	482	18.9
ペントキサゾン	110956-75-7	E	0.216	0.846
ピラクロニル	158353-15-2	E	50.1	5.4
オキサジアルギル	39807-15-3	E	0.37	7.3
テフリルトリオン	473278-76-1	F2	64200	5300
ベンゾフェナップ	82692-44-2	F2	0.12	>268
ベンゾビシクロン	156963-66-5	F2	0.052	>1000
プレチラクロール	51218-49-6	K3	74	2.92
ブタクロール	23184-66-9	K3	16	3.15
メフェナセット	73250-68-7	K3	5.2	80.1
カフェンストロール	125306-83-4	K3	2.5	2
フェントラザミド	158237-07-1	K3	2.3	6.04
ベンフレセート	68505-69-1	N	261	7300
エスプロカルブ	85785-20-2	N	4.92	66
オキサジクロメホン	153197-14-9	Z	0.15	>11700

^a A: acetyl CoA carboxylase阻害、B: acetolactate生合成阻害、C1: 光化学系II阻害、E: protoporphyrinogen oxidase阻害、F2: 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase阻害、K3: 超長鎖脂肪酸生合成阻害、N: 脂質生合成阻害、Z: その他

2) 付着藻類を用いた回復性試験法の開発

前述の毒性試験では、継続的な曝露を受けた場合の影響を評価するものである。しかし、実際の河川水中における農薬の曝露は一過性であるため、一時的に影響を受けてもその後回復するこ

とが想定される。これまでの研究事例によれば、藻類の増殖がほぼ抑えられた状態から清浄な培地に移した場合、その回復の早さは除草剤によって異なることが知られている。この理由として、細胞の生理状態に与える影響の違いが関係していることが示唆されている。すなわち、増殖は抑えるが細胞が死んでいない場合には回復が早く、致死性が強い影響の場合には回復が遅くなる。そこで、前述のマイクロプレートを用いた付着藻類の毒性試験法を改良し、藻類細胞の生理状態の把握が可能な回復性試験法を開発することとした。

藻類細胞の生理状態を把握するための、マイクロプレートを用いた測定が可能な技術として、①生細胞数を評価対象とするATP発光の測定、②死細胞数を評価対象とするCellTox-Green蛍光の測定、③光合成活性を評価対象とするDCMU (PSII阻害剤) 添加によるクロロフィル蛍光の増加量、の3つを適用することとした。ATPは生細胞数に比例して存在し、ATPとルシフェラーゼの反応による発光を測定することで定量化した。また、細胞死によって体外に放出される微量のDNAと結合することで、緑色の蛍光を発するCellTox-Green蛍光試薬を用いて、死細胞数由来のDNAを定量化した。PSII阻害剤のDCMUを添加した場合にクロロフィル蛍光の増加が見られるが、この増加量は光合成に使用されたエネルギー量とみなせるため、蛍光増加量を光合成活性として定量化した。

試験種として珪藻*Navicula pelliculosa*を用い、その生細胞とグルタルアルデヒド0.1%で1日間処理した死細胞を各種密度で調整した。これらの培養液を用いて、ATP発光、Celltox-Green蛍光、光合成活性を測定した。また、参照物質として3,5-ジクロロフェノールを用い、48時間マイクロプレートで毒性試験を行い、ATP発光、Celltox-Green蛍光、光合成活性を測定した。さらに、48時間曝露させた藻類細胞を清浄な培地に移し、48時間の追加培養を行う回復性試験を実施した。

3) 付着藻類を用いた複合毒性試験と複合影響予測モデルによる解析

個別の除草剤に対する毒性試験を実施する場合と同様に、各種除草剤を5種類組み合わせた複合毒性試験を行った。除草剤の組み合わせとして、作用機作が同じ除草剤を混合した場合と、作用機作が異なる除草剤を混合した場合の2組を設定し、それぞれの除草剤の毒性試験結果から解析したSSDの5, 10, 20, 30, 40, 50パーセンタイルの濃度（それぞれHC₅, HC₁₀, HC₂₀, HC₃₀, HC₄₀, HC₅₀）で混合した（表(2)-4）。

表(2)-4 複合毒性試験の組み合わせと濃度設定（作用機作の記号は表(2)-3に同じ）

除草剤	作用機作	ln Mean	ln SD	濃度 (μg/L)					
				HC ₅	HC ₁₀	HC ₂₀	HC ₃₀	HC ₄₀	HC ₅₀
複合1 プレチラクロール	K3	7.75	2.01	84	175	425	804	1387	2310
複合1 ブタクロール	K3	7.38	2.04	56	117	288	551	959	1608
複合1 メフェナセット	K3	8.65	1.27	706	1121	1963	2939	4150	5729
複合1 カフェンストロール	K3	7.86	2.94	20	60	218	554	1231	2596
複合1 フェントラザミド	K3	8.32	2.39	81	192	550	1173	2241	4106
複合2 プレチラクロール	K3	7.75	2.01	84	175	425	804	1387	2310
複合2 ベンスルフロンメチル	B	7.13	3.44	4.4	15	69	206	524	1253
複合2 ピラクロニル	E	5.61	3.16	1.5	4.8	19	52	122	272
複合2 エスプロカルブ	N	7.54	1.00	363	521	809	1111	1457	1877
複合2 シメリン	C1	3.55	0.58	14	17	22	26	30	35

上記の複合毒性試験で得られた結果を用いて、既存の複合影響予測モデルにより解析を行った。作用機作が同じ農薬を混合した場合の複合影響は、Concentration-Additive (CA) モデルを活用した。CAモデルでは、基本的には毒性値 (EC50) で重み付けした農薬濃度を足し算する方法で、Toxic Unit (TU) を次式により計算する。

$$TU = \text{農薬濃度} / \text{毒性値} \quad (2.6)$$

例えば、作用機作が同じである農薬Aと農薬Bの複合影響は、式(2.7)で表される。

$$TU_{\text{mixture}} = TU_A + TU_B = [\text{農薬A}] / EC50_A + [\text{農薬B}] / EC50_B \quad (2.7)$$

毒性値で重み付けした農薬濃度である[農薬A']および[農薬B']は、式(2.8)、(2.9)により求められる。

$$[\text{農薬A}'] = TU_{\text{mixture}} \times EC50_A \quad (2.8)$$

$$[\text{農薬B}'] = TU_{\text{mixture}} \times EC50_B \quad (2.9)$$

[農薬A']、[農薬B']の値から濃度反応関係によりそれぞれの農薬の影響率を計算し、次式により複合影響を平均化して計算する。

$$\text{影響率}_{\text{mixture}} = (\text{影響率}_A + \text{影響率}_B) / 2 \quad (2.10)$$

一方、作用機作が異なる農薬を混合した場合の複合影響は、Response Additive (RA) モデルを活用した。RAモデルでは、作用機作が異なる影響は完全に独立に起こると仮定して影響率をかけ算する（相乗効果とは異なる）。例えば、農薬Aと農薬Bの複合影響は、それぞれの農薬の濃度反応関係から個別に影響率を求め、以下の式で計算する。

$$\text{影響率}_{\text{mixture}} = 1 - \prod (1 - \text{影響率}) = 1 - (1 - \text{影響率}_A) \times (1 - \text{影響率}_B) \quad (2.11)$$

なお、本研究で活用したCAおよびRAモデルは、これまでに多くの実験的な検証が行われている。本研究では、後述の複合毒性試験（図(2)-19）を用いてCAおよびRAモデルで予測した結果と比較し、既存の複合影響予測モデルを活用することの妥当性について検証を行った。

4. 結果及び考察

(1) 水生昆虫を用いた毒性評価

1) 1齢幼虫に対する殺虫剤の毒性評価

殺虫剤5剤の情報とコガタシマトビケラ1齢幼虫の毒性試験結果を表(2)-5に示す。トビケラのEC₅₀値は、LC/MS/MSによる実測濃度に基づきロジット法で算出した。試験期間中、対象区および助剤対象区において異常症状は確認されなかった。クロラントラニリプロールおよびメトキシフェノジドは、水溶解度付近の曝露濃度でもトビケラ1齢幼虫に対し急性毒性を示さず（影響個体率0%）、既存の試験生物種であるミジンコ類の方が高感受性であった。メトキシフェノジドと同様の作用機作を持つテブフェノジドについても、トビケラ1齢幼虫に対する毒性は低いことが報告されている¹⁾。一方、神経系に作用するエチプロール、スピノサドでは、ミジンコ類に比べてトビケラ1齢幼虫の方が1000倍以上も高感受性であった。なおエチプロールと同じ作用機作を示すフィブ

ロニルについても、同様の傾向を示すことが報告されている。ミジンコおよびトビケラ1齢幼虫に対するピリプロキシフェンの急性毒性は同程度であった。このように、殺虫剤の作用機作によっては、トビケラに対する毒性がミジンコ類と大きく異なることが示唆された。以上の結果から、わが国の河川生態系における殺虫剤感受性の種間差を効率的に把握するうえで、コガタシマトビケラは有用な試験生物であることが示唆された。

表(2)-5 殺虫剤5種のコガタシマトビケラ1齢幼虫に対する急性毒性試験結果

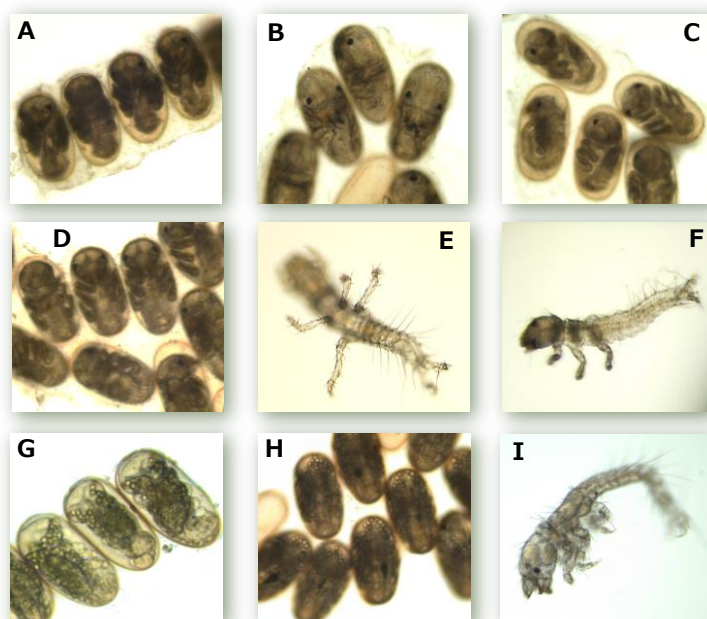
供試薬剤	IRACによる作用機構分類	ミジンコEC ₅₀ μg/L	トビケラEC ₅₀ μg/L	感受性比 ミジンコ/トビケラ
エチプロール	2B GABA作動性塩素イオンチャンネル アンタゴニスト	>8330	8.05	>1035
スピノサド	5 ニコチン性アセチルコリン受容体 アロステリックモジュレーター	1480	0.918	1612
ピリプロキシフェン	7C 幼若ホルモン類似剤	75	87.9	0.853
メトキシフェノジド	18 脱皮ホルモン受容体アゴニスト	3710	>7215	<0.514
クロラントラニリプロール	28 リアノジン受容体モジュレーター	11.6	>881	<0.0132

*作用機構の分類は引用文献13に従った。ミジンコのEC₅₀値は引用文献19より入手した。

2) 初期成長段階別毒性試験法の開発

a. 殺虫剤の胚発生への影響

曝露期間中、コガタシマトビケラの卵（胚）が死亡する（胚の透明感がなくなり濁った状態となる）ことはなかった。昆虫成長制御剤のピリプロキシフェンを除き、光学顕微鏡による観察では外見上、殺虫剤処理区の卵はふ化直前の段階（大顎の褐色化、体毛の顕在化）まで胚発生が進んでいた。しかし、最終的には高濃度処理区の未ふ化卵の胚は萎縮・死亡した（図(2)-4A, C, D, H）。ただし、エトフェンプロックスの中濃度処理区では、胚体が咽頭拍動による吸水で膨張した状態でふ化せずに死亡した（図(2)-4B）。このことは、ふ化時の一連の全身運動に神経系が大きく関与しており、エトフェンプロックスの曝露により神経系の働きが阻害されたことにより、ふ化が妨げられた可能性を示唆している。ピリプロキシフェンはE4期の卵に強い毒性影響を示した（後述）。E4期の卵の試験は曝露期間中に胚反転が起こるが、ピリプロキシフェン処理区では胚反転異常となり背閉鎖が完了せず（図(2)-4G）、胚体はねじれ卵黄が変形しその後正常に発生することなく死亡した。殺虫剤処理区ではふ化した個体であっても異常が観察されることがあった。ブプロフェジンの低濃度処理区では対照区と同様正常な個体がふ化したが（図(2)-4E）、高濃度処理区では脚が萎縮し、正常に機能していなかった（図(2)-4F）。筋肉系に作用するクロラントラニリプロールの処理区では脚の運動機能が損なわれていた（図(2)-4I）。

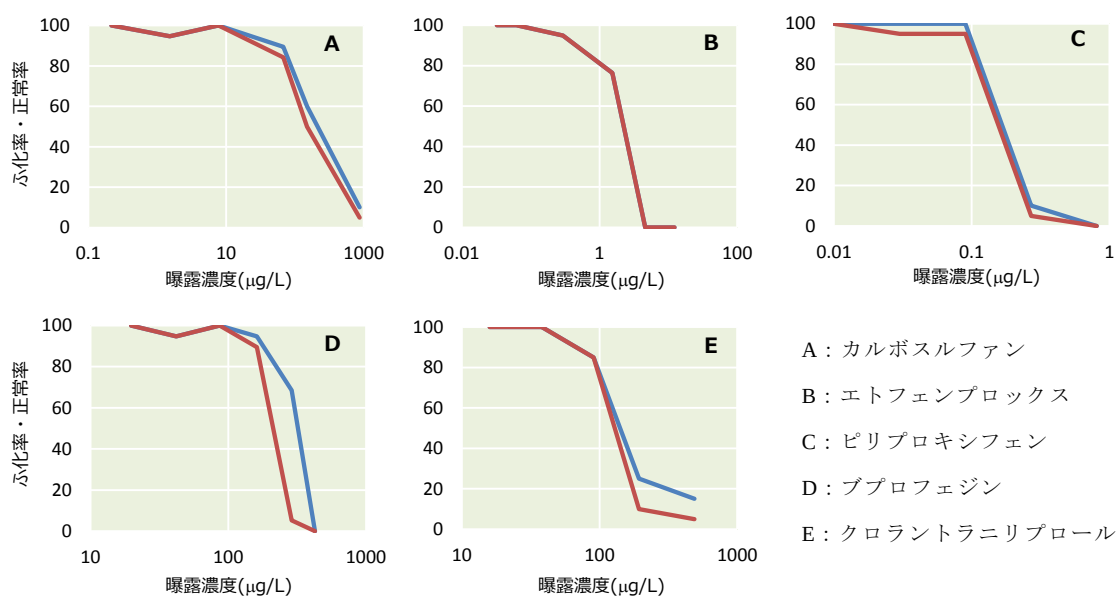


図(2)-4 殺虫剤処理区の未ふ化卵およびふ化個体

- A：カルボスルファン87.5 $\mu\text{g/L}$ 、8日間曝露。
 B：エトフェンプロックス0.9 $\mu\text{g/L}$ 、4日間曝露。
 C：エトフェンプロックス24.3 $\mu\text{g/L}$ 、6日間曝露。
 D：ブプロフェジン640 $\mu\text{g/L}$ 、4日間曝露。
 E：ブプロフェジン20 $\mu\text{g/L}$ 、8日間曝露。
 F：ブプロフェジン640 $\mu\text{g/L}$ 、8日間曝露。
 G：ピリプロキシフェン0.81 $\mu\text{g/L}$ 、2日間曝露。
 H：クロラントラニプロール560 $\mu\text{g/L}$ 、2日間曝露。
 I：クロラントラニプロール244 $\mu\text{g/L}$ 、2日間曝露。

b. ふ化率とふ化個体の生存

テブフェノジドを除く5剤の殺虫剤は、濃度依存的にふ化率が低下した（図(2)-5）。ふ化後48時間正常率（処理卵数に対するふ化個体数）をみると、神経系に作用するカルボスルファンおよびエトフェンプロックスではほぼ100%であったが、ブプロフェジンおよびクロラントラニプロールでは、高濃度処理区で正常率が低下した。前述のように、ブプロフェジン処理区では脚の外骨格に異常がみられるなど、ふ化はできるものの幼虫の生存には致命的な欠陥が生じることを示唆している。クロラントラニプロールでは、脚部の筋肉系の機能が低下している可能性があり、これによりふ化個体の生存が低下しているものと推測された。



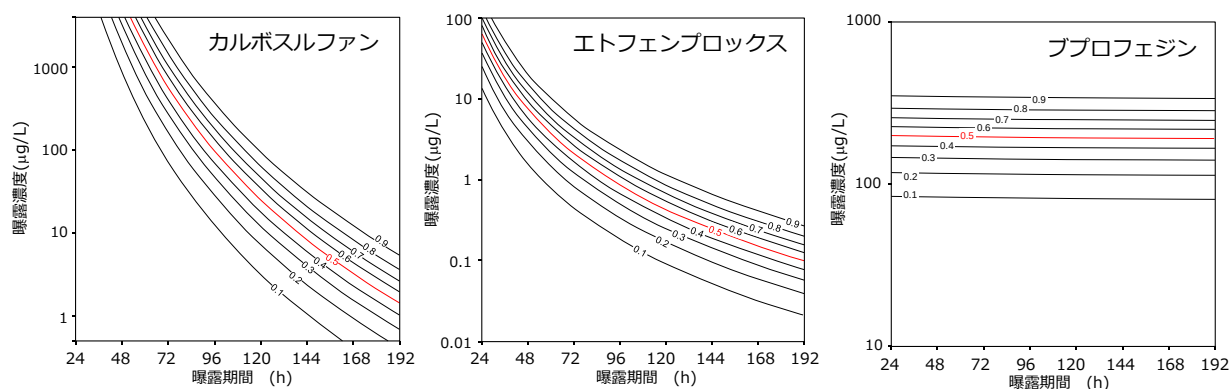
図(2)-5 殺虫剤5剤の曝露によるふ化率（青線）とふ化個体の48時間後正常率（赤線）

c. 卵の殺虫剤感受性における曝露期間と曝露のタイミングの影響

E1期から2, 4, 6, 8日間曝露し卵に対する殺虫剤の毒性を調べた結果、表(2)-6に示すように、カルボスルファンおよびエトフェンプロックス処理区では、曝露期間が長くなるほど影響が大きかった（2d-LC₅₀は8d-LC₅₀のおよそ90～680倍）。一方、ブプロフェジン処理区では、曝露期間によらず影響の程度はほぼ一定であった（2d-LC₅₀：209μg/L～8d-LC₅₀：228μg/L）。Complementary log-logモデルによる曝露期間、曝露濃度および死亡率の回帰結果を図(2)-6に示す。一般的に生物は曝露濃度が一定でも、曝露期間が長くなれば毒性影響をより強く受ける傾向がある。図(2)-6のカルボスルファンおよびエトフェンプロックスにおける死亡率の変動は、カーバメート系殺虫剤に対するカゲロウ科幼虫の応答と同様の傾向を示した²⁰⁾。一方、ブプロフェジンの死亡率の変動は全く異なる傾向を示した。この要因を考察するため、トビケラ卵の殺虫剤感受性に対する曝露のタイミングによる影響を調査した。神経系に作用するカルボスルファンおよびエトフェンプロックスに対してはE7期の卵が、ブプロフェジンに対してはE1期の卵が最も感受性が高く、これらの2日間曝露による毒性値は8日間曝露の毒性値と同程度（0.3～1倍）であった（表(2)-7）。このことは、トビケラ卵に対する毒性を決定する要因が、曝露期間よりも曝露のタイミングの方が重要であることを示している。

表(2)-6 殺虫剤3剤の曝露期間とトビケラ卵に対する感受性

曝露時間	半数致死濃度 (μg/L)		
	カルボスルファン	エトフェンプロックス	ブプロフェジン
2日	>913	5.19	209
4日	162	1.11	209
6日	4.04	0.16	126
8日	1.34	0.056	228



図(2)-6 トビケラ卵における曝露期間、曝露濃度および死亡率の関係（赤線は50%の死亡ライン）

表(2)-7 殺虫剤の曝露のタイミングとトビケラ卵の感受性

殺虫剤	半数致死濃度 (μg/L)		
	E1期	E4期	E7期
カルボスルファン	>913	596	1.31
エトフェンプロックス	5.19	1.19	0.191
ピリプロキシフェン	6.98	0.133	225
ブプロフェジン	209	>426	301
テブフェノジド	>2935	>2879	>2879
クロラントラニプロール	94.5	104	88.2

