

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-29-'99

# 化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究

Studies on biomonitoring methods for ecological risk assessment  
of chemical substances

平成7～9年度

FY 1995～1997

**NIES**



NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

SR-29-'99

# 化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリ ング手法の開発に関する研究

Studies on biomonitoring methods for ecological risk assessment  
of chemical substances

平成7～9年度

FY 1995～1997

環境庁 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究」

(期間 平成7～9年度)

特別研究責任者：森田昌敏

特別研究幹事：畠山成久

報告書編集担当：畠山成久・菅谷芳雄



バイオモニタリング施設（左岸