その他の剤についてみると、ピリプロキシフェンはE4期の卵に対して極めて毒性が強かった。テブフェノジドは、水溶解度よりもはるかに高濃度（3 mg/L）で曝露しても毒性影響は見られなかった。クロラントラニプロールは、E1, E4, E7期で感受性はほぼ一定であった。このように、薬剤の作用機作により、感受性の高い発生段階は異なることが示唆された。神経系に作用する剤は、神経系器官が完成する、つまり1齢幼虫の体の構造ができあがる胚発生後期においてより強く影響を及ぼすと考えられる。キチン生合成を阻害するブプロフェジンは、器官の原基が形成される発生初期に影響が大きいと考えられる。幼若ホルモンは昆虫卵に内在し、胚発生を制御している重要な因子である²¹⁾。胚発生中の昆虫卵が外部から幼若ホルモンを投与されると、ホルモンバランスが乱され胚発生に異常をきたす。胚反転中のカメムシ卵に幼若ホルモンを作用させると、背閉鎖に失敗し付属肢の形成が不完全になることが報告されている²²⁾。これは、幼若ホルモン作用のあるピリプロキシフェンのトビケラ卵への毒性影響と一致している。ミジンコ類に対するピリプロキシフェンの急性毒性はそれほど強くないが、1 μg/L以下の濃度で21日間曝露すると、オオミジンコの繁殖を抑制するとともに、♂を産仔するようになる²³⁾。一方、メソコズム試験では、ピリプロキシフェンが分解すると、ミジンコ個体群は速やかに回復することが報告されており²⁴⁾、ピリプロキシフェンの曝露によって産仔された♂も生殖能力を有していることから²⁵⁾、ミジンコ類への影響はかなり可塑的であると考えられる。ユスリカ類に対しては2世代影響試験が行われており、3 μg/Lで羽化率等に影響を与えている²⁶⁾。これらの長期間曝露による影響に比べ、ピリプロキシフェンは、トビケラ卵に対してごく低濃度の短期曝露でも致命的な影響を与えることが判明した。テブフェノジドは、トビケラの脱皮ホルモン受容体に対する親和性が低いため、トビケラ卵に毒性影響を示さないと考えられる。クロラントラニプロールについては、主に筋肉系に作用するとされているが、筋肉は発達していないE1期でも、筋肉の発達しているE7期と同様に毒性を示した。本剤については未だ解明されていない作用点、作用機作が存在する可能性がある。以上のように、殺虫剤の作用機作によって高感受性の発生段階が異なることから、水生昆虫卵の毒性評価では、殺虫剤の作用機作に依存した曝露のタイミング（作用点の形成時期）が重要であると考えられる。曝露期間を2日間に固定し、少なくともE1、E4、E7期の3つの発生段階で試験を行うことにより、効率的かつ適切に卵期の毒性評価を行うことができると考えられる。また、本研究で開発された卵期急性毒性試験は、既存のテストガイドラインでは急性毒性評価が難しいとされてきた昆虫成長制御剤を含め、様々な農薬について水生昆虫に対する毒性を適切に評価できると考えられた。

d. 脱皮期毒性試験

9日齢および15日齢幼虫を用いた毒性試験では、試験中の対照区の生存率は高く（100％）、本試験条件により昆虫成長制御剤の毒性試験が実施可能であると考えられた。表(2)-8に昆虫成長制御剤メトキシフェノジドの毒性試験結果を示す。表中の正常率とは、水流刺激に対し伸身・開脚反応を示す正常な試験個体の割合を指す。メトキシフェノジドは、最高曝露濃度6 mg/Lでも顕著な毒性影響を示さなかった。また、脱皮率についても濃度依存性は見られず、対照区と曝露区の間に差はなかった。9日齢幼虫の6 mg/L曝露試験区では脱皮率が低かったが、未脱皮個体に異常症状は確認されなかった。ベンゾイルヒドラジン骨格を有するメトキシフェノジドは、コガタシマトビケラの脱皮ホルモン受容体との親和性が低く、本種に対し低毒性であると推察された。しかしながら、本種はピリプロキシフェンなどの一部の昆虫成長制御剤に対し感受性が高いことから、本研究で開発した脱皮期を的確に捉えた毒性試験法は、これらの昆虫成長制御剤の毒性影響を適切に評価することができると期待される。

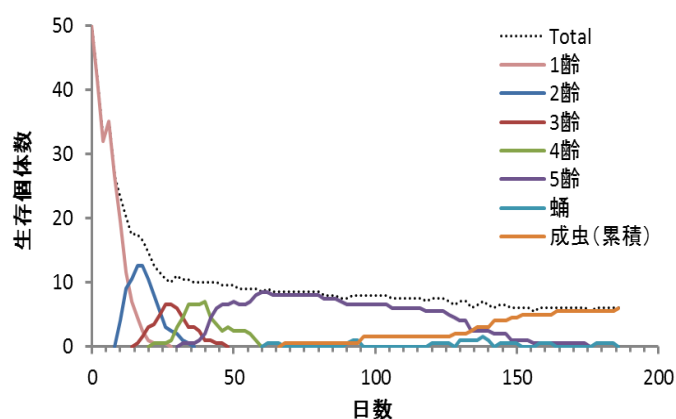
表(2)-8 脱皮期の若齢幼虫を用いたメトキシフェノジドの毒性試験結果

	9日齢		15日齢	
	正常率%	脱皮率%	正常率%	脱皮率%
対照区	100	60	100	70
曝露区(mg/l)				
1	100	60	100	90
3	100	50	100	60
6	90	10	100	70

3) 個体群レベルでの影響評価法の開発

a. コガタシマトビケラの生活史パラメータの解明

コガタシマトビケラ幼虫の成長試験結果を図(2)-7に示す。2齢、3齢、4齢幼虫の個体数は、それぞれ飼育開始16日、26日、40日目にピークに達した。5齢期は期間が長く、また5齢幼虫の生育が個体によって大きく異なったため、成虫は68日目以降の長い期間にわたって散発的に羽化した。この成長段階別個体数頻度分布データから作成した生命表を表(2)-9に示す。各齢期の死亡率は1～2齢の若齢期で最も高く、3～4齢期では低下したが5齢期で再び上昇した。成虫までの生存率は18.1%であった。このような生存率、各齢期の死亡率の推移は、コガタシマトビケラと同じシマトビケラ科に属す*Hydropsyche slossonae*の野外個体群と類似していた²⁷⁾。



図(2)-7 コガタシマトビケラの成長試験結果（2試験の平均値）

表(2)-9 コガタシマトビケラの生命表 (2試験の平均値)

成長段階	各成長段階の 個体数 (nx)	各成長段階に おける死亡数 (dx)	生存率 (lx)	各齢期の死亡率 (qx)
1齢	50.0	31.8	100.0	63.6
2齢	18.2	5.1	36.4	28.5
3齢	13.1	0.6	26.2	5.3
4齢	12.5	0.2	25.0	1.0
5齢	12.3	2.9	24.6	19.9
蛹	9.4	0.4	18.8	3.9
成虫	9.0	9.0	18.0	100.0

*H. slossonae*の齢期死亡率は1齢、2齢期でそれぞれ93%、32%と高く、3～4齢期では9～12%に低下するものの、5齢期で44%に上昇した。*H. slossonae*の成虫までの最終的な生存率は0.5%ときわめて低いことが報告されている。*H. slossonae*の1齢幼虫の高い死亡率は共食いによるものであるが、コガタシマトビケラについては共食いの性質が低く、若齢期に観察された高い死亡率は水質の低下によるものと考えられた。コガタシマトビケラ5齢期に死亡率が増加した原因は餌不足に起因する営巢のためのテリトリー争いによるものと推測された。成虫までの生存率が*H. slossonae*に比べコガタシマトビケラの方が36倍も高い要因は、室内成長試験の特性として、捕食圧、蛹の寄生虫罹患率等が皆無であったことが挙げられる。このことから、本研究で得られた生活史パラメータは比較的良好な生息環境における値に相当するものと推測された。

累代飼育記録から得られた成虫の性比、産卵率、雌1個体あたりの産卵数、ふ化率を表(2)-10に示す。累代飼育では雌成虫の方が雄成虫よりもやや少なかったが、雌成虫の約8割が産卵し産卵率は高かった。産卵を行った雌成虫の平均産卵数は271個で、コガタシマトビケラ野外個体群の1卵塊当たりの平均卵数272個²⁸⁾とほぼ一致したことから、累代飼育記録から得られた生活史パラメータは比較的妥当な値であると推測された。ふ化率はややばらつきが大きいものの、9割近い卵がふ化した。この累代飼育記録から得られた生活史パラメータの結果を、前述の成長試験結果に当てはめると、次世代の1齢幼虫は1400個体となり約30倍に増加することとなる。

表(2)-10 累代飼育記録から得られた各種生活史パラメータ

パラメータ	平均	標準偏差
性比(♀/♂)	0.82	0.06
産卵率(%)	82.3	3.9
産卵数/♀	271	13
ふ化率(%)	87.9	25.1

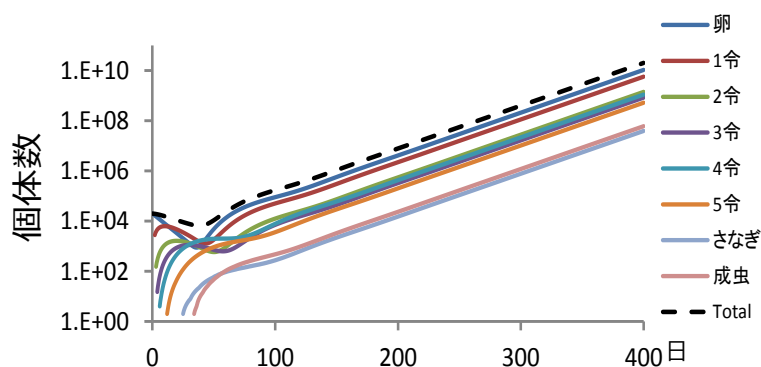
b. 個体群動態モデルの開発

表(2)-11に生活史パラメータから推定した、推移行列モデルのパラメータを示す。行列パラメータから、構築したコガタシマトビケラのレフコビッチ推移行列Aを式(2.12)に、シミュレーション結果を図(2)-8に示した。この行列の最大固有値 λ (個体群成長率)は1.039であり、1日に3.9%の割合で無限に個体数が増加していくことを表す。既存の試験生物種であるオオミジンコ($\lambda=1.35$)やユスリカ($\lambda=1.25$)と比較すると、成長率は1桁程度低く、コガタシマトビケラ個体群の回復性は他の試験生物種に比べ遅いことが示唆された。

$$A = \begin{pmatrix} 0.913 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 22.2 \\ 0.076 & 0.898 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.037 & 0.890 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.079 & 0.907 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.088 & 0.973 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0.026 & 0.984 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.012 & 0.874 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.121 & 0.962 \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

表(2)-11 コガタシマトビケラの推移行列パラメータ

成長段階	各成長段階の 平均期間 d_i (日)	日-生存率 s_i	繁殖率 Fa (日-産卵数)	ステージ内生存率 P_i	ステージ間移行率 G_i
卵	12.2	0.989	0	0.913	0.076
1齢	15.1	0.935	0	0.898	0.037
2齢	10.5	0.969	0	0.890	0.079
3齢	11.0	0.995	0	0.907	0.088
4齢	37.7	1.000	0	0.973	0.026
5齢	71.7	0.997	0	0.984	0.012
蛹	8.1	0.995	0	0.874	0.121
成虫	5	0.962	22.222	0.962	0.000

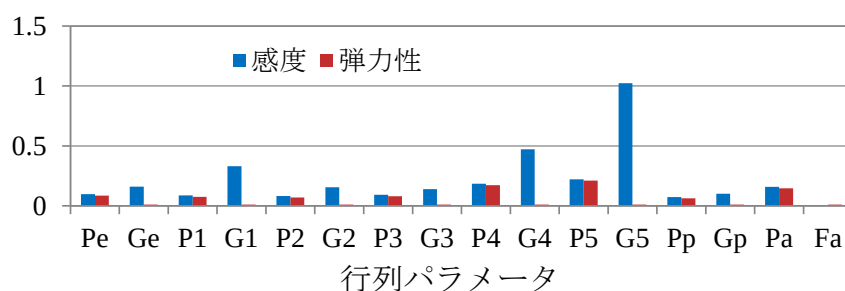


図(2)-8 トビケラ行列モデルによるシミュレーション例

この行列の安定年齢組成をみると、卵および1齢幼虫が個体群の8割の個体数を占める主要な成長段階であることがわかる（表(2)-12）。卵を1としたときの各成長段階の1個体あたりの繁殖に対する相対的な重要度を示す繁殖価では、蛹・成虫期が卵よりも200～300倍も高く繁殖に重要な成長段階であることが示された。行列パラメータの感度分析を行った結果を図(2)-9に示した。感度は行列パラメータの変化によって個体群増殖率 λ がどれだけ変化するかを表す。弾力性は行列パラメータの λ に対する相対的寄与率で、行列パラメータの相対的変化あたりの λ の相対的変化として表される。これらの値が大きい成長段階は個体群の増殖にとって重要であることを意味する。コガタシマトビケラの場合、4齢、5齢期のステージ間移行率およびステージ内生存率の感度、弾力性が高く、仮にこれらの成長段階に対し強く影響を及ぼすような化学物質に曝露された場合は、個体群の増殖が大きな影響を受ける可能性があることを示唆している。

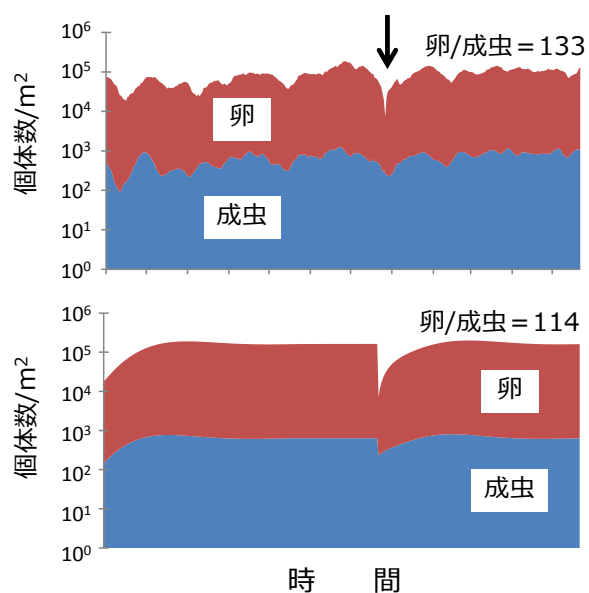
表(2)-12 トビケラ行列モデルの安定年齢組成と繁殖価

成長段階	安定年齢組成(u)	繁殖価(v)
卵	0.522	1
1齢	0.281	2
2齢	0.070	6
3齢	0.042	12
4齢	0.055	18
5齢	0.026	46
蛹	0.002	211
成虫	0.003	288



図(2)-9 行列パラメータの感度解析結果

式(2.12)にBeverton-Holt関数を組み込み、上限値 $K=60000$ と設定して、シミュレーションを行った結果、卵／成虫比は114と推定され、室内飼育記録の133とよく一致していた（図(2)-10）。室内飼育記録では、飼育設備の不具合により冬季に飼育水温が 5°C 以上低下するアクシデントがあった。この時期は成虫の羽化数が減少し、産卵行動が抑制され産卵数が10分の1程度まで減少した（図(2)-10上段矢印）。行列モデルによるシミュレーションでこのアクシデントを再現すべく、強制的に産卵数を10分の1まで低下させ、その後の個体数の回復を確認したところ、室内飼育記録とよく一致した。以上の結果から、本研究で開発したコガタシマトビケラの推移行列モデルは、室内個体群の動態を適切に再現できると考えられた。



図(2)-10 室内飼育記録結果（上段）と密度依存性を考慮した行列モデルによるシミュレーション結果（下段）との比較

c. 個体群レベルの影響評価

コガタシマトビケラ2齢～5齢幼虫に対するクロラントラニリプロールの急性毒性(48h-LC₅₀)は、2齢で>879 µg/L、3齢で>859 µg/L、4齢で30.3 µg/L(95%信頼区間: 23.2～38.6 µg/L)、5齢で22.7(19.2～27.7) µg/Lであった。クロラントラニリプロールは高齢幼虫に対し最も毒性が強く、卵期に対しても毒性影響を及ぼすが、若齢幼虫に対しては毒性がほとんどないという、特異的な変動パターンを有することが判明した。フェニトロチオンおよびイミダクロプリドの卵期における急性毒性を表(2)-13に示した。コガタシマトビケラ卵は、胚発生が進むにつれフェニトロチオンに対する感受性が高くなった。イミダクロプリドは、胚発生初中期の卵には影響を与えなかった。胚発生後期の卵に対して強い毒性を示す傾向は、他の神経系に作用する殺虫剤と一致していた。卵から幼虫期にかけてのフェニトロチオン、イミダクロプリド、クロラントラニリプロールの濃度－反応曲線データを表(2)-14にまとめた。卵期は最も高感受性の発生段階のデータを採用した。蛹期の試験データはないが、安全側にたった影響評価をするため、蛹期は5齢幼虫と同程度の感受性を有していると仮定して、5齢幼虫のデータを代用した。これらの濃度-反応曲線の関数をコガタシマトビケラの室内個体群動態モデルに組み込むことにより、成長に伴う感受性変動と個体群の持つ増殖特性(回復性)を考慮した個体群レベルでの殺虫剤影響評価が可能となる。

表(2)-13 トビケラ卵に対する殺虫剤2剤の急性毒性

殺虫剤	半数致死濃度 (µg/L)		
	E1期	E4期	E7期
フェニトロチオン	3471	1281	64.8
イミダクロプリド	>8001	>8001	3.23

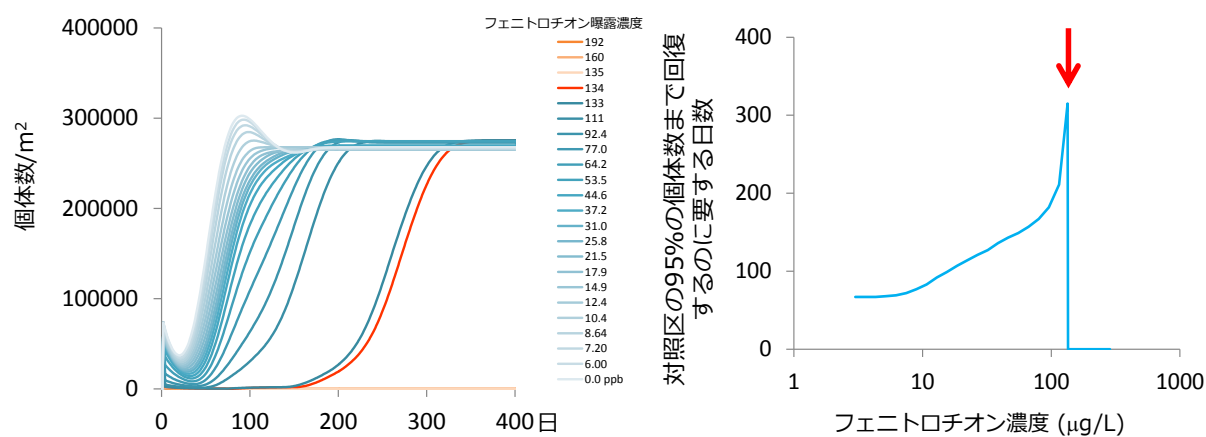
表(2)-14 殺虫剤3剤の濃度－反応曲線に関するパラメータ

成長段階	ロジスティック累積分布関数のパラメータ					
	フェニトロチオン*		イミダクロプリド*		クロラントラニリプロール	
	µ	σ	µ	σ	µ	σ
卵	1.812	0.102	0.518	0.069	1.943	0.473
1齢	0.959	0.077	0.822	0.048	—	—
2齢	1.108	0.142	1.065	0.056	—	—
3齢	1.142	0.107	1.336	0.108	—	—
4齢	1.283	0.174	1.342	0.083	1.482	0.133
5齢	1.423	0.216	1.579	0.107	1.356	0.077
蛹**	1.423	0.216	1.579	0.107	1.356	0.077

*1齢～5齢幼虫の試験データは引用文献18から入手。**5齢幼虫のデータを代用。

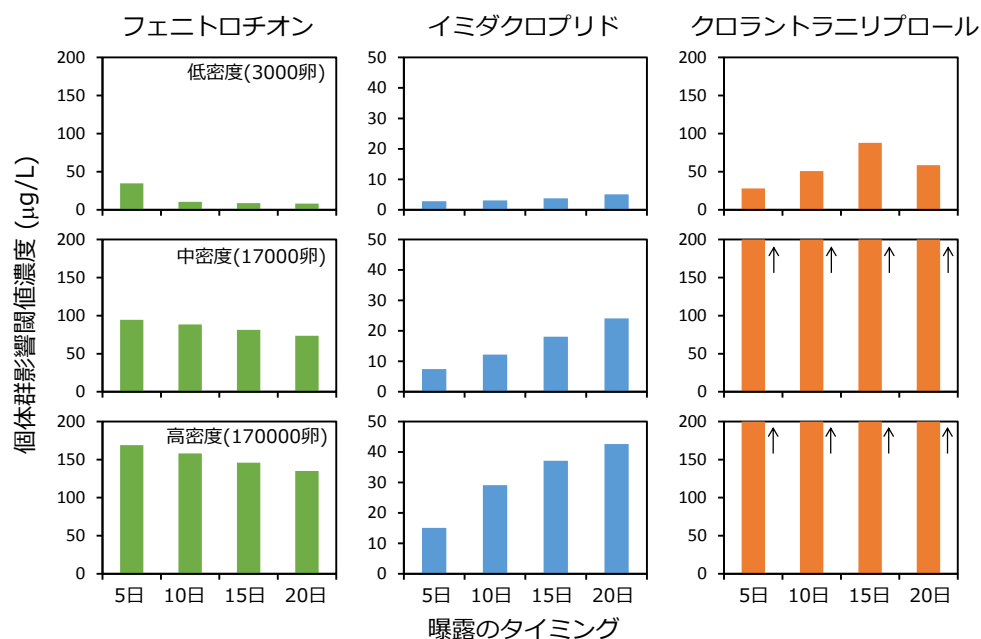
開発した室内個体群動態モデルを用いた影響評価のシナリオは、以下のように設定した。シミュレーション時の初発個体群は同一コホートの卵とした。殺虫剤は48時間の単回曝露とし、個体群の年齢組成の違いが個体群の殺虫剤感受性にどのような影響を与えるのかを確認するため、曝露のタイミングをシミュレーション開始から5日目(卵期)、10日目(～1齢期)、15日目(～3齢期)、20日目(～4齢期)の4通りに設定した。個体密度を3段階に設定して各々シミュレーションを行った。すなわち、農薬の影響に脆弱な低密度個体群(初発卵数3,000卵/m²)、農業環境技術研究所で

維持されている室内飼育個体群と同程度の良好な個体群（初発卵数170,000卵/m²）、中間の個体群（初発卵数17,000卵/m²）を設定した。殺虫剤の曝露濃度を様々に変えてシミュレーションを行った結果の一例を図(2)-11に示す。左図は個体数変動を経時的に示したもので、曝露濃度が高くなるにつれ個体数の増加が遅れ、ある濃度以上では個体数が回復せず個体群は持続しなかった。このシミュレーション結果から、対照区の95%の個体数にまで回復するのに要する日数を計算し（個体数が回復しない場合は回復日数を0とする）、曝露濃度に対してプロットすると右図のようになる。曝露濃度が増加するとともに回復日数も増加し、ある濃度以上で回復しないことが明瞭に示された。この濃度を個体群影響閾値濃度と定義し、殺虫剤影響評価における個体群持続性に関する明瞭なエンドポイントとして用いることとした。



図(2)-11 初発卵数170,000卵の個体群にフェニトロチオンを20日目から48時間曝露したときのシミュレーション結果例（左図）と個体群影響閾値濃度（右図）

図(2)-12に各シナリオにおける3剤の個体群影響閾値濃度を示した。個体密度が低いほど作用機作に関係なく殺虫剤の影響を受けやすい傾向がみられた。一方、曝露のタイミングによる個体群閾値濃度の変動は殺虫剤で異なった。卵に低毒性であるフェニトロチオンでは、個体群閾値濃度は個体群の年齢組成が高くなるとともに低下した。一方、卵に対し毒性の強いイミダクロプリドでは、年齢組成が高くなるとともに閾値濃度は高くなった。卵と高齢幼虫に毒性の強いクロラントラニプロールでは、低密度個体群の初期および後期に閾値濃度が低かったが、コガタシマトビケラは本剤に対して1齢～3齢期が不感受性であるため、個体密度が増加すると個体群レベルでは影響を受けにくいと解析された。以上の結果は、殺虫剤の作用機作や個体群の年齢組成によって個体群の感受性が変動することを示している。



図(2)-12 個体群レベルでの殺虫剤影響評価結果（上段は低密度、中段は中密度、下段は高密度個体群の結果。図中矢印は水溶解度以上でも影響を受けないことを示す。）

本研究で開発したコガタシマトビケラ個体群動態モデルは、定常状態では年齢組成が変動しない室内個体群を対象としているが、実環境中のトビケラ個体群は季節により年齢組成が変動するため、農薬に対する個体群レベルでの影響の受けやすさは当然変動すると推測される。今後は、季節性を考慮した野外個体群動態モデルを開発し、本影響評価手法の高度化を図る必要がある。

今回得られた個体群影響閾値濃度の最低値と、サブテーマ（3）の個体レベルの急性毒性データのみを用いたSSD解析の結果を比較すると、SSD解析において基準値として用いられるHC₅に比べて、個体群閾値濃度は3剤全てで高い値をとった（表(2)-15）。急性毒性データのみで導出されたHC₅ではあるが、個体群レベルの観点からも安全側にたった値であることが示唆された。一方、個体群閾値濃度は、20～30%の種が影響を受ける濃度に相当すると算出された。仮に、SSD解析により、河川水の農薬濃度が3割程度の種に急性影響を与えると推定された場合は、トビケラ個体群の存続性にも悪影響を与える可能性があると判定することができる。このように、本研究で開発したコガタシマトビケラの個体群レベルでの影響評価法を活用することにより、個体レベル試験の急性毒性データのみを用いて行われるSSD解析について、個体群レベルの観点から意義付けすることが可能となり、SSD解析手法を用いた生態リスク評価の理論強化に貢献すると期待される。

表(2)-15 個体群閾値濃度とSSD解析結果との比較

	フェニトロチオン	イミダクロプリド	クロラントラニリプロール
個体群影響閾値濃度 (μg/L)	8.04	2.8	28.1
1齢幼虫の48h-EC ₅₀ (μg/L)	6.23	6.64	>881
SSD解析によるHC ₅ (μg/L)	1.4	0.51	7.5
個体群閾値濃度における影響を受ける種の割合	29%	16%	24%

(2) 付着藻類を用いた毒性評価

1) 試験候補種の選定と効率的な毒性試験法の開発

8種11株の藻類を対象とし、3,5-DCPを用いた感受性検定の試験条件と結果を表(2)-16に示す。96時間の試験期間において、*Anabaena flos-aquae*以外の株は96穴マイクロプレート中で16倍以上の増殖を示し、OECDガイドラインの試験の妥当性基準(試験期間に16倍以上の増殖)を満たしていた。蛍光プレートリーダーによる測定は、緑藻と珪藻はクロロフィルaの自家蛍光(励起435 nm, 蛍光685 nm)を、藍藻はフィコビリンの自家蛍光(励起600 nm, 蛍光650 nm)を測定することで、細胞の増殖をモニタリングすることができた。各蛍光強度と顕微鏡で計数した細胞密度は比例関係にあることが確認された。

表(2)-16 3,5-DCPを用いた藻類感受性検定の試験条件と結果

種名	株名	試験時 光強度	最大 増殖速度	3,5-DCP EC ₅₀ Microplate	3,5-DCP EC ₅₀ Flask
		lux	/day	mg/l	mg/l
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NIES-35	5000	0.99	2.36	
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	NIES-797	2000	1.10	2.61	2.10
<i>Mayamaea atoms</i>	NIAES K11-11	2000	0.77	1.58	
<i>Nitzschia palea</i>	NIAES PD3	2000	1.21	0.90	
<i>Nitzschia palea</i>	NIAES U3-3	2000	0.71	1.11	
<i>Nitzschia palea</i>	NIES-487	2000	0.95	1.19	
<i>Achnanthes minutissimum</i>	NIES-71	2000	0.74	0.38	
<i>Achnanthes minutissimum</i>	NIES-414	2000	0.83	0.76	0.96
<i>Navicula pelliculosa</i>	UTEX-B673	2000	0.80	1.04	
<i>Pseudanabaena galeata</i>	NIES-512	2000	0.95	0.60	1.00
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NIES-73	2000	0.42	3.30	

緑藻である*Pseudokirchneriella subcapitata*と*Desmodesmus subspicatus*については、標準物質である3,5-DCPを用いた毒性試験のリングテストが行われており、EC₅₀がそれぞれ平均3.38、6.42 mg/L、標準偏差が1.30、2.38 mg/Lであることが報告されている²⁹⁾。これより、5～90パーセンタイルの信頼区間はそれぞれ1.24～5.52、2.51～10.3 mg/Lと計算され、本研究の結果もこの範囲内に収まっていた。また、株、培地、および光を同一にした条件下で、マイクロプレートを用いた試験法によるEC₅₀と、フラスコを用いた従来の試験法によるEC₅₀を3株について比較したところ、ほぼ同様の値となった(表(2)-16)。以上の結果から、マイクロプレートを用いた藻類の感受性検定の結果は妥当であると判断された。

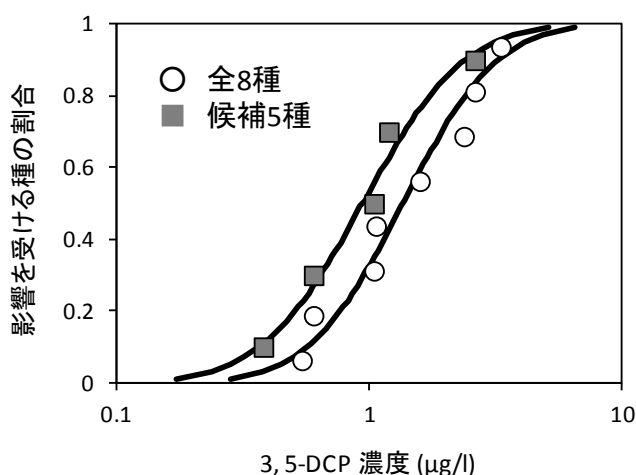
感受性検定の結果から、今後農薬を用いた毒性試験に使用する候補種を判定した。緑藻については、湖沼での生息が主要であるものの、河川付着藻類としても生息する*Desmodesmus*が望ましいと判断された。OECDガイドラインでも推奨種とされ、データの蓄積も比較的豊富である。珪藻については、好清水性種である*Achnanthes minutissimum*のNIES-71株は重金属汚染河川、NIES-414株は非汚染河川から採取されたものである。感受性検定の結果、汚染河川から採取されたNIES-71が感受性は高かった(表(2)-16)。増殖も比較的安定しており試験も容易であるNIES-71株の使用が望ましいと判断された。広適応性種である*Navicula pelliculosa*については、増殖も安定しており試験も容易である。また、OECDガイドライン推奨種であり、データの蓄積も比較的豊富である。さらに、河川での優占度も高く、候補種としてふさわしいと判断される。好汚濁性種である*Nitzschia*

*palea*の3株について、NIAES PD3株は水田、NIAES U3-3株は非汚染河川、NIES-487株は重金属汚染河川から採取されたものである。感受性検定の結果、採取された地点によらず同様のEC₅₀値となった（表(2)-16）。NIAES PD3株とNIAES U3-3株は液体培地での維持が困難であり、前培養までを寒天培地で行う必要があるため、試験操作が煩雑である。従って、*Nitzschia palea*についてはNIES-487株の使用が望ましいと判断された。*Mayamaea atomus*については珪藻種間で最も感受性が低かったが、河川での優占度が低く、*Navicula*属に近縁種であるため候補種から除外した。シアノバクテリアについては、*Pseudanabaena galeata*は維持管理が比較的難しい株であるが、調子の良い状態の株を試験に使用することで安定した試験が可能であった。*Anabaena flos-aquae*についてはマイクロプレートでの増殖が非常に悪く、96時間で4～5倍程度しか増殖が認められなかった。感受性も*Pseudanabaena galeata*が高く（表(2)-16）、河川でも優占度が高いため、この種の使用が望ましいと判断された。

以上より、河川付着藻類の試験種として、*Desmodesmus subspicatus* NIES-797、*Nitzschia palea* NIES-487、*Achnanthydium minutissimum* NIES-71、*Navicula pelliculosa* UTEX-B673、*Pseudanabaena galeata* NIES-512の5種の使用が適切であると判断した。2012年7月に行った長野県広井川における生物調査結果では、この5属で全藻類個体密度の6割以上をカバーできることが示されている（表(2)-17）。これら5種に対する3,5-DCPのEC₅₀値を用いて種の感受性分布解析を行ったところ、試験を行った全8種のEC₅₀を用いたSSDとほぼ同様の結果が得られた（図(2)-13）。従って、選定した5種の藻類を河川標準種として毒性試験データを蓄積し、SSD解析を行うことで、藻類群集の感受性分布をおおむね代表させることが可能と判断された。

表(2)-17 長野県広井川における付着藻類調査結果（2012年7月調査）

分類群	属名	密度 (cells/cm ²)	分類群	属名	密度 (cells/cm ²)
珪藻	<i>Achnanthydium</i>	459	緑藻	<i>Ankistrodesmus</i>	279
	<i>Amphora</i>	172		<i>Coleochaete</i>	470
	<i>Coccoreis</i>	339		<i>Desmodesmus</i>	836
	<i>Cymbella</i>	620		<i>Stigeoclonium</i>	295
	<i>Cosmarium</i>	77	シアノバクテリア	<i>Lyngbya</i>	221
	<i>Diatoma</i>	317		<i>Homoeothrix</i>	38
	<i>Frustulia</i>	164		<i>Pseudanabaena</i>	1572
	<i>Gomphonema</i>	1312	全合計		17223
	<i>Navicula</i>	4748	標準5種合計		10551
	<i>Nitzschia</i>	2936	% 標準5種		61%
	<i>Melosira</i>	470			
	<i>Meridion</i>	90			
	<i>Surirella</i>	372			
	<i>Synedra</i>	604			
	<i>Pinnularia</i>	312			
	<i>Rhoicosphenia</i>	519			



図(2)-13 3,5-DCPの種の感受性分布解析結果（同種の複数の株で EC_{50} が得られる場合は、種ごとに幾何平均値としてまとめて解析に使用した）

20種類の除草剤を用いた5種同時毒性試験の結果を表(2)-18に示す。いずれの試験においても、5種すべてにおいてコントロール区で良好な増殖（増殖速度 $> 0.7 \text{ day}^{-1}$ ）が認められ、また、6連でのバラつきも小さかった（ $CV < 7\%$ ）。これより、再現性の高い安定した試験法であることが明らかとなった。得られた EC_{50} 値は種間で大きな差が見られ、特にALS阻害系、PPO阻害系、超長鎖脂肪酸阻害系の除草剤では種間差が大きい傾向が見られた。感受性の順序も作用機作によって異なる傾向を示し、ALS阻害系ではシアノバクテリア、PPO阻害系と超長鎖脂肪酸阻害系では緑藻、4-HPPD阻害系では珪藻が最も高感受性であった。光化学系II阻害系と脂質生合成阻害系では、種間差が小さく明確な傾向はみられなかった。

これらの結果を用いて EC_{50} ベースのSSDを解析し、各除草剤のSSDパラメータ（対数平均と対数標準偏差）を決定した（表(2)-19）。ただし、5種全てで EC_{50} が水溶解度以上であったシハロホップブチル、フルセトスルフロン、ベンゾビシクロン、オキサジクロメホンは解析対象から除外した。ALS阻害系、PPO阻害系、超長鎖脂肪酸阻害系の除草剤では、感受性の種間差が大きい傾向を反映し、対数標準偏差が大きい傾向が見られた。また、PPO阻害系の除草剤では HC_5 の値が非常に低くなる傾向も見られた。さらに、このSSDと標準緑藻の EC_{50} とを比較した結果を図(2)-14に示す。感受性の分布の中での標準緑藻の位置づけは作用機作ごとに特徴付けられることが明らかとなった。ALS阻害系とPPO阻害系の除草剤では、 HC_5 が標準緑藻の EC_{50} よりも10倍程度低い値となった。この場合、標準緑藻1種のみを用いた除草剤の生態リスク評価では、リスクを過小評価してしまう。一方、超長鎖脂肪酸生合成阻害系の除草剤では、 HC_5 が標準緑藻の EC_{50} よりも10倍以上高い値となった。この場合、標準緑藻1種のみを用いた除草剤の生態リスク評価では、リスクを過大評価してしまう。このように、作用機作によって感受性の高い種が異なるため、標準緑藻1種のみを用いた除草剤の生態リスク評価は適切でないことが示された。このため、リスク評価の際に藻類に適用される不確実性係数（現在は1）の見直しや、SSDの活用などの対応が必要となると考えられた。

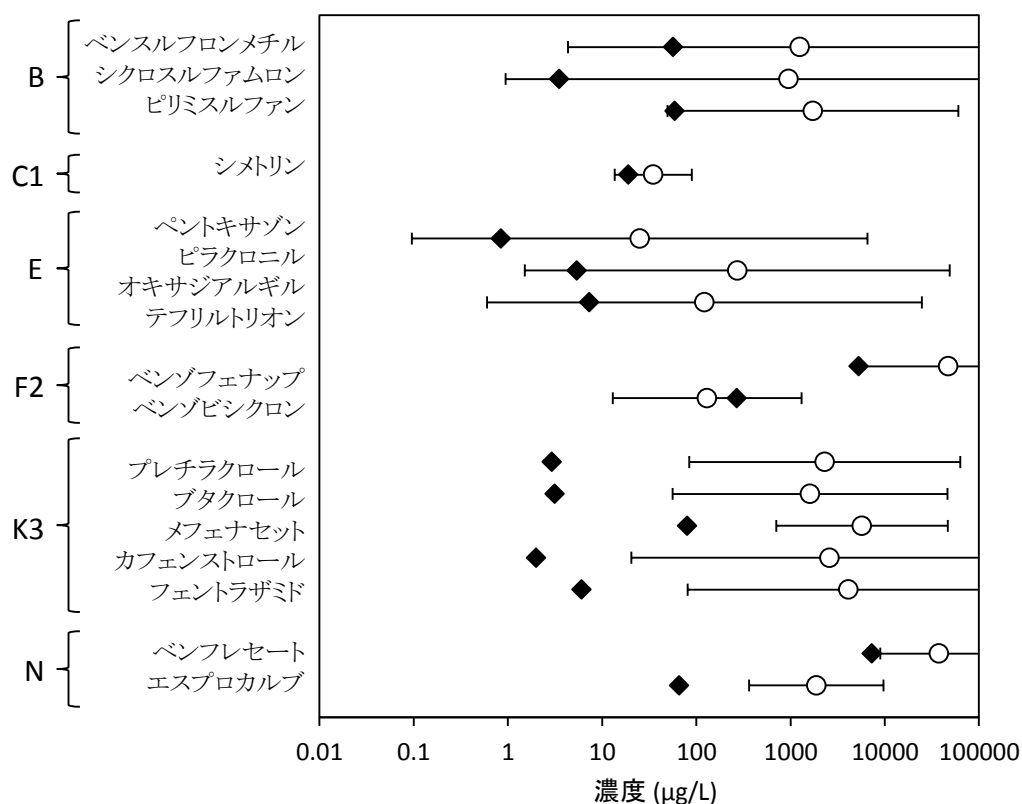
表(2)-18 20種類の除草剤の作用機作と5種の付着藻類に対する感受性 (μg/L)

除草剤	作用機作 ^a		<i>Pseudanabaena</i>	<i>Desmodesmus</i>	<i>Achnanthes</i>	<i>Nitzschia</i>	<i>Navicula</i>
シハロホップブチル	A	EC50	>230	>230	>230	>230	>230
		EC10	>230	>230	>230	>230	>230
ベンスルフロメチル	B	EC50	4.1	150	>6000	>6000	>6000
		EC10	1.9	18	4200	>6000	
シクロスルファミロン	B	EC50	3.1	11	>9700	>9700	>9700
		EC10	1.6	1.4	>9700	8800	>9700
ピリミスルファン	B	EC50	150	120	>5400	4400	>5400
		EC10	124	52	1600	420	>5400
フルセトスルフロ	B	EC50	>6800	>6800	>6800	>6800	>6800
		EC10	>6800	>6800	>6800	>6800	>6800
シメトリン	C1	EC50	23	16	47	86	34
		EC10	3.3	5.9	8.2	31	15
ペントキサゾン	E	EC50	>220	0.084	>220	5.7	59
		EC10	>220	0.072	>220	0.24	9.6
ピラクロニル	E	EC50	>5000	0.96	1300	58	1000
		EC10	>5000	0.57	66	4.7	57
オキサジアルギル	E	EC50	>1500	0.21	840	56	380
		EC10	>8.9	0.18	220	3.2	32
テフリルトリオン	F2	EC50	>100000	>100000	10000	23000	23000
		EC10	>100000	>100000	4400	2400	14000
ベンゾフェナップ	F2	EC50	>240	>240	130	66	15
		EC10	>240	>240	23	52	13
ベンゾビスクロン	F2	EC50	>180	>180	>180	>180	>180
		EC10	>180	>180	>180	>180	>180
プレチラクロール	K3	EC50	>4000	62	5100	15000	1300
		EC10	>4000	5.8	120	1900	200
ブタクロール	K3	EC50	>3600	38	5100	6200	950
		EC10	>3600	2.5	200	1100	200
メフェナセット	K3	EC50	>10000	620	>3000	>3200	5800
		EC10	>950	34	120	>3200	650
カフェンストロール	K3	EC50	>11000	8.3	8600	5700	9500
		EC10	>11000	1.1	380	2200	230
フェントラザミド	K3	EC50	>4100	50	11000	3600	55000
		EC10	89	0.35	440	950	200
ベンプレセート	N	EC50	>23000	22000	10000	76000	95000
		EC10	>9100	11000	7800	13000	7600
エスプロカルブ	N	EC50	1600	350	>3200	4100	1800
		EC10	1300	90	3100	1600	770
オキサジクロメホン	Z	EC50	>500	>500	>500	>500	>500
		EC10	>500	>500	>500	>500	>500

^a A: acetyl CoA carboxylase(ACCase)阻害、B: acetolactate(ALS)生合成阻害、C1: 光化学系II阻害、E: protoporphyrinogen oxidase(PPO)阻害、F2: 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase(4HPPD)阻害、K3: 超長鎖脂肪酸生合成阻害、N: 脂質生合成阻害、Z: その他

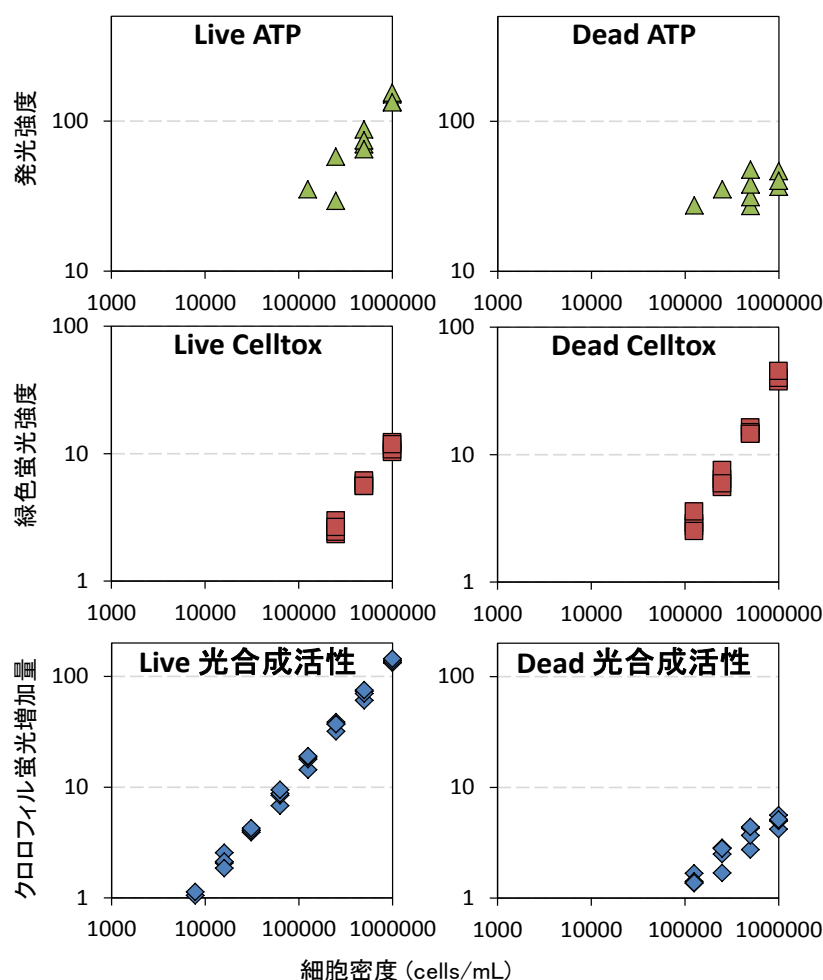
表(2)-19 16種類の除草剤のSSDパラメータ（対数平均、対数標準偏差）とHC5およびHC50

除草剤	作用機作	対数平均	対数標準偏差	HC5 (μg/L)	HC50 (μg/L)
ベンスルフロンメチル	B	7.13	3.44	4.4	1253
シクロスルファミロン	B	6.86	4.20	0.54	952
ピリミスルファン	B	7.45	2.16	49.3	1726
シメトリン	C1	3.55	0.58	12.5	35
ペントキサゾン	E	3.22	3.39	0.10	25
ピラクロニル	E	5.52	3.29	1.11	249
オキサジアルギル	E	4.80	3.23	0.39	122
テフリルトリオン	F2	10.76	1.31	5466.2	47293
ベンゾフェナップ	F2	4.87	1.40	13.0	130
プレチラクロール	K3	7.75	2.01	84.3	2310
ブタクロール	K3	7.38	2.04	55.9	1608
メフェナセット	K3	8.65	1.27	705.9	5729
カフェンストロール	K3	7.86	2.94	20.5	2596
フェントラザミド	K3	8.32	2.39	80.6	4106
ベンフレセート	N	10.54	0.88	8950.0	37763
エスプロカルブ	N	7.54	1.00	362.7	1877

図(2)-14 16種類の除草剤の種の感受性分布（○とそのバーは、SSDの50パーセンタイル値とその信頼区間（5-95パーセンタイル値）、◆は標準緑藻のEC₅₀値を示す）

2) 付着藻類を用いた回復性試験法の開発

付着藻類を用いて、生理状態と一過性の曝露からの回復性との関係を調べた。まず、生理状態の測定法の検討として、珪藻*Navicula pelliculosa*の生細胞と死細胞を各種密度で調整し、ATP発光、Celltox-Green蛍光、光合成活性を測定した結果を図(2)-15に示す。ATP発光は、正細胞が 10^5 cells/mL以上の密度で細胞密度と発光強度が直線関係にあったが、死細胞ではその関係が見られず、全般的に測定ごとのバラツキが大きかった。Celltox-Green蛍光は、死細胞が 10^5 cells/mL以上の密度で細胞密度と発光強度が直線関係にあった。なお、生細胞でも直線関係は見られたが、その蛍光強度は死細胞のものと比べて非常に低かった。全般的にATP発光よりも直線性は明確で、測定ごとのバラツキも比較的少なかった。光合成活性としてのクロロフィル蛍光増加量は非常に感度が高く、正細胞が 10^3 cells/mL以上の密度で細胞密度と発光強度が直線関係にあった。一方で、死細胞では蛍光の増加は正細胞に比べて非常に低いことから、クロロフィル蛍光増加量を測定することにより、細胞の生理状態を明瞭に表すことができると考えられた。

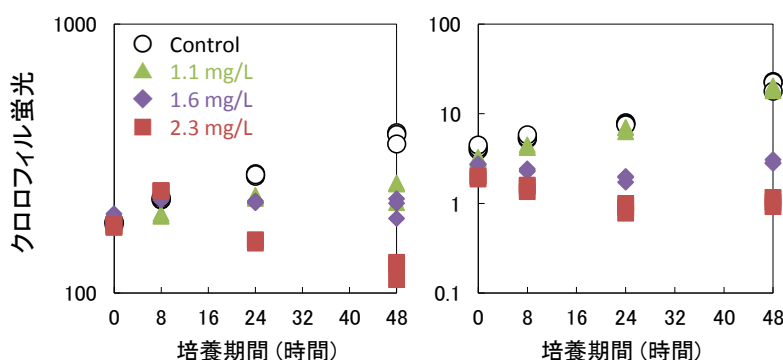


図(2)-15 付着藻類細胞の正細胞 (Live) と死細胞 (Dead) の生理状態の把握

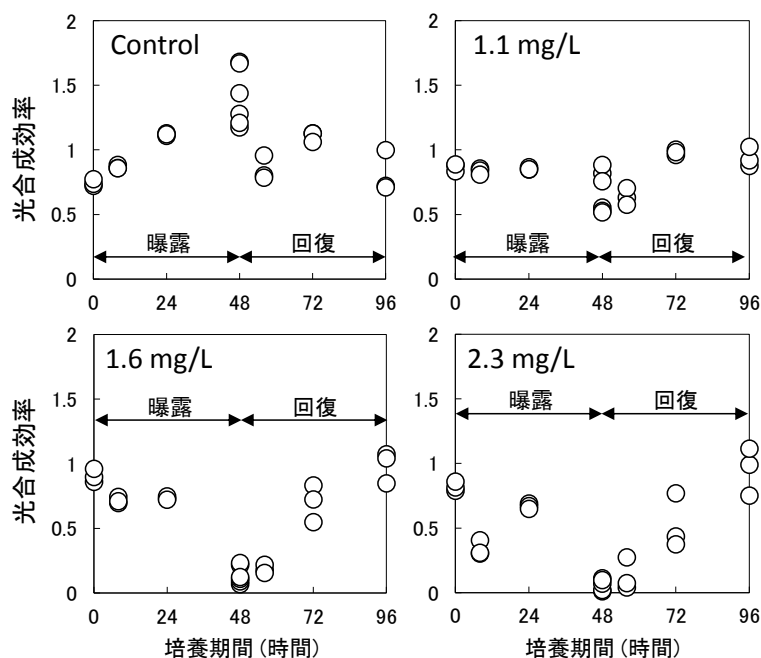
参照物質として3,5-ジクロロフェノールを用いた48時間の毒性試験と、その後48時間の回復性試験の結果を図(2)-16に示す。48時間の毒性試験では、曝露濃度の上昇に伴って増殖は抑えられた。

一方、48時間の回復性試験では、曝露濃度の上昇に伴って回復するまでの時間が長くなり、特に1.6および2.3 mg/Lの曝露濃度区では、清浄な培地内でもクロロフィル蛍光の増加が見られるまでに48時間かかった。

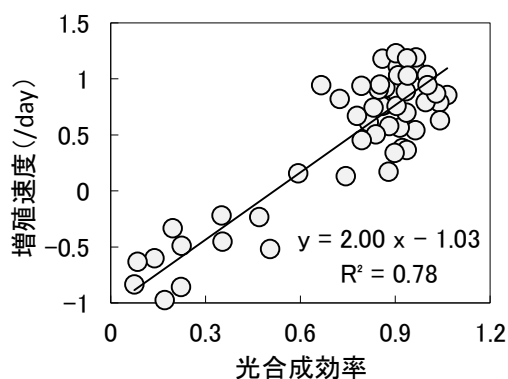
この間の細胞の生理状態を調べた結果を図(2)-17に示す。ATP発光とCellTox-Green蛍光は、曝露濃度による有意な差が見られなかった。光合成効率（クロロフィル蛍光増加量／元のクロロフィル蛍光）を計算すると、毒性試験期間中は曝露濃度の上昇に伴い減少し、回復性試験期間中に回復が見られた。また、このときの光合成効率と藻類の増殖速度の間に非常に良い直線関係($R^2 = 0.78$, $n = 54$, $P < 0.001$)が得られ（図(2)-18）、光合成効率から藻類の増殖速度を予測できる可能性が示唆された。光合成効率のような、藻類の生理状態を示す指標を用いて、除草剤による回復性の違いなどを調べていくことで、一過性の曝露からの回復までを考慮した生態リスク評価が可能になると考えられた。



図(2)-16 3,5-ジクロロフェノールを用いた毒性試験（左）とその後回復性試験（右）



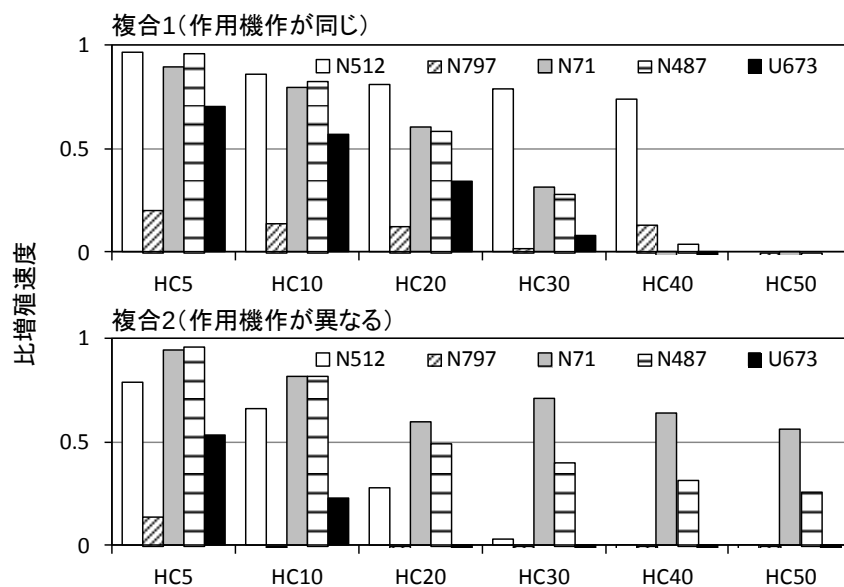
図(2)-17 毒性試験と回復性試験期間中の光合成効率の推移



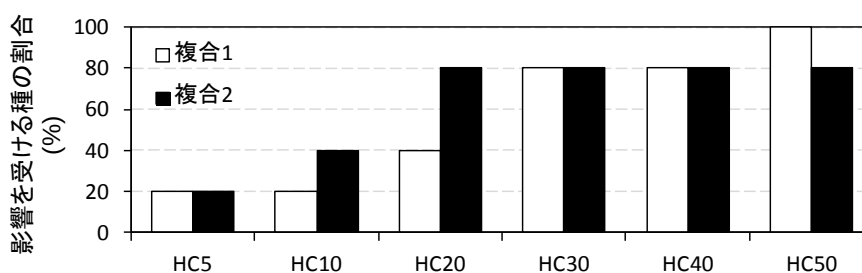
図(2)-18 光合成効率と増殖速度の関係

3) 付着藻類を用いた複合毒性試験と複合影響予測のモデル解析

作用機作が同じ除草剤を混合した場合（複合1）と、作用機作が異なる除草剤を混合した場合（複合2）の2組を設定し、それぞれHC₅, HC₁₀, HC₂₀, HC₃₀, HC₄₀, HC₅₀に相当する濃度で混合した複合毒性試験を実施した。コントロール区の増殖速度を1とした場合の比増殖速度を図(2)-19に示す。5種の藻類のうち、*D. subspicatus*（N797株）が両方の組み合わせで最も早く影響を受け、続いて*N. pelliculosa*（U673株）が影響を受けた。*P. galeata*（N512株）は、複合1よりも複合2でより大きな影響があった。また、比増殖速度が0.5以下になった場合に、その種は影響を受けたと判断すると（5種のうち1種が影響を受けるたびに「影響を受ける種の割合」が20%ずつ上昇する）、影響を受ける種の割合は図(2)-20のように計算された。得られた結果は、サブテーマ（3）において開発する種の感受性分布（SSD）を用いた複合影響予測モデルの妥当性の検証に活用した。

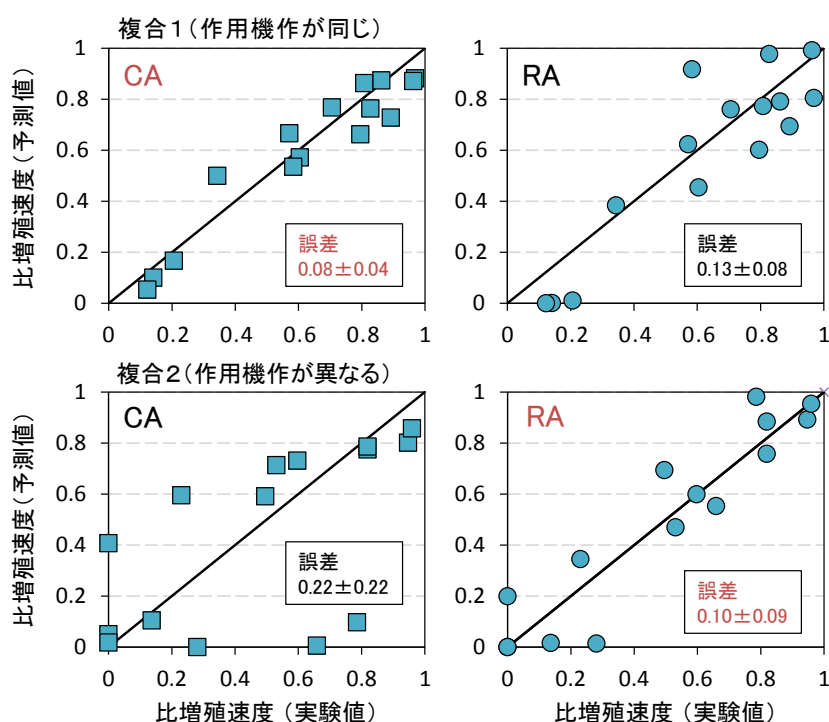


図(2)-19 複合毒性試験における付着藻類5種の比増殖速度



図(2)-20 複合毒性試験における影響を受ける種の割合

CAモデルとRAモデルを用い、複合影響の予測結果と実際の試験結果の比較を図(2)-21に示す。なお、HC₃₀, HC₄₀, HC₅₀の複合影響については、予測精度が低かったことから解析の対象から除外した。作用機作が同じ場合には、CAモデルの方がRAモデルよりも予測精度が良好であった。一方、作用機作が異なる場合には、RAモデルの方がCAモデルよりも予測精度が良好であった。この結果は既存の知見と一致するものである。



図(2)-21 複合毒性試験結果とモデル予測の比較（誤差は平均値±標準偏差を示す）

CAモデルやRAモデルは、基本的に「複合影響は加算的である」という仮定に基づくモデルである。しかしながら、複合影響では加算的以上の影響をもたらす相乗効果、もしくは互いに毒性を打ち消し合って加算的以下の影響になってしまう拮抗効果も想定される。本研究では、実際の河川水中で想定される低濃度で多種類の農薬による複合影響を評価するため、ファンネル仮説を採用し全てを加算的影響であると仮定した。ファンネル仮説とは、Warne and Hawker (1995)³⁰⁾によ

って提唱された複合影響に関する概念である。この仮説では、混合する化学物質の数が少ない場合、加算的モデルによる予測からの解離が大きい（相乗もしくは拮抗する）ケースが多数出てくるが、化学物質の数が増えるに従って、個々の組み合わせで相乗や拮抗効果が起こるが、その組み合わせが多いためにそれらが互いに相殺されて、見かけ上加算的な影響に近づくという考え方である。本研究で想定した低濃度で多種類の農薬による複合影響の場合、ファンネル仮説に従うことが報告されており、前述の複合影響試験結果（ HC_{30} , HC_{40} , HC_{50} の高濃度域では、モデルの予測精度が低下する）とも一致した。

単一種に対する複合毒性においては、ファンネル仮説を支持する実験結果がこれまで多数得られている。例えば、Faust et al. (2001) ³¹⁾は、藻類を用いた毒性試験において、18種類のトリアジン系除草剤を阻害率1%に相当する濃度で混合したところ、47%の阻害率が見られた。CAモデルによる予測では44%、RAモデルによる予測では17%であり、作用機作が同じ場合ではCAモデルの有効性が確認されている。さらにFaust et al. (2003) ³²⁾は、同じく藻類を用いた毒性試験において、16種類の作用機作の異なる薬剤を阻害率1%に相当する濃度で混合したところ、18%の阻害率が見られた。CAモデルによる予測では75%、RAモデルによる予測では15%であり、作用機作が異なる場合ではRAモデルの有効性が確認されている。このように、低濃度で多種類の農薬曝露による影響は、個々の組み合わせでは相乗や拮抗効果が起こっても、全体としてはそれらが相殺されて加算的に見える。しかし、複数の生物種に対する影響を評価する種の感受性分布（SSD）に対し、ファンネル仮説が適用できることを実験的に検証した研究例はこれまでに報告されていない。本件については、サブテーマ（3）で検討を行った。

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

水生昆虫については、河川に在来する水生昆虫コガタシマトビケラを用いて、初期成長段階別毒性試験法を開発し、成長段階や殺虫剤の作用機作の違いによって感受性が大きく変動することを明らかにした。これらの知見は生態リスク評価の高度化に貢献すると考えられる。また、コガタシマトビケラの生活史パラメータを詳細に解明し、室内個体群動態モデルを開発するとともに、成長に伴う感受性の変動や一時的曝露からの回復性を考慮した個体群レベルでの影響評価法を確立した。これらの成果は、個体レベルから個体群、群集、生態系レベルでの生態リスク評価手法の開発を促進するものであり、その科学的意義は大きい。

付着藻類については、従来法では毒性試験の実施が困難であった河川在来の付着藻類について、96穴マイクロプレートと蛍光プレートリーダーを用いた試験方法に適用しうる試験生物種5種を選定し、5種類の付着藻類に対し同時に実施可能な毒性試験法を開発した。これにより、種の感受性分布の解析に必要とされる毒性データを効率的に蓄積することが可能となった。実際の河川水中で見られる多種多様な農薬の低濃度曝露による複合影響について、既存の知見とおり作用機作の同じ農薬の場合はConcentration-Additive (CA) モデル、作用機作の異なる農薬の場合はResponse Additive (RA) モデルで予測可能であることが明らかとなった。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成26年2月5日開催の平成25年度水産動植物登録保留基準設定検討会委員等による勉強会において、サブテーマ（２）で開発した水生昆虫コガタシマトビケラの成長段階別毒性試験法および付着藻類の毒性試験法について報告し、現行の評価手法では対応が困難な農薬について、感受性の種間差を適切に反映した評価が可能な手法として提示した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

農薬等化学物質の生物に対する感受性は成長に伴い変動する。本研究で開発した水生昆虫の成長段階別毒性試験法を用いることにより、成長に伴う感受性変動を把握し、既存のテストガイドラインでは急性毒性評価が難しいとされてきた昆虫成長制御剤を含む様々な殺虫剤について、水生昆虫に対する毒性を適切に評価できる。

わが国の河川生態系の一次生産者として優占する付着藻類の代表種5種を選定し、これらの毒性データを効率的に得るための新たな毒性試験法を開発するとともに、詳細をマニュアルにまとめて公開した。現在使用されている標準の藻類種とは異なる感受性が得られるため、本試験法の活用により生態リスクをより適切に評価することができる。

6．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. NAGAI, K. TAYA, H. ANNOH and S. ISHIHARA: Ecotoxicology and Environmental Safety, 94, 37-44 (2013)
“Application of a fluorometric microplate algal toxicity assays for riverine periphytic algal species”
- 2) T. NAGAI: Human and Ecological Risk Assessment, 20(3), 641-657 (2014)
“Algal population growth model integrated with toxicokinetics for ecological risk assessment under time-varying pesticide exposure”

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 岩崎雄一、林岳彦、永井孝志：環境毒性学会誌, 16(1), 13-19 (2013)
「NOECとLOECにお別れを言うときが来た？」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) T. NAGAI, K. TAYA, A. YOKOYAMA and S. ISHIHARA : SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012“
“Development of high-throughput and multi-species algal toxicity assay for probabilistic ecological risk assessment of pesticides”

- 2) A. YOKOYAMA, T. NAGAI and T. HORIO : SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Acute toxicity of some insecticides to eggs of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata*”
- 3) 横山淳史：日本農薬学会第37回大会 (2012)
「河川水生昆虫に対する農薬の影響に関する研究」
- 4) 永井孝志、安納弘親：日本農薬学会第38回大会 (2013)
「藻類生長阻害試験の統計解析方法：RExcelで行う非線形回帰分析」
- 5) 永井孝志、多屋清志、依田育子：日本陸水学会第78回大会 (2013)
「蛍光マイクロプレートアッセイを用いた各種除草剤に対する河川付着藻類の感受性差の評価」
- 6) 横山淳史、依田育子：第31回農薬環境科学会 (2013)
「水生昆虫コガタシマトビケラの卵に対する殺虫剤の毒性評価－曝露期間と曝露のタイミングによる影響の違いについて－」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

永井孝志：「河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル」を農業環境技術研究所のWEBサイト (<http://www.niaes.affrc.go.jp/techdoc/algae/>) にて公開（平成26年2月26日）

8. 引用文献

- 1) 永井孝志：日本リスク研究学会第21会年次大会講演論文集, 21, 417-421 (2008)
「確率論的アプローチを用いた農薬の生態リスク評価」
- 2) A. YOKOYAMA, K. OHTSU, T. IWAFUNE, T. NAGAI, S. ISHIHARA, Y. KOBARA, T. HORIO and S. ENDO: Journal of Pesticide Science, 34, 13-20 (2009)
“A useful new insecticide bioassay using first-instar larvae of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae)”
- 3) T. IWAFUNE, K. INAO, T. HORIO, N. IWASAKI, A. YOKOYAMA and T. NAGAI: Journal of Pesticide Science, 35, 114-123 (2010)
“Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura River, Ibaraki, Japan”
- 4) T. NAGAI and A. YOKOYAMA: Journal of Pesticide Science, 37, 233-239 (2012)

- “Comparison of ecological risks of insecticides for nursery-box application using species sensitivity distribution”
- 5) 独立行政法人農業環境技術研究所：「コガタシマトビケラ1齢幼虫を用いた農薬の急性毒性試験法マニュアル」 pp26 (2008)
 - 6) T. H. HUTCHINSON, J. SOLBÉ and P. J. KLOEPPER-SAMS: Chemosphere, 36, 129-142 (1998)
“Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III — Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms”
 - 7) 菅谷芳雄: Medical Entomology and Zoology, 48, 345-350 (1997)
“セスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)における殺虫剤感受性の種内変異”
 - 8) S. A. COLLYARD, G. T. ANKLEY, R. A. HOKE and T. GOLDENSTEIN: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 26, 110-113 (1984)
“Influence of age on the relative sensitivity of *Hyalella azteca* to diazinon, alkylphenol ethoxylates, copper, cadmium, and zinc”
 - 9) K. R. PALMQUIST, J. J. JENKINS and P. C. JEPSON: Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 1713-1720 (2008)
“Clutch morphology and the timing of exposure impact the susceptibility of aquatic insect eggs to esfenvalerate”
 - 10) K. MIYAKAWA: Kontyu, 41, 413-425 (1973)
“The embryology of the caddisfly *Stenopsyche griseipennis* MacLachlan (Trichoptera: Stenopsychidae) I. Early stages and changes in external form of embryo”
 - 11) 独立行政法人農業環境技術研究所：「コガタシマトビケラの飼育法マニュアル」 pp28 (2008)
 - 12) J. L. ROBERTSON, R. M. RUSSELL, H. K. PREISLER and N. E. SAVIN eds., Bioassays with Arthropods 2nd ed., CRC Press, (2007)
“Chapter11 Times as a Variable”
 - 13) IRAC MoA Classification Scheme Version7.3
<http://www.irac-online.org/irac-moa-classification-version-7-3-now-posted/>
 - 14) S. KOBAYASHI: Researches on Population Ecology 10, 40-44 (1968)
“Estimation of the individual number entering each development stage in an insect population”
 - 15) N. J. MILLS: Oecologia, 51, 206-211 (1981)
“The estimation of mean duration from stage frequency data”
 - 16) L. P. LEFKOVITCH: Biometrics, 21, 1-18 (1965)
“The study of population growth in organisms grouped by stages”
 - 17) N. YUSOFF, H. BUDIN and S. ISMAIL: World Academy of Science, Engineering and Technology, 62, 477-482 (2012)
“Simulation of population dynamics of *Aedes aegypti* using climate dependent model”
 - 18) A. YOKOYAMA, K. OHTSU, T. IWAFUNE, T. NAGAI, S. ISHIHARA, Y. KOBARA, T. HORIO and S. ENDO: Journal of Pesticide Science, 34, 21-26 (2009)
“Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains”

- 19) 日本植物防疫協会：農薬ハンドブック2011年版
- 20) J. L. PETERSON, P. C. JEPSON and J. J. JENKINS: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2205-2214 (2001)
 “A test system to evaluate the susceptibility of Oregon, USA, native stream invertebrates to triclopyr and carbaryl”
- 21) W. G. GOODMAN and N. A. GRANGER: in L. L. GILBERT ed., *Insect Development, Morphogenesis, Molting and Metamorphosis*, University of North Carolina, USA, 306-394 (2005)
 “8 The Juvenile Hormones”
- 22) E. C. ENSLEE and L. M. RIDDIFORD: *Roux’s Archives of Developmental Biology*, 181, 163-181 (1977)
 “Morphological effects of juvenile hormone mimics on embryonic development in the bug, *Pyrrhocoris apterus*”
- 23) N. TATARAZAKO, S. ODA, H. WATANABE, M. MORITA and T. IGUCHI: *Chemosphere*, 53, 827-833 (2003)
 “Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*”
- 24) M. MIYAMOTO, H. TANAKA and T. KATAGI: *SUMITOMO KAGAKU*, 2008-I, 1-18 (2008)
 “Ecotoxicological risk assessment of pesticides in aquatic ecosystems”
- 25) S. HAGINO: in H. OHKAWA, H. MIYAGAWA and P. W. LEE, eds., *Pesticide Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p.415 (2007)
 “A state of the art of testing methods for endocrine disrupting chemicals in fish and daphnids”
- 26) K. T. TASSOU and R. SCHULZ: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1058-1062 (2009)
 “Effects of the insect growth regulator pyriproxyfen in a two-generation test with *Chironomus riparius*”
- 27) L. D. WILLIS and A. C. HENDRICKS: *Journal of the North American Benthological Society*, 11, 290-303 (1992)
 “Life history, growth, survivorship, and production of *Hydropsyche slossonae* in Mill Creek, Virginia”
- 28) 八木雅之、笹川満廣：環動昆, 4, 1-10 (1992)
 「コガタシマトビケラの生活史と群飛行動」
- 29) ISO: ISO 8692 (2004)
 “Water Quality—Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae”
- 30) M. S. J WARNE and D. W. HAWKER: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 23-28 (1995)
 “The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis”
- 31) M. FAUST, R. ALTENBURGER, T. BACKHAUS, H. BLANCK, W. BÖDEKER, P. GRAMATICA, V. HAMER, M. SCHOLZE, M. VIGHI and L. H. GRIMME: *Aquatic Toxicology*, 56, 13-32 (2001)
 “Predicting the joint algal toxicity of multicomponent s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants”
- 32) M. FAUST, R. ALTENBURGER, T. BACKHAUS, H. BLANCK, W. BÖDEKER, P. GRAMATICA,

V. HAMER, M. SCHOLZE, M. VIGHI and L. H. GRIMME: Aquatic Toxicology, 63, 43-63 (2003)
“Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action”

（３）確率論を導入した農薬の生物多様性影響評価法の開発

（独）農業環境技術研究所

有機化学物質研究領域

永井 孝志

平成23～25年度累計予算額：409千円

（うち、平成25年度予算額：183千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

河川生態系を構成する様々な生物種間の感受性差について、確率論的に解析する種の感受性分布（SSD）を活用し、農薬の生物多様性（種の多様性）に対する影響評価法を開発した。サブテーマ（２）で得られた水生昆虫や付着藻類の毒性データを活用し、SSDの解析を行うとともに、毒性データが少ない場合のSSDを推定する手法を新たに開発した。92剤の除草剤を対象としたSSD解析の結果、SSDの傾き（対数標準偏差値）は除草剤の作用機作ごとに有意な差（ $P<0.001$ ）が見られた。また、作用機作ごとに標準試験種である緑藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*）の毒性値（ EC_{50} 値）は、SSDの中央値（対数平均値）と有意な相関関係（ $P<0.05$ ）が見られたが、SSDの傾きとは有意な関係（ $P>0.05$ ）がなかった。以上により、除草剤の作用機作ごとに解析した緑藻標準種の EC_{50} 値とSSDの中央値との回帰式と、作用機作ごとのSSDの傾きの平均値により、除草剤のSSDが推定できることが示唆された。開発したSSD推定方法を用いて、わが国の水稻用除草剤12種のSSDパラメータ（中央値と傾き）を推定し、文献等により収集した複数の毒性データから解析したSSDパラメータとの比較を行った結果、両者は概ね一致しておりSSD推定手法の有効性が確認された。サブテーマ（４）で必要とされる、複数農薬の曝露による生物多様性への影響評価を可能とするため、累積リスクを考慮したSSD解析手法の改良を行った。既存のConcentration-Additive（CA）モデルとResponse-Additive（RA）モデルを用いた複合影響の予測結果と、サブテーマ（２）で得られた複合影響試験結果の比較を行った結果、作用機作が同じ場合にはCAモデル、作用機作が異なる農薬の場合はRAモデルによる予測精度が良好であった。SSDによる複数の農薬による影響を受ける種の割合（msPAF）の計算においても、CAとRAモデルが適用可能であることが確認された。

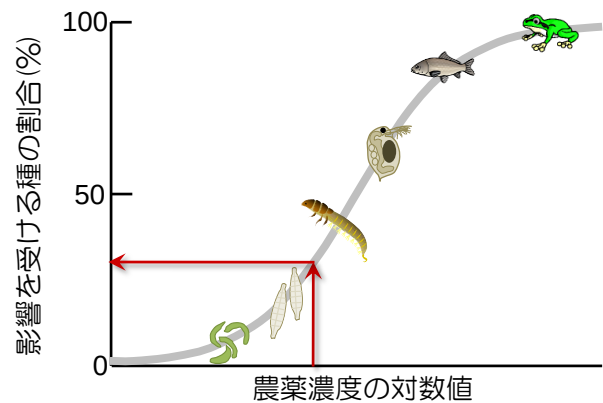
〔キーワード〕

種の感受性分布、作用機作、複合影響、累積リスク

1. はじめに

農薬はその作用機作の特殊性により、生物種によって毒性が特徴的に異なるため、種間の感受性差を十分に考慮したリスク評価を行うことが望まれる。しかしながら、環境中に生息する全ての生物種に対する毒性試験を実施し、毒性データを得ることは現実的に不可能である。一方で経験則により、複数の生物種に対する農薬の感受性は対数正規分布に適合することが知られており、図(3)-1のように累積確率分布で表現できる。このように、生物種間の感受性差を統計学的な分布で表現したものが、種の感受性分布（species sensitivity distribution, SSD）である¹⁾。SSDはある程

度の毒性データが揃っていれば、図(3)-1のように農薬濃度と影響を受ける種の割合との関係として表現できる。欧米において、SSDは基準値設定の根拠や生態リスク評価を行う際に幅広く用いられている。米国や欧州、オーストラリアなどでは、SSDの5パーセンタイル値に相当する濃度（5%の種が影響を受ける濃度、言い換えれば95%の種が保護される濃度）をHC₅（5% Hazardous Concentration）と表現し、これを無影響濃度とすることで、水生生物保全のための水質基準値の設定根拠として用いている²⁻⁴。これは、95%以上の種を保護できれば、種の多様性には大きな影響は無い、という仮定に基づいている。図(3)-1縦軸の「影響を受ける種の割合」は、生物多様性（種の多様性）に対する影響度指標と見なすことができ、定量的なリスク評価に適した指標である。わが国で使用される様々な水稻用除草剤についても、SSDを用いてリスクの比較を行った事例がある⁵。



図(3)-1 種の感受性分布の概念図

SSD解析に必要な毒性データの数（種数）は各国のガイドライン等によって異なるが、OECDにおいては5種以上とされている⁶。しかし、5種以上のデータが得られる農薬は限定されており、多くの農薬ではデータ不足のため、SSDの活用ができないのが実情である。サブテーマ（2）において、わが国の河川に在来する付着藻類5種を選定し、SSD解析に必要なデータを効率的に得ることができる新たな毒性試験法を開発したが、全ての農薬に対し試験を行うのは現実的に困難である。従って、幅広い農薬に対しSSDを用いたリスク評価を行うには、少ないデータからでもSSDを推定できる手法の開発が求められる。また、サブテーマ（4）では、様々な防除体系で使用する複数の農薬による生態リスクを総合的に評価することとなっている。すなわち、SSDを用いて複合影響を考慮した生態リスク（本研究では「累積リスク」と定義する）の評価手法を開発する必要がある。これまでに、de Zwart⁶らがSSDを用いた累積リスク評価法を提案した事例があるが、実験的な検証は未だなされていない。従って、SSDを用いた累積リスクの評価法を実験的に検証することが求められている。

2. 研究開発目的

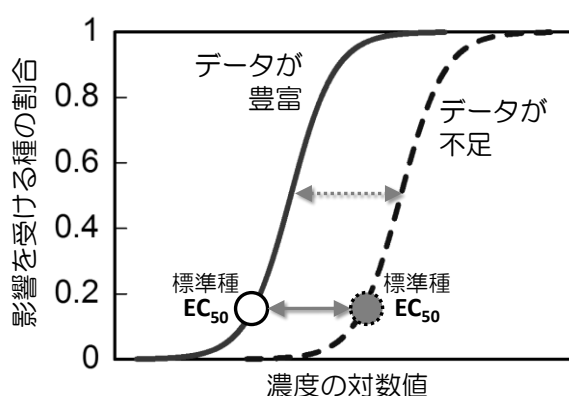
本研究では、種の感受性分布（SSD）を活用した農薬の生物多様性に対する影響評価法を開発することを目的とした。まず、SSDパラメータ（中央値と傾き）と除草剤の作用機作との関係を明らかにし、少ない毒性データからでもSSDを推定可能な手法を開発した。これにより、SSDによる評価が可能な農薬の範囲を大幅に拡張することが可能となる。また、開発したSSDの推定手法について、推定誤差の確率論的な解析を行った。これにより、SSDを用いた生態リスク評価結果の信頼性が確保される。さらに、サブテーマ（4）で必要とされる、複数農薬の曝露による生物多様性への影響評価を可能とするため、既存の複合影響予測モデルによる累積リスクを考慮したSSDの解析手法を開発し、サブテーマ（2）で得られた複合毒性試験の結果を用いて本評価法の有効性を検証した。

3. 研究開発方法

(1) 種の感受性分布の推定方法の開発

SSD解析に必要な毒性データの数（種数）は、オランダでは4種類以上、デンマーク、オーストラリアおよびOECDでは5種類以上、米国では8種以上、EUでは5～10種類以上とされている⁶⁾。TenBrook et al.⁶⁾は、各国のSSD解析手法を比較検討し、対数正規分布を仮定したSSD解析には5種以上のデータが必要と結論づけている。また、Okkerman et al.⁸⁾は、SSD解析には7種以上のデータが理想ではあるが、費用対効果を考慮すれば5種以上としても十分であると述べている。さらに、Aldenberg and Slob⁹⁾が行った解析によると、SSDの信頼区間の幅はデータ数を2から5に増えるに従って格段に狭まるが、5以上ではそれほど変化しないことが確認されている。米国における除草剤の登録に際し、要求される5種の一次生産者（4種の藻類＋ウキクサ）の毒性データを用いると、一次生産者群集を代表するHC₅を推定することができる¹⁰⁾。以上を踏まえ、本研究では5種のデータを用いたSSD解析を行うことが妥当であると結論づけた。ただし、農薬の場合は感受性の高い分類群のデータを用いて解析する必要がある。すなわち、殺虫剤の場合は節足動物で5種以上、除草剤の場合は藻類で5種以上の毒性データが必要となる。殺菌剤の場合は分類群と感受性の関係が明確ではないため、分類群を特定せずに5種類以上のデータを用いる。しかし、5種以上のデータが得られる農薬は限定されており、多くの農薬ではデータ不足のためSSDの活用ができないのが実情である。

一方で、種間の感受性差は、農薬の作用機作により非常に特徴的であることが知られている。サブテーマ（2）の付着藻類の毒性試験結果からも、作用機作によって感受性の高い種は特徴的であり、また種間の感受性差の大きさも特徴的であることが判明している。すなわち、作用機作の情報を利用してSSDを推定できると考えられる。作用機作が同じ農薬の間では、①SSDの傾き（対数標準偏差）は平行である、②生物種間の感受性の順序は同じである、という仮定に基づけば、ある作用機作の農薬に対しSSDが構築されていれば、作用機作が同じである別の農薬の標準種の毒性データ（EC₅₀値）からSSDを推定することが可能となる（図(3)-2）。



図(3)-2 毒性データが豊富な農薬のSSDからデータの不足している農薬のSSDを推定する手法の概念図（作用機作が同じ場合）

SSD推定手法の開発にあたり、前述の仮定が適用可能かどうかの検証を行った。このため、米国環境保護庁が作成した農薬生態毒性データベース（<http://www.ipmcenters.org/ECotox/index.cfm>）を

用いて、除草剤を対象としたSSD解析を行った。まず、藻類にウキクサなどを加えた一次生産者について、5属以上の毒性データ（EC₅₀値）が得られた除草剤113種類を抽出した。属内で複数のデータが得られた場合には、これらの幾何平均値を求めた。属ごとのEC₅₀値の対数平均（ln Mean：SSDの中央値を表す）と対数標準偏差（ln SD：SSDの傾きを表す）を計算し、SSDのパラメータとした。また、対数正規分布への適合性をコルモゴロフ・スミルノフ検定、アンダーソン・ダーリン検定を用いて有意水準5%で検定した。両者の検定をパスした除草剤92剤について、その後の解析を行った。

92剤の除草剤を、Herbicide Resistance Action Committee（HRAC）の分類に従って作用機作ごとに分類した。作用機作ごとにln SDの傾向をまとめ、一元配置分散分析によって作用機作ごとに有意な差の有無を検定した。次に、緑藻の標準種（*Pseudokirchneriella subcapitata*）のEC₅₀値からSSDを推定する手法を検討した。ここで、作用機作が同じ除草剤のSSDは平行であると仮定する（図(3)-2）。すなわち、作用機作ごとにln SDは一定の値を取り、SSDの中央値であるln Meanは緑藻標準種のEC₅₀値と直線関係にある、という仮説である。仮説の検証は、緑藻標準種のEC₅₀値はln Meanと有意な直線関係にあり、ln SDとは有意な関係がないことを、作用機作ごとに検定した。

開発したSSD推定手法の妥当性を検証するため、12種類の水稲用除草剤（ベンスルフロンメチル、ピラゾスルフロンエチル、イマゾスルフロン、シメトリン、ベンタゾン、プレチラクロール、メフエナセット、カフェンストロール、エスプロカルブ、モリネート、プロモブチド、キノクラミン）の毒性データを文献等により収集してSSD解析を行い、緑藻標準種のEC₅₀値のみから推定したSSDとの比較を行った。また、SSDの推定誤差を確率論的に定量化するため、パラメトリックブートストラップ法により、信頼度5-95%の信頼区間を推定した。各作用機作内でのln SDの変動については正規分布を仮定するとともに、ln Meanの推定式からの残差についても正規分布を仮定した。2つの分布から独立に10000回ランダムサンプリングを行い、残差については推定したln Meanに足し、生成した10000組のSSDから信頼区間を計算した。

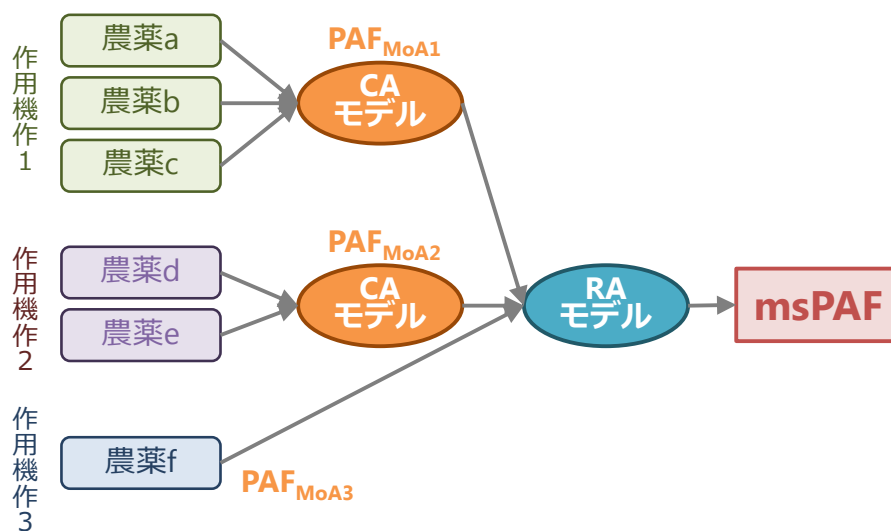
（２）複合影響評価手法の開発と検証

サブテーマ（２）で5種類の付着藻類を用いた複合毒性試験を実施した。この結果（図(2)-19）において、付着藻類の比増殖速度が0.5以下になった場合に、その種は影響を受けたと判断すると、複合毒性試験における影響を受ける種の割合は図(2)-20のように計算される。この結果を用い、サブテーマ（２）で個別種の複合影響を予測した場合と同様の手順で、種の感受性分布（SSD）を用いて複数の農薬による累積影響率を計算することが可能である。単一の生物種の場合は、それぞれの農薬の濃度－反応関係から累積影響率を計算したが、複数の生物種（生物多様性）に対するこの場合はそれぞれの農薬のSSDから累積影響率（影響を受ける種の割合）を計算した。図(2)-20の結果（影響を受ける種の割合）と、CA、RAモデルで予測した結果とを比較し、SSDを用いた複合影響予測モデルの妥当性を検証した。

サブテーマ（４）では、様々な防除体系で使用する複数の農薬による生態リスクを評価する必要がある。そこで、生態リスクの指標として、SSDから計算される「影響を受ける種の割合

（Potentially Affected Fraction, PAF）」を用いた。ただし、ある防除体系では、複数の殺虫剤、殺菌剤、除草剤が使用され、農薬の種類により感受性の高い分類群が異なるため、生態リスクの計算方法もさらに改良する必要がある。そこで、複数の農薬が使用される条件で、作用機作が同じ

農薬と異なる農薬が混在している場合には、CA－RA混合モデルを用いた。図(3)-3に6種類の農薬の使用を想定し、農薬a, b, cが作用機作（Mode of Action, MoA）1、農薬d, eが作用機作2、農薬fが作用機作3である場合の、累積リスクの計算方法を概念図で示す。まず、作用機作1の農薬a, b, cの累積リスク（ PAF_{MoA1} ）と、作用機作2の農薬d, eの累積リスク（ PAF_{MoA2} ）を、それぞれの農薬のSSDからCAモデルで計算する。次に、 PAF_{MoA1} 、 PAF_{MoA2} と農薬fの影響率（ PAF_{MoA3} ）から、RAモデルによってmsPAF（複数農薬によって影響を受ける種の割合, multi-substance PAF）を計算する。本手法は、農薬数や組み合わせによらず適用が可能である。



図(3)-3 CA－RA混合モデルによる累積リスク（msPAF）の計算

4. 結果及び考察

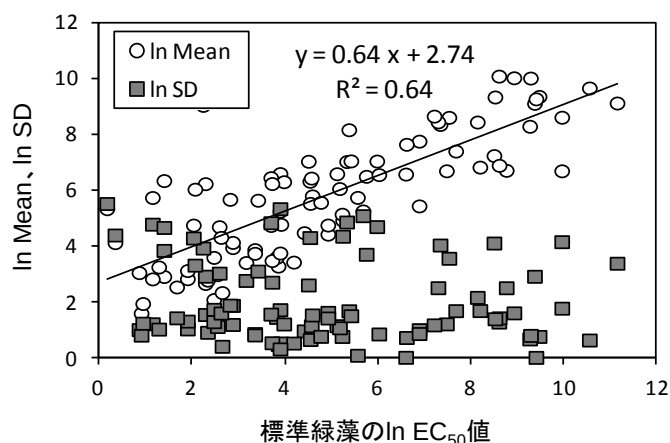
（1）種の感受性分布の推定方法の開発

92種の除草剤のSSD解析を行い、対数標準偏差（ $\ln SD$ ：SSDの傾きを表す）を作用機作ごとにまとめた（表(3)-1）。SSD解析が可能となる5種類以上の毒性データが得られた除草剤について、作用機作ごとに分類すると、ALS阻害剤（22剤）、光化学系II阻害剤（19剤）、PPO阻害剤（8剤）、微小管重合阻害剤（6剤）、超長鎖脂肪酸生合成阻害剤（7剤）、脂質生合成阻害剤（6剤）、オーキシシン作用剤（6剤）であった。一元配置分散分析の結果、 $\ln SD$ の平均値は作用機作ごとに有意な差がある（ $P<0.001$ ）という結果が得られた。特に、スルホニルウレア系除草剤を代表とするALS阻害剤や、一部の酸アミド系除草剤を含む超長鎖脂肪酸生合成阻害剤は、 $\ln SD$ が大きく（SSDの傾きが緩やか）、藻類種間の感受性差が非常に大きい傾向が見られた。一方、トリアジン系除草剤や尿素系除草剤を含む光化学系II阻害剤は、 $\ln SD$ が小さく（SSDの傾きが急）、藻類間の感受性差が小さい傾向が見られた。このように、SSDのパラメータである $\ln SD$ の値は、除草剤の作用機作ごとに特徴があるため、作用機作からの推定が可能であることが明らかとなった。

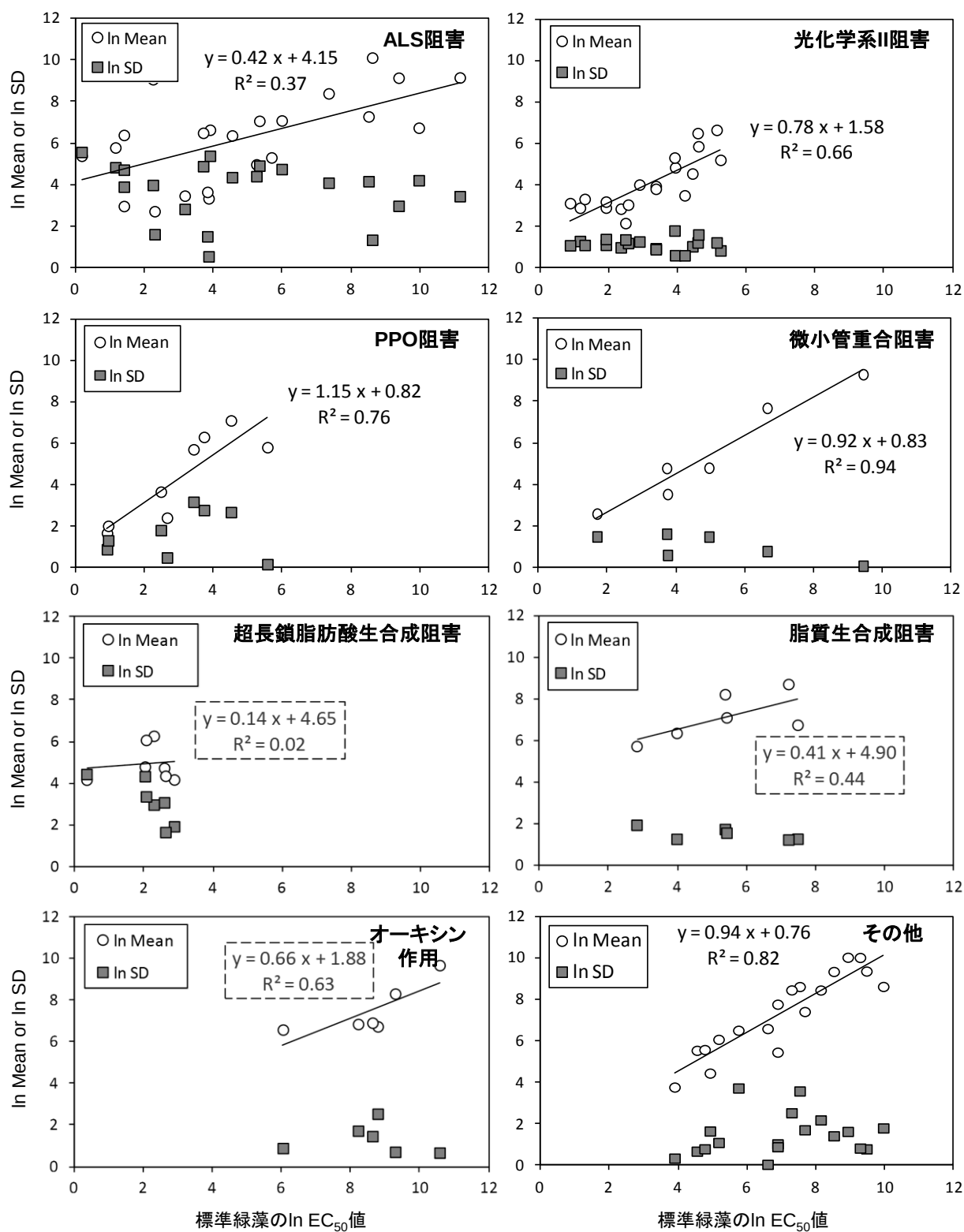
表(3)-1 作用機作ごとのSSDの傾き (ln SD) の平均値と標準偏差、最小および最大値

HRAC Group	作用機作	度数	平均値	標準偏差	最小値	最大値
B	ALS阻害	22	3.79	1.42	0.53	5.57
C1, C2, C3	光化学系II阻害	19	1.11	0.30	0.58	1.77
E	PPO阻害	8	1.64	1.13	0.14	3.15
K1	微小管重合阻害	6	1.00	0.62	0.07	1.61
K3	超長鎖脂肪酸合成阻害	7	3.11	1.07	1.65	4.44
N	脂質合成阻害	6	1.50	0.29	1.23	1.93
O	オーキシシン作用	6	1.35	0.73	0.69	2.56
	その他	18	1.51	1.01	0.07	3.75
合計		92	2.06	1.45	0.07	5.57

緑藻の標準種 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) のEC₅₀値からSSDを推定する手法の妥当性を検証するため、92種類の除草剤について緑藻標準種のEC₅₀値とSSDパラメータ (ln Mean、ln SD) との関係解析した。まず、92種類の除草剤全体を対象とした関係を図(3)-4に示す。緑藻標準種のEC₅₀値は、ln Meanと有意な相関関係 ($P<0.05$) があったが、ln SDとは有意な関係がなかった ($P>0.05$)。つまり、緑藻標準種に対する毒性の強さと、SSDの形状 (傾き) とは関係がないことが明らかとなった。

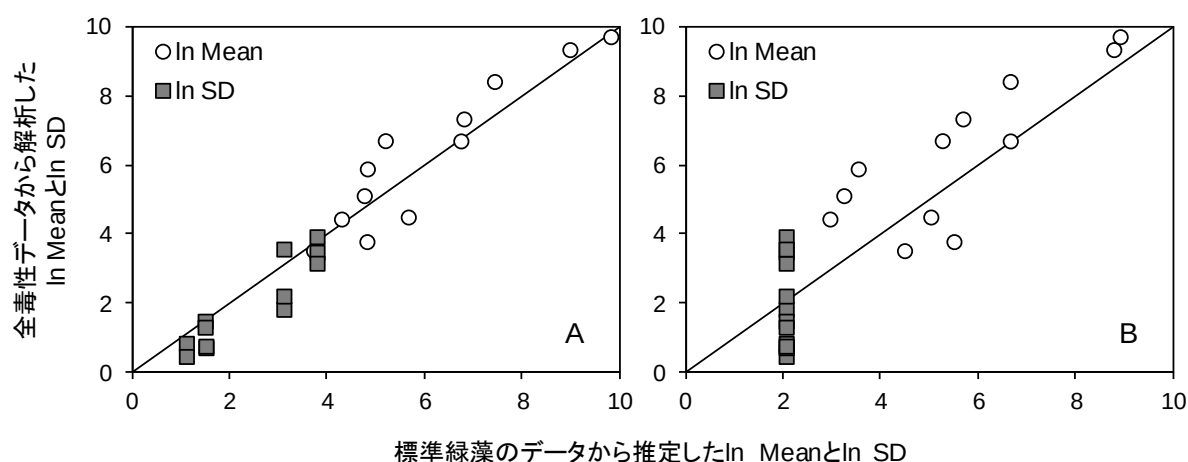
図(3)-4 92種類の除草剤における緑藻標準種のEC₅₀値とln Mean、ln SDとの関係

92種類の除草剤全体を対象とした図(3)-4について、作用機作ごとに分けて解析した一例を図(3)-5に示す。ここでは、データ数の多いALS阻害剤と光化学系II阻害剤の事例では、両者ともに緑藻標準種のEC₅₀値はln Meanと有意な相関関係 ($P<0.05$) があったが、直線の傾きや切片は作用機作ごとに異なっていた。一方、緑藻標準種のEC₅₀値とln SDとは両者ともに有意な関係がなかった ($P>0.05$)。これらの関係は、その他の作用機作の除草剤でも同様であった。以上の結果から、毒性データが統計解析に必要な数 (5属以上) に満たない場合、本手法によりSSDの推定が可能であると示唆された。すなわち、除草剤の作用機作ごとに解析した緑藻標準種のEC₅₀値とln Meanとの回帰式および作用機作ごとのln SDの平均値により、毒性データの少ない除草剤のSSDが推定できる。

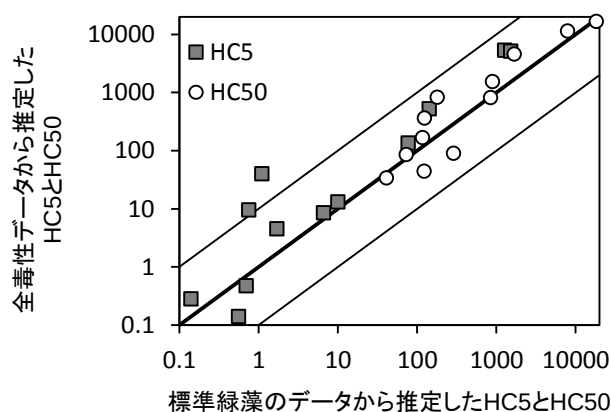


図(3)-5 除草剤の作用機作ごとに分類した緑藻標準種の EC_{50} 値と $\ln$ Meanおよび $\ln$ SDとの関係
(点線で囲った回帰式は、統計的に有意ではないことを示す)

開発したSSD推定方法を用いて、わが国の水稲用除草剤12種のSSDパラメータ ($\ln \text{Mean}$ と $\ln \text{SD}$) を緑藻標準種の EC_{50} 値から推定し、文献等より収集した複数の毒性データから解析したSSDパラメータと比較した(図(3)-6)。その結果、推定された $\ln \text{Mean}$ と $\ln \text{SD}$ は、両者ともに全毒性データを用いて解析した値と概ね一致しており、本研究で開発したSSD推定手法の有効性が確認された(図(3)-6A)。また、作用機作の情報を使用せずにSSDパラメータを推定した場合(図(3)-4の全作用機作をプールした推定法を使用)、推定の精度は特に $\ln \text{SD}$ について大きく低下した(図(3)-6B)。以上により、作用機作の情報はSSD推定に非常に重要であることが示された。また、推定したSSDから得られる HC_5 や HC_{50} などの値も、全毒性データを用いて解析した値と概ね一致している結果が得られ(図(3)-7)、一部例外はあるが、本手法は実用的に活用できる精度を有していることが確認された。

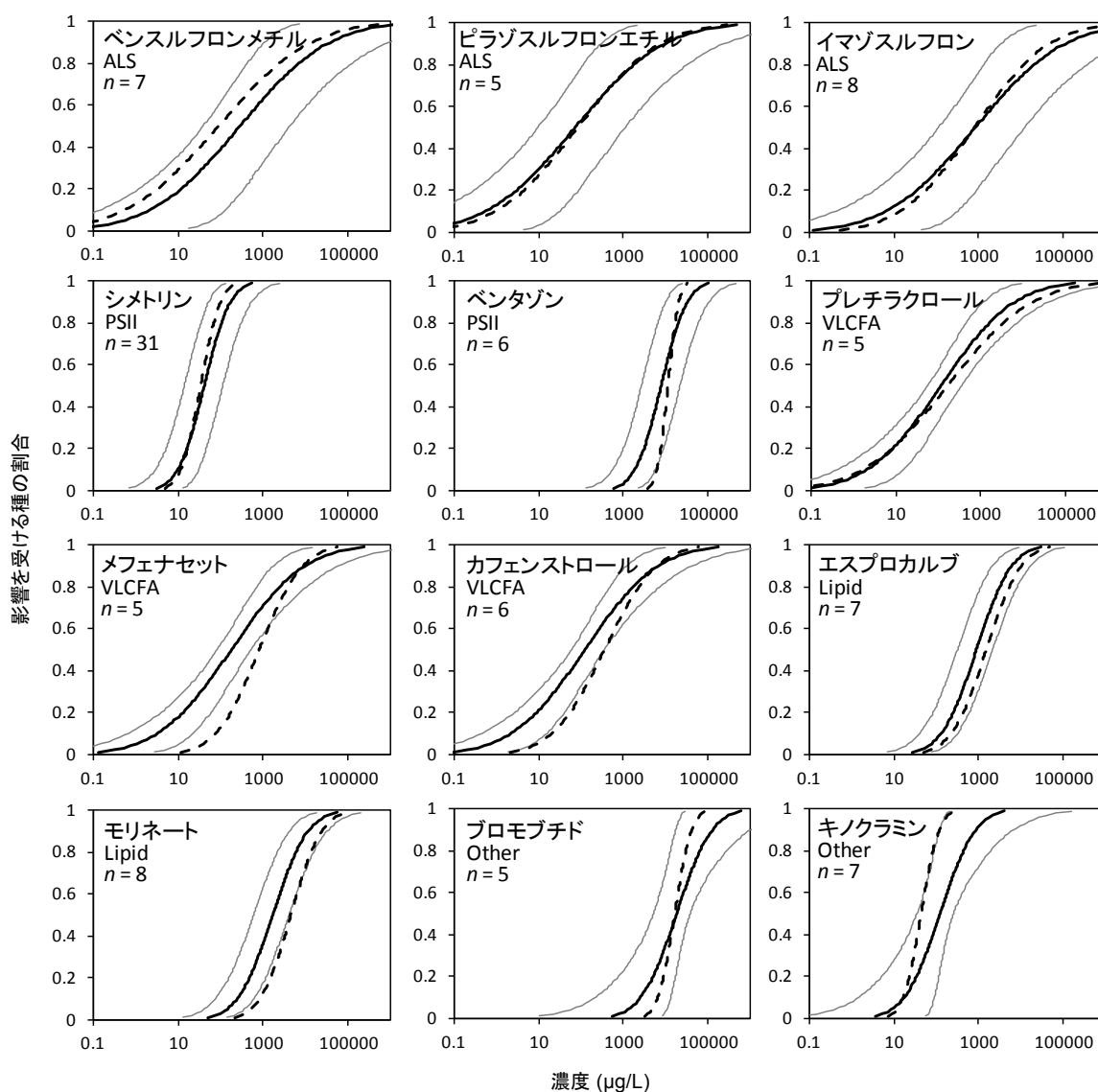


図(3)-6 SSDパラメータの推定値と全データからの解析値の比較 (Aは作用機作の情報を使用した場合、Bはその情報を使用しない場合を表す。直線は1:1の関係を示す)



図(3)-7 HC_5 と HC_{50} の推定値と全データからの解析値の比較 (太線は1:1の関係を示し、細線は1:10、1:0.1の関係を示す)

SSD推定の信頼区間を計算し、全毒性データを用いて解析したSSDと比較した(図(3)-8)。全毒性データを用いて解析したSSDは、メフェナセットなど一部で若干のずれがあるものの、全濃度レンジにおいて概ね90%信頼区間内の幅に収まっていた。推定モデルへの当てはまり具合や $\ln SD$ の変動の大きさなどにより、信頼区間の幅は異なる結果となり、ALS阻害系では全濃度レンジにわたり幅が広く、その他の系では裾野の部分の幅が広がっていた。SSD推定の際には90%信頼区間を計算することによって、推定の信頼度を担保できると考えられた。



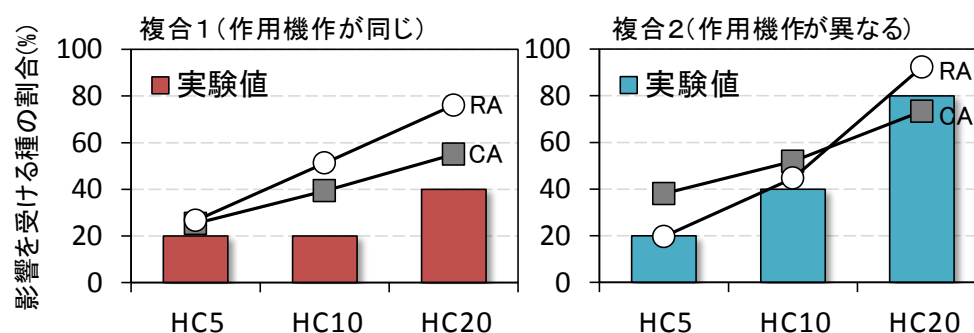
図(3)-8 全毒性データ(データ数 n)から解析したSSD(破線)と推定モデルによるSSD(濃い実線:最尤推定、薄い実線:90%信頼区間)との比較

本研究では、①SSDの傾き(対数標準偏差)は平行である、②種間の感受性の順序は同じである、という仮定に基づきSSDの推定を行った。これまでに、この仮定を支持する研究結果は複数報告されている。Vaal et al.¹¹⁾は、多くの化学物質のSSDの解析を行い、作用機作によって傾きが異なる傾向があることを示している。また、Sala et al.¹²⁾は、有機リン系殺虫剤を対象として、本研究と同

様の仮定に基づいてSSDを推定する手法を提案した。また、Chevre et al.¹³⁾は、作用機作が同じである除草剤のSSDの傾きは等しいという仮説の妥当性の検証を試みた。トリアジン系とフェニルウレア系（共に光化学系II阻害剤）の計11種の除草剤のSSDを解析し、それぞれの剤ごとのデータで設定したSSDの傾きと、11種の除草剤の全ての毒性データを用いて設定した一つの共通のSSDの傾きが同じである、という帰無仮説は11種の内7種の除草剤で棄却されなかった。結論としては、この仮説の妥当性を明確に検証するにはデータが不足していることを示している。また、2種の生物種におけるEC₅₀などの毒性値の対数値が直線的な関係を示すことは一般的に知られており、2種間の毒性値の関係は、農薬の作用機作ごとに異なる直線関係となる¹⁴⁾。すなわち、種間の毒性値の関係は作用機作ごとに分類することでより精密になることが示唆される。さらに、同様の仮定を用いたSSDの推定方法としてInterspecies Correlation Estimates (ICE)¹⁵⁾がある。これは2種間の毒性値の直線関係を用いて、ある生物種の毒性値から別の複数種の毒性値を予測し、SSDを推定する方法である。この中で、特別な作用機作を持たない複数の一般化学物質において、SSDにおける生物の感受性の順位はおおむね保存されることが確認されている。以上のことから、外挿推定における仮定については概ね支持する情報が複数得られている状況である。

（２）複合影響評価手法の開発と検証

サブテーマ（２）と同様の手法で、CAモデルとRAモデルを用いた複合影響の予測結果と実際の試験結果の比較を図(3)-9に示す。単一種の場合と同様に、作用機作が同じ場合にはCAモデルによる予測精度が良好であり、作用機作が異なる場合にはRAモデルによる予測精度が良好であった。SSDを用いた、複数の農薬による影響を受ける種の割合（msPAF）の計算においても、CAとRAモデルが適用可能であることを検証することができた。これは、図(3)-3に示した累積リスクの計算の妥当性を示すものであり、過去に同様の報告例はなく画期的な成果である。

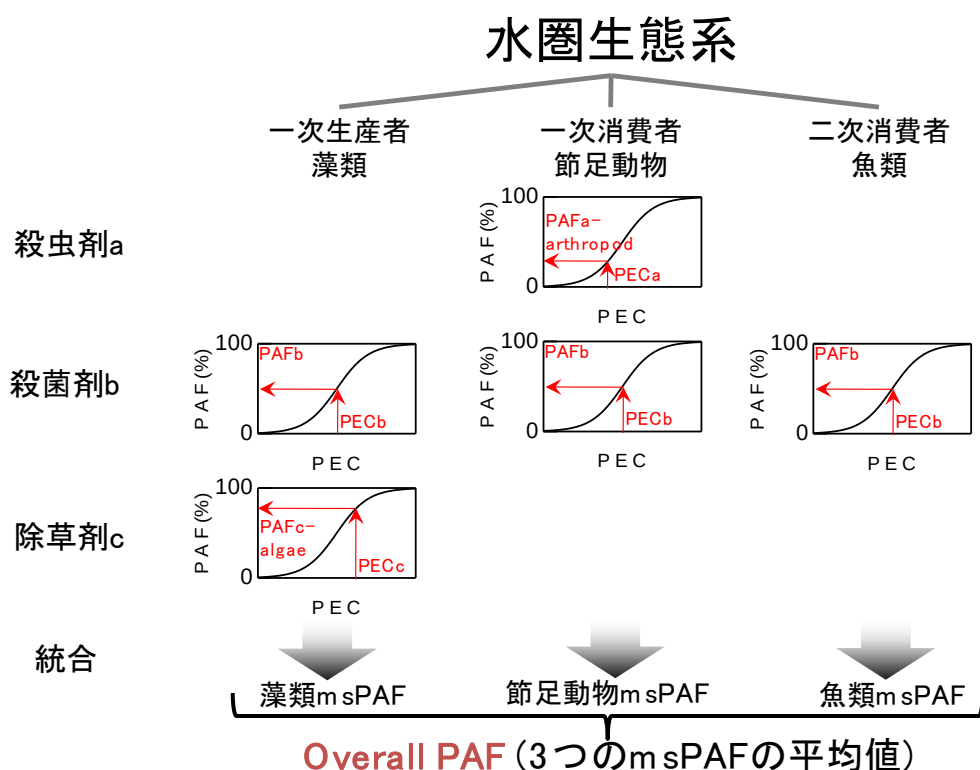


図(3)-9 複合毒性試験結果とモデル予測の比較

これまでの検討結果を活用し、サブテーマ（４）における様々な防除体系で使用する複数の農薬使用による生態リスクを定量的に評価する手法を開発した（図(3)-10）。ここでは、農薬の種類が異なると感受性の高い分類群が異なる問題に対処した。まず、水圏生態系を一次生産者（藻類）、一次消費者（節足動物）、二次消費者（魚類）の3つに大きく分類する。一般に、殺虫剤は節足動物、除草剤は一次生産者に対して毒性が強いため、それぞれに対応したSSDを解析する。殺菌剤は全ての水生生物を一括りにしてSSDを解析する。農薬の種類が多いため、全ての農薬でSSD解析に

必要なデータが揃わない場合も想定されるが、この場合は本研究で開発したSSD推定手法を用いてSSDを求める。次に、各農薬の濃度からPAFを計算するが、殺菌剤と除草剤のSSDから藻類のmsPAFを、殺虫剤と殺菌剤のSSDから節足動物のmsPAFを、殺菌剤のSSDから魚類のmsPAFを、複合影響モデルを用いてそれぞれ計算する。最後に、3つのmsPAFの平均値を計算して、これを水圏生態系全体における影響を受ける種の割合（Overall PAF）として推定する。

曝露側で固定値を使用せずに、分布を使用することも可能である。サブテーマ（1）で開発したPADDY-Largeモデルでは、河川水中濃度の流域内の水平分布（250 mの河川セグメントごとの濃度）や時系列変化の推定が可能である。本研究では、各セグメントにおける各農薬の最高濃度を用いOverall PAFを計算する。結果として、河川セグメントの数だけOverall PAFが計算される。さらに、各セグメントのOverall PAFの平均値をEPAF（Expected Overall PAF）と定義する。EPAFは評価対象流域における平均的な「影響を受ける種の割合」を示している。



図(3)-10 Overall PAFの計算方法の概念図

ここで注意すべき点として、この解析では農薬の使用時期の相違や河川水中の濃度変化など、時系列の変化は一切考慮していないことが挙げられる。すなわち、全ての農薬が一斉に使用され、その濃度のピーク時における急性毒性による影響の積み上げでリスクを評価していることである。この前提は実態と大きく異なる点ではあるが、防除体系ごとの生態リスクを同じ条件で計算し、相対的にリスクを比較するという目的においては十分に実用的と考えられる。一方で、リスクの絶対値についての意味づけには十分に注意する必要がある。

また、Overall PAFを計算する際に、3つの分類群のmsPAFの平均値を計算するが、藻類、節足動

物、魚類それぞれの「影響を受ける種の割合」を等価に扱えるのか、という疑問も当然出てくるだろう。これについてはいくつかの考え方があるものの、現時点でどれも合意形成されていない。ここでは、一次生産者（藻類）、一次消費者（節足動物）、高次消費者（魚類）の3グループのうちどれが欠けても生態系は成り立たないという前提に立ち、それぞれが同じ価値を持っているという考え方の下でリスクを平均化する手法を採用している。Duboudin et al. (2004)¹⁶⁾は、このような考え方を整理し、Biblio Approach、Equi Approach、Enviro Approachの3つに分類した。Biblio Approachはデータ数（すなわち文献数）に応じて重み付けして平均化する方法、Equi Approachは上記で採用した3つの分類群を等価と見なして平均化する方法、Enviro Approachは実際の野外環境における種数に応じて重み付けして平均化する方法である（魚類10%、脊椎動物26%、藻類64%という種数の割合が示されている）。リスク指標である「影響を受ける種の割合」の意味を考慮すると、Environ Approachが妥当とも考えられる。ところが、この方法で計算すると、ほとんど藻類の影響でOverall PAFが決まってしまう結果となり、これも生態系の実態を適切に反映しているとは言い難い。まだこの部分の知見は不足しているものの、現時点で得られる情報をまとめる限りでは、当面Equi Approachを使用することが望ましいと考えられる。

本サブテーマで検討した事項については、技術資料「農薬の生態リスク評価のための種の感受性分布解析」に考え方や具体的な計算方法を取りまとめた。この技術資料を参照することで、本研究で開発したSSDを用いた生態リスク評価手法を広く活用することが可能である。

5. 本研究により得られた成果

（１）科学的意義

従来、種の感受性分布（SSD）の解析を行うためには、複数の生物種に対する毒性データが必要とされているが、多くの農薬ではデータ不足のためSSDの活用ができないのが実情である。本研究ではSSDの形状と除草剤の作用機作との関係を明らかにし、毒性データが不足する場合の除草剤のSSD推定方法を開発した。また、本推定結果が実際の感受性分布とおおむね一致することを確認した。推定の不確実性が定量化できるため、リスク評価の際の信頼性も担保可能となった。本手法は、殺虫剤など他の農薬にも適用しうる。

SSDを用いた多種系の評価の場合においても、単独種の場合と同様に既存の複合影響予測モデルが適用可能であることを明らかにした。これは、過去に同様の報告例はなく画期的な成果である。これにより、複数の農薬の使用からなる様々な防除体系ごとの生態リスクの比較を可能とした。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成26年2月5日開催の平成25年度水産動植物登録保留基準設定検討会委員等による勉強会において、種の感受性分布（SSD）を用いた影響評価法について報告し、現行の評価手法では対応が困難な農薬について、感受性の種間差を適切に反映した評価が可能な手法として提示した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

種の感受性分布を用いた生態リスク評価法を改良し、複数の農薬に曝露された場合の累積リスクを計算する方法を開発した。これは、実際の河川水中で見られる多種多様な農薬の低濃度曝露

による生物多様性に対する複合影響を評価するのに有用である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. NAGAI and A. YOKOYAMA: Journal of Pesticide Science, 37, 233-239 (2012)
"Comparison of ecological risks of insecticides for nursery-box application using species sensitivity distribution"

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 永井孝志：植調, 45, 11, 451-459 (2012)
「環境保全型農業と除草剤（農薬）の新たな生態リスク評価法」
- 2) 永井孝志：第12回有機化学物質研究会資料, (独) 農業環境技術研究所編, 27-38 (2012)
「農薬生態毒性データベースの構築とその活用 ～種レベルと群集レベルの評価をつなぐ～」
- 3) 永井孝志：インベントリー, (独) 農業環境技術研究所編, 11, 58-69 (2013)
「農薬生態毒性データベースの構築とその活用」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 永井孝志、横山淳史：日本農薬学会第37回大会 (2012)
「種の感受性分布法を用いた育苗箱施用殺虫剤の生態リスク比較」
- 2) 永井孝志：第56回日本応用動物昆虫学会大会 (2012)
「統計学的手法を用いた育苗箱施用殺虫剤の生態リスク評価」
- 3) 永井孝志：第19回日本環境毒性学会研究発表会企画シンポジウム (2013)
「情報基盤としての農薬インベントリーとその出口としての生態リスク評価」
- 4) 永井孝志：農業環境技術研究所 第4回農業環境インベントリー研究会 (2014)
「農薬インベントリーを構成する様々なデータベースの構築と生態リスク評価への活用」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

永井孝志：日本リスク研究学会奨励賞受賞（平成24年11月10日）

8. 引用文献

- 1) L. POSTHUMA, G.W. SUTER, and T.P. TRASS: Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology (Environmental and Ecological Risk Assessment), Lewis Publishers, CRC Press (2002)
- 2) US EPA: Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. US Environmental Protection Agency (1985)
- 3) RIVM: Guidance document on deriving environmental risk limits. National Institute of Public Health and the Environment (2001)
- 4) ANZECC: Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council (2000)
- 5) 永井孝志、稲生圭哉、横山淳史、岩船敬、堀尾剛：日本リスク研究学会誌, 20, 279-291 (2011)
「11種の水稲用除草剤の確率論的生態リスク評価」
- 6) P.L. TENBROOK, R.S. TJEERDEMA, P. HANN, and J. KARKOSKI: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 199, 19-109 (2009)
“Methods for deriving pesticide aquatic life criteria”
- 7) D. DE ZWART and L. POSTHUMA: Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 2665-2676 (2005)
“Complex mixture toxicity for single species and multiple species: proposed methodologies”
- 8) P.C. OKKERMAN, E.J. VD PLASSCHE, W. SLOOFF, C.J. VAN LEEUWEN, and J.H. CANTON: Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, 182-193 (1991)
“Ecotoxicological effects assessment: A comparison of several extrapolation procedures”
- 9) T. ALDENBERG and W. SLOB: Ecotoxicology and Environmental Safety, 25, 48-63 (1993)
“Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data”
- 10) G. THURSBY, S. SANKULA, and M. LEWIS: Estimating aquatic plant community hazard concentrations for pesticide effects. US Environmental Protection Agency, EPA-HQ-2011-0898-0012 (2011)
- 11) M. VAAL, J.T. VAN DER WAL, J. HOEKSTRA, and J. HERMENS: Chemosphere, 35, 1311-1327 (1997)
“Variation in the sensitivity of aquatic species in relation to the classification of environmental pollutants”
- 12) S. SALA, S. MIGLIORATI, G.S. MONTI, and M. VIGHI: Ecotoxicology, 21, 1050-1062 (2012)
“SSD-based rating system for the classification of pesticide risk on biodiversity”
- 13) N. CHEVRE, C. LOEPFE, H. SINGER, C. STAMM, K. FENNER, and B.I. ESCHER: Environmental Science and Technology, 40, 426-435 (2006)
“Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water”

- 14) P. TREMOLADA, A. FINIZIO, S. VILLA, C. GAGGI, and M. VIGHI: *Aquatic Toxicology*, 67, 87-103 (2004)
 “Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment”
- 15) S.D. DYER, D.J. VERSTEEG, S.E. BELANGER, J.G. CHANEY, and F.L. MAYER: *Environmental Science and Technology*, 40, 3102-3111 (2006)
 “Interspecies correlation estimates predict protective environmental concentrations”
- 16) C. DUBOUDIN, P. CIFFROY, and H. MAGAUD: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 489-499 (2004)
 “Effects of data manipulation and statistical methods on species sensitivity distributions”

（４）生物多様性を対象とした地域レベルでの農薬のリスク指標の開発

（独）農業環境技術研究所

有機化学物質研究領域

堀尾 剛

農業環境インベントリーセンター

稲生 圭哉

有機化学物質研究領域

永井 孝志

平成24～25年度累計予算額：719千円

（うち、平成25年度予算額：536千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

近年、化学合成農薬と化学肥料の双方を、慣行レベルに比べて5割以上減らした特別栽培が推進されている。また、環境省では様々な農薬の流出防止技術（止水期間7日の徹底、適切な畦畔管理や水管理など）を提案している。しかし、これらの対策を講じた場合のリスク低減効果を定量的に評価する手法は確立されておらず、農薬の適切な管理対策を選定する手法の開発が求められている。本研究では、サブテーマ（１）で開発した曝露評価法と、サブテーマ（３）で開発した影響評価法を活用し、特定の地域における農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価する手法を開発することを目的とした。サブテーマ（１）で開発したPADDY-Largeモデルを用いて評価対象流域における河川水中濃度を計算し、最高濃度の超過確率曲線を求め、サブテーマ（３）で解析した種の感受性分布（SSD）を重ね合わせ、最高濃度の超過確率と影響を受ける種の割合（PAF）との関数を示す曲線を求めた。得られた曲線の下面積を算出することにより、影響を受ける種の割合の期待値（EPAF）として指標化した。また、特定の地域において水稻一作期間で使用される複数農薬の累積リスクを評価する手法の開発を行った。前述の河川水中農薬濃度の計算結果から、サブテーマ（３）で開発したCA-RA混合モデルを用いた手法により、「水圏生態系全体における影響を受ける種の割合（Overall PAF）」の流域内における平均値である「期待影響割合（Expected Overall PAF, EPAF）」を計算した。茨城県桜川の支流の一つである逆川流域を対象とし、開発した手法により種々の対策を講じた場合のリスク低減効果を比較した。慣行栽培でのリスク

（EPAF）は6.2%であったのに対し、特別栽培では、リスクは4.2%まで減少した。慣行栽培において、水管理を徹底することによるリスクは5.2%に減少し、さらに、畦塗りの徹底により特別栽培と同程度の3.5%までリスクを低減できることが示された。本手法により、地域性を考慮した農薬の適切な管理対策の提示が可能となった。

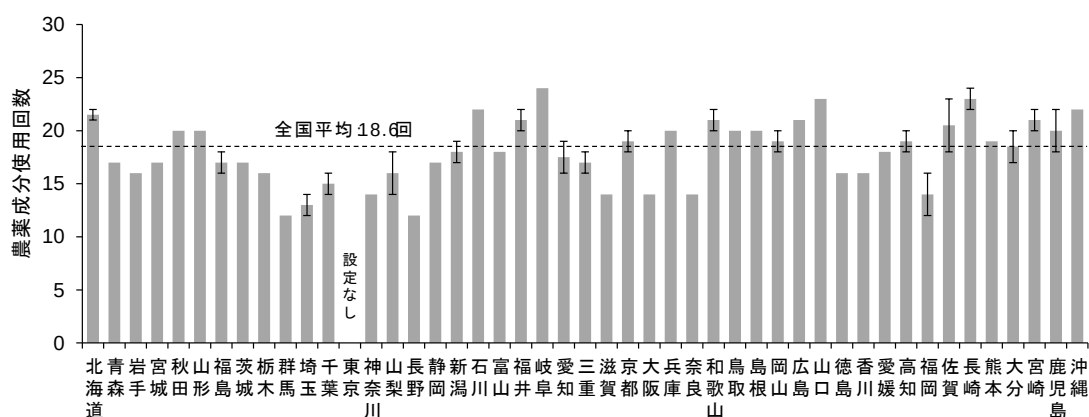
〔キーワード〕

リスク低減、防除体系、農薬の節減、流出防止技術の導入

１．はじめに

農林水産省では農業の持つ物質循環機能を生かし、生産性との調和に留意しつつ、化学合成農薬や化学肥料の使用を低減することを基本とした環境保全型農業を推進している¹⁾。その一環とし

て、2003年に特別栽培農産物に係る表示ガイドラインが改正され²⁾、化学合成農薬と化学肥料の双方を慣行レベル（各地域で慣行的に行われている化学合成農薬および化学肥料の使用状況）に比べて5割以上減らして栽培された農産物を「特別栽培」と表示することが可能となった。慣行レベルは地方公共団体が個別に策定または確認し、節減割合の算定基準に用いられている。図4-(1)に都道府県が定めた水稻栽培における化学合成農薬の2013年度の慣行レベル（農薬成分使用回数）³⁾を示すが、地域により農薬の使用回数は様々であり、最大で岐阜の24回、最小で群馬および長野の12回と2倍の差がある。従って、特別栽培を実施する場合、地域によって削減される農薬成分の種類や使用回数は大きく異なり、環境保全の効果は大きく異なる。



図(4)-1 特別栽培農産物に係る表示ガイドラインに基づき都道府県が定めた水稻栽培における化学合成農薬の慣行レベル（2013年度、棒グラフは各都道府県の農薬成分使用回数、エラーバーはその最大、最小を表す）

そもそも環境保全を目的とした場合、低減の対象は「農薬成分使用回数」ではなく、農薬使用に伴う「生態リスク」であるはずだが、リスクの低減効果を評価する手法は確立されていない。農業現場では過度の農薬節減に伴う病害虫の発生が多発しており、農産物の安定生産に支障が生じている事例が報告されている⁴⁾。従って、農薬の節減によるリスク低減効果を定量的に評価する手法の開発は喫緊の課題となっている。

一方、農薬の環境負荷を低減するため、水田で使用する農薬について、散布後の落水や掛け流しを行わないとする止水期間が7日に設定されている。これに加え、環境省では適切な畦畔管理（畦塗りの徹底、波板・被覆シートによる漏水防止など）や水管理（止水板の高めの設置など）などによる農薬流出防止技術を提案している⁵⁾。しかしながら、これらの対策を講じた場合の農薬流出の低減効果は、対象とする地域や農薬の種類により大きく異なり、また、それぞれの流出防止技術の導入によるリスク低減効果を定量的に評価する手法は確立されておらず、地域性を考慮した農薬の適切な管理対策を選定する手法の開発が求められている。

2. 研究開発目的

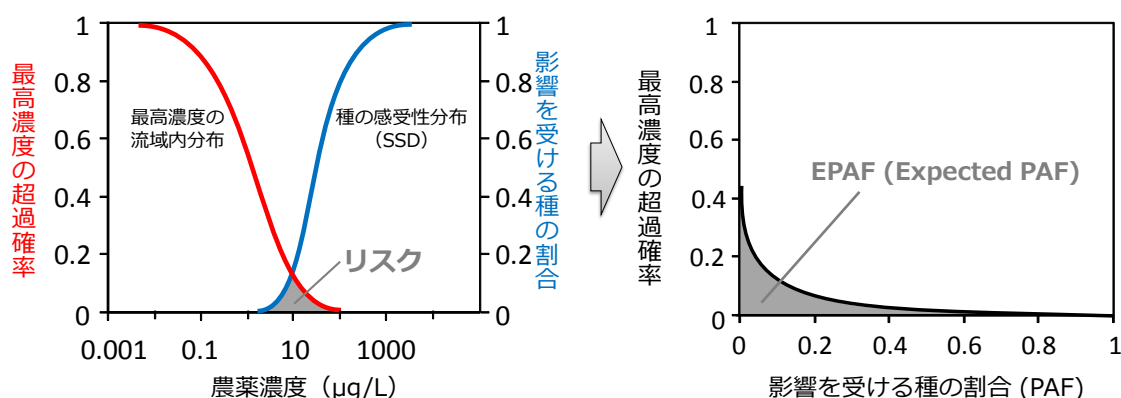
前述の背景に鑑み、農薬の節減や各種の農薬流出防止技術の導入によるリスクの低減効果を定量的に評価することを目的とし、特定の地域における農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価

する手法を開発した。サブテーマ（１）で開発したGIS結合型PADDY-Largeモデルを用いて河川水中濃度を計算し、最高濃度の流域内分布（超過確率曲線）を求め、サブテーマ（３）で解析した種の感受性分布（SSD）を重ね合わせることにより、「影響を受ける種の割合」を指標としたリスク評価法を開発した。また、開発した定量的リスク評価法を活用し、特定の地域において水稻一作期間で使用される複数農薬の累積リスクを評価する手法の開発を行った。本手法により、慣行の防除体系から農薬成分数を半分以下にした特別栽培における防除体系への変更や、様々な農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果を相互に比較した。

３．研究開発方法

（１）定量的生態リスク評価法の開発

図(4)-2に農薬の確率論的生態リスク評価の概念図を示す。まず、サブテーマ（１）で開発したGIS結合型PADDY-Largeモデルを用いて対象流域における河川水中濃度を計算し、最高濃度の流域内分布（超過確率曲線）を求めることにより、ある濃度を超過する地点が流域全体でどの程度の割合を占めるのかを把握した。得られた最高濃度の超過確率曲線と、サブテーマ（３）で解析した種の感受性分布（SSD）とを重ね合わせることにより、二つの曲線の重なる部分の大きさがリスクの程度として表現される。次に、二つの曲線の重なる部分に対応した最高濃度の超過確率と影響を受ける種の割合（PAF: Potentially Affected Fraction）との関係を示す曲線を求めた。これは、ある割合の生物種に影響を及ぼすとされる農薬濃度の超過確率を示している。さらに、曲線下の面積を算出することにより、影響を受ける種の割合の期待値（Expected PAF、以下EPAF）として指標化した。EPAFは、評価の対象地域において農薬の影響を受けている生物種の平均的な割合を示しており、ある農薬を特定の条件で使用した場合の、生物多様性への影響評価指標とみなすことができ、様々な条件下で使用される多種多様な農薬について、リスクの大きさを相互に比較することが可能である。



図(4)-2 農薬の確率論的生態リスク評価の概念図（左図は河川水中最高濃度の流域内分布と種の感受性分布を重ね合わせたグラフ、右図は「最高濃度の超過確率」と「影響を受ける種の割合（PAF）」との関係を示し、曲線下の面積は「影響を受ける種の割合の期待値（EPAF）」を表す）

（２）地域性を考慮した農薬の適切な管理対策を選定する手法の開発

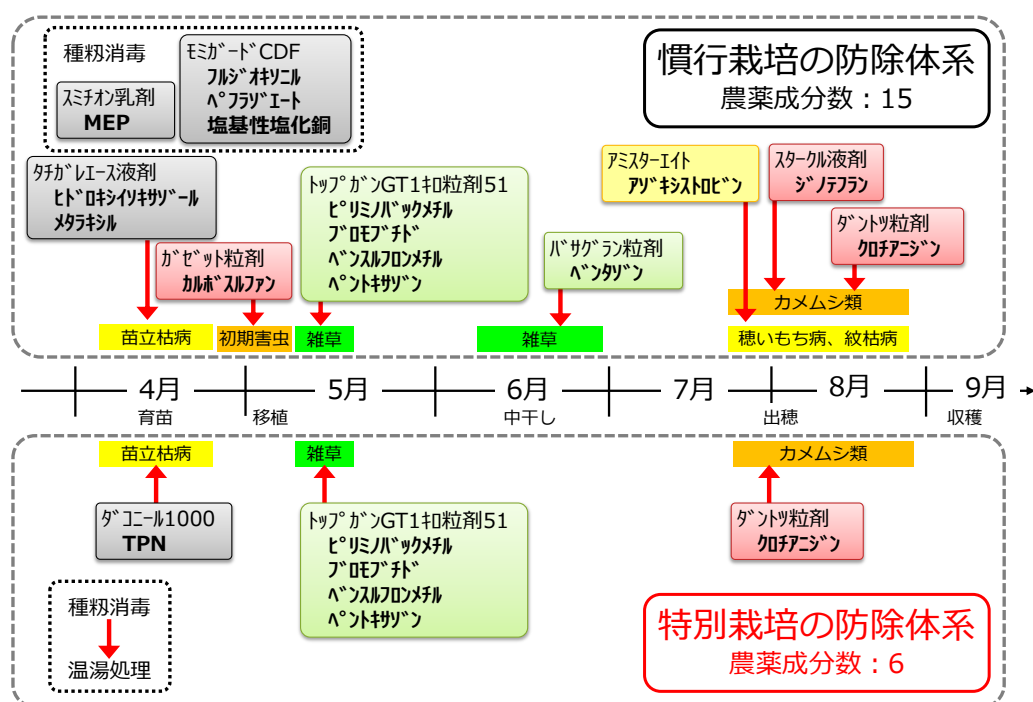
前述の「定量的生態リスク評価法」を活用し、特定の地域において水稻一作期間で使用される複数農薬の累積リスクを評価する手法の開発を行った。評価の対象とした流域は、サブテーマ（１）において農薬モニタリングを実施した茨城県桜川の支流である逆川流域とした（図(4)-3）。流域面積は1195.2 ha、水田面積は161.6 haであり、流域の17%が水田で占められている。



図(4)-3 評価対象流域の航空写真（茨城県桜川支流の逆川）

対象流域において、水稻栽培における慣行の防除体系は、茨城県農作物病虫害雑草防除指針、JA茨城が発行する営農ニュース等により把握した。また、化学合成農薬と化学肥料の双方を慣行レベルに比べて5割以上減らして栽培された特別栽培での防除体系は、対象流域周辺で販売されている特別栽培米の農林水産省新ガイドラインによる表示等により把握した。なお、慣行レベルは地方公共団体が個別に策定または確認し、節減割合の算定基準に用いられており、茨城県の水稲栽培における化学合成農薬の2013年度の慣行レベル（農薬成分使用回数）は17であった。

図(4)-4に評価対象流域における慣行および特別栽培の防除体系の一例を示す。対象流域における慣行栽培では、種粒消毒で4成分、育苗期で2成分、初期害虫防除で1成分、雑草防除で5成分、出穂期前から収穫期までに3成分の計15成分であった。一方、特別栽培では半分以下の6成分の農薬が使用されていた。特別栽培で使用する農薬の内訳をみると、慣行栽培の種粒消毒で使用する殺虫、殺菌剤（スミチオン乳剤、モニガードCDF）は使用せず、温湯処理にすることで農薬を節減していた。また、慣行栽培で使用する初期害虫防除のための殺虫剤（ガゼット粒剤）、中干し期における雑草防除のための除草剤（バサグラン粒剤）、出穂期前の穂いもち病防除のための殺菌剤（アミスターエイト）などは、特別栽培では使用されていない。これら節減が可能な農薬の種類は、対象地域の水田圃場における病虫害や雑草の発消長により大きく異なり、ある地域での特別栽培の防除体系が、他の地域でも適用できるとは限らないことに留意する必要がある。



図(4)-4 茨城県逆川流域における慣行栽培および特別栽培の防除体系の一例

評価対象流域の水田において、図(4)-4に示す慣行および特別栽培がそれぞれ50%ずつ行われている状況を想定し、各防除体系での農薬使用に伴う河川水中濃度を推定した。なお、慣行および特別栽培において、種消毒および育苗期で使用する農薬については使用量が少なく、水田に直接散布せず、河川への流出がほとんどないため、評価の対象から除外した。サブテーマ（1）で開発したPADDY-Largeモデルを用い、流域内の河川（流路長5500 m）を250 mごとに分割し（22セグメント）、各河川セグメントにおける農薬濃度を計算した。モデル計算において、水田における水収支、土壌の理化学性（容積重、全炭素含量）および河川流量は、平均的な値を設定した。

また、慣行栽培において農薬流出防止対策の導入によるリスクの低減効果を評価するため、水田における水管理や畦塗りを徹底した場合の河川水中濃度を同様に計算した。水管理の徹底では、止水期間の設定がない農薬（グラントオンコル粒剤、アミスターエイト、スタークル液剤10）の止水期間を7日に設定するとともに、すべての農薬について止水期間終了後の水尻排水量を50%低減した場合の河川水中濃度を計算した。畦塗りの徹底では、水田からの畦畔浸透による漏水量を50%低減した場合の河川水中濃度を計算した。

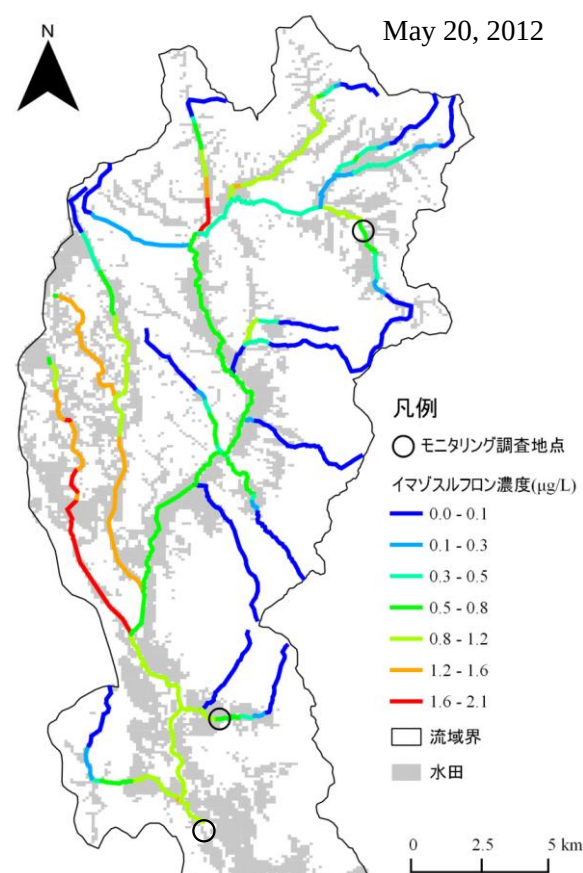
各防除体系で使用される複数農薬による累積リスクは、前述の各河川セグメントにおける農薬濃度の計算結果から、サブテーマ（3）で開発したCA-RA混合モデルを用いた手法（魚類、節足動物および藻類について、「複数農薬により影響を受ける種の割合（msPAF）」をそれぞれ計算し、その平均値である「水圏生態系全体における影響を受ける種の割合（Overall PAF）」を求める。図(3)-10参照）により、セグメントごとのOverall PAFを計算した。また、流域内での平均的なリスクを算定するため、各セグメントのOverall PAFの平均値を指標とする期待影響割合（Expected Overall PAF, EPAF）を推定した。

4. 結果及び考察

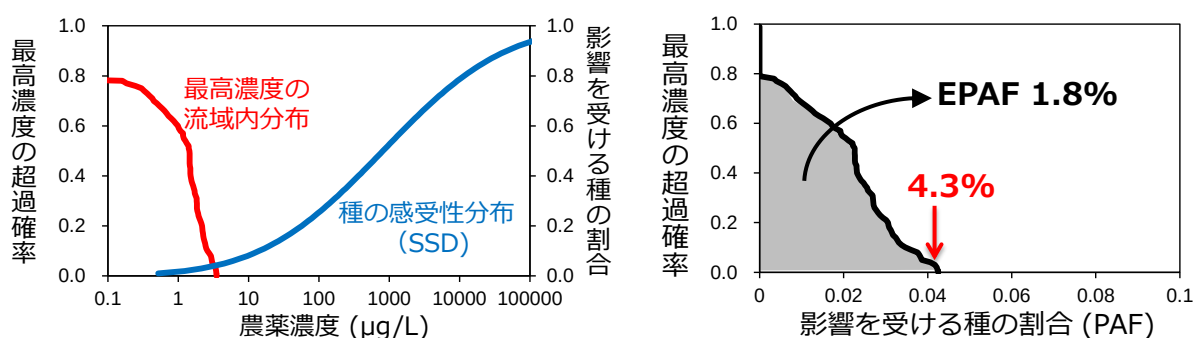
(1) 定量的生態リスク評価法の開発

定量的生態リスク評価の事例として、桜川流域で広く使用されている除草剤イマズスルフロン
の解析結果を示す。サブテーマ(1)で開発したGIS結合型PADDY-Largeモデルを用いて、イマズ
スルフロンの桜川流域における河川水中農薬濃度を計算した。河川流路を250 mごとのセグメント
に分割し、St.3(君島橋)において濃度が最大になると計算された時点での濃度分布を図(4)-5に示
す。サブテーマ(1)で示した250 mごとの河川セグメントに関連づけた積算水田面積(図(1)-12
左図)と比較すると、農薬の流出に寄与する積算水田面積が大きい地点ほどイマズスルフロンの
濃度が高くなる傾向を示した。

各セグメントにおける最高濃度は0~3.51 $\mu\text{g/L}$ の範囲にあり、中央値は1.45 $\mu\text{g/L}$ であった(図
(4)-6左図赤線)。また、イマズスルフロンは文献により8種類の一次生産者の毒性データが得られ、
そのEC50値の対数平均値が6.70 $\mu\text{g/L}$ 、対数標準偏差が3.16であった。これらの毒性データを用い
たSSDの解析結果、HC5が4.48、HC50が813、HC95が148000 $\mu\text{g/L}$ であった(図(4)-6左図青線)。
得られた最高濃度の流域内分布とSSDの組み合わせにより、影響を受ける種の割合の期待値(EPAF)
を算出したところ、流域内で平均的に1.8%、最大で4.3%の種が影響を受けると評価された(図(4)-6
右図)。この指標を用いることで、地域レベルでの定量的なリスク評価が可能となった。



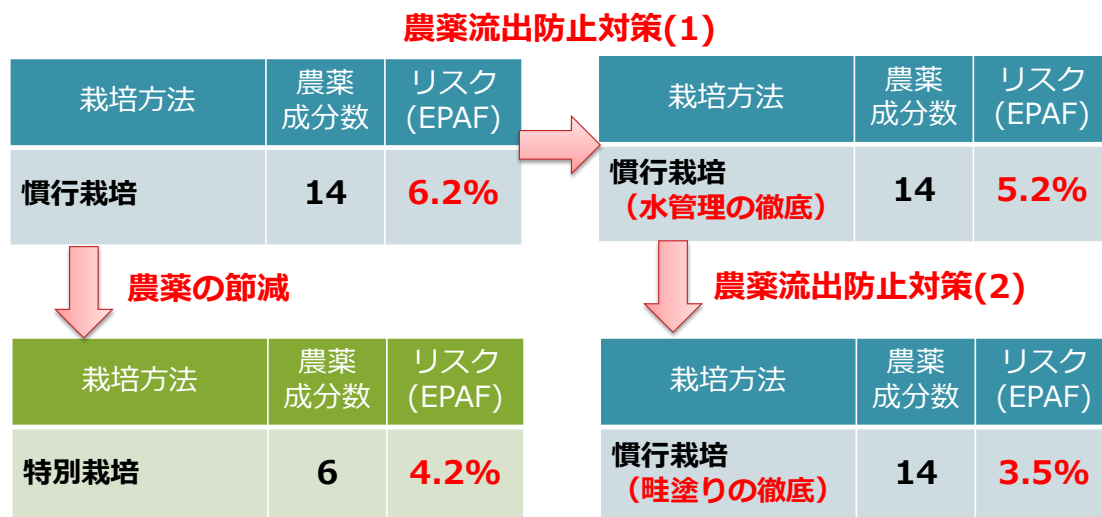
図(4)-5 PADDY-Largeモデルで予測した桜川流域におけるイマズスルフロンの濃度分布(2012年)



図(4)-6 除草剤イマズスルフロンの河川水中における最高濃度の流域内分布（左図赤線）、種の感受性分布（左図青線）および最高濃度の超過確率と影響を受ける種の割合との関係（右図）

（２）地域性を考慮した農薬の適切な管理対策を選定する手法の開発

茨城県南部の桜川の支流である逆川流域とし、慣行および特別栽培における農薬使用に伴う生態リスクを評価した（図(4)-7）。慣行栽培でのリスク（EPAF）は 6.2%であったのに対し、農薬成分数を半分以下に低減した特別栽培では、リスクは 4.2%まで減少した。一方、慣行栽培において、水管理の徹底（農薬流出防止対策(1)）することによるリスクは 5.2%に減少し、さらに、畦塗りの徹底（農薬流出防止対策(2)）により、河川への農薬流出量が大幅に減少するため、特別栽培と同程度の 3.5%までリスクを低減できることが示された。以上のように、農業現場での様々な農薬使用に伴うリスクを定量的に評価することが可能となり、農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果を相互に比較することで、地域性を考慮した適切な農薬使用方法の提示が可能となった。



図(4)-7 農薬使用に伴う生態リスク評価結果（慣行および特別栽培との比較）

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

サブテーマ（１）の成果である曝露評価法とサブテーマ（３）の成果である影響評価法を活用し、特定の地域における農薬使用に伴う生態リスクを定量的に評価する手法を開発した。これまでは評価不能であった農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果について、開発した評価手法を活用することで、リスクの大きさを相互に比較することが可能となり、地域性を考慮した農薬の適切な管理対策の提示が可能となった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

農業の現場において農薬の適切なリスク管理を行うためには、各種の管理対策（農薬の使用回数を減らす、農地からの農薬流出防止の措置をとるなど）によるリスク低減効果を把握することにより、各地域の条件に適した効果的な管理対策を選択する必要がある。

本研究で開発した農薬使用に伴う生態リスクの定量的評価手法により、農薬の節減、使用農薬の変更、農薬流出防止技術の導入などによるリスク低減効果を相互に比較することで、地域性を考慮した適切な農薬の管理対策を選定することが可能となる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 稲生圭哉、永井孝志、岩崎亘典：環境科学会誌（2014）（印刷中）
「農薬の定量的生態リスク評価における動態予測モデルの活用」

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない。今後、日本農薬学会など関連する学会での口頭発表を通じ、成果の広報・普及に努める

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 農林水産省：「今後の環境保全型農業に関する検討会」報告書
http://www.maff.go.jp/j/study/kankyo_hozen/pdf/h2004_report.pdf
- 2) 農林水産省：特別栽培農産物に係る表示ガイドライン
http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/pdf/tokusai_03.pdf
- 3) 農林水産省：特別栽培農産物に係る表示ガイドラインに基づき地方公共団体が定めた慣行レベル（平成25年10月現在）
http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/pdf/kanko_level_h2510.pdf
- 4) 日本植物防疫協会：シンポジウム「環境保全型農業と病虫害防除を考える」講演要旨
<http://www.jppa.or.jp/symposium/data/S250115.pdf>
- 5) 環境省：農薬流出防止技術
<http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/sppt.html>

Development of Quantitative Risk Assessment Method of Pesticide to Enable Selection of Appropriate Risk-management Practice of Usage

Principal Investigator: Keiya INAO

Institution: National Institute for Agro-Environmental Sciences (NIAES)
3-1-3 Kannondai, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8604, JAPAN
Tel: +81-29-838-8235 / Fax: +81-29-838-8199
E-mail: keinao@affrc.go.jp

[Abstract]

Key Words: Pesticide, Ecological risk, Mathematical model, GIS, Species sensitivity distribution, Aquatic insect, Periphyton, Population recovery, Combined effect, Risk management

Public concerns regarding the adverse effects of pesticides in runoff from arable lands on aquatic ecosystems are increasing in Japan. For environmental conservation, various countermeasures such as reduction of pesticide use and prevention of pesticide runoff from paddy fields are taken by farmers. However, the efficiency of the risk management practices has not been evaluated. In this study, a quantitative ecological risk assessment method of pesticides was developed for the selection of effective risk management practices.

The previously developed PADDY-Large model to predict pesticide concentrations in river basins was improved by the coupling of geospatial information about watershed properties (land use, river and soil properties). We also developed a method for clarifying land use in sub-basins and for allocation of paddy fields to the nearest 50-m-long river segment for the model calculation. We validated the model by monitoring paddy pesticide concentrations in river water in three basins under rice cultivation. The improved PADDY-Large model accurately simulated changes in measured concentrations of paddy pesticides at the sampling points.

To provide appropriate toxicity data required for a species sensitivity distribution (SSD) method, new bioassay methods using native riverine species were developed. We established a method of the early-life stage toxicity test with the caddisfly *Cheumatopsyche brevilineata* and also assessed effects of insecticides on the population dynamics of the caddisfly using an indoor population dynamics model. Then, we developed a fluorometric microplate bioassay technique applicable to five periphytic algal species to obtain toxicity data of various herbicides efficiently. We examined population recoveries of a diatom after temporal exposure to 3,5-dichlorophenol. Combined effects of herbicides on algal diversity were able to be predicted by using both conventional models

(Concentration-Additive and Response-Additive models) and the SSD.

A method for assessing an effect of pesticides on biodiversity was developed using the SSD, which is probabilistic analysis of the difference in species sensitivity. We analyzed the SSDs of several pesticides using the toxicity data described above. Then, we developed a novel estimation method of the SSD when obtained number of toxicity data is not enough. Uncertainty of the SSD estimation was described by confidence interval, which is analyzed using parametric bootstrap method. Furthermore, we improved the SSD method to assess the effect of multi-substances on biodiversity.

Finally, to calculate cumulative risks among various pesticide uses, a quantitative ecological risk assessment method of pesticides was developed using the PADDY-Large model and the SSD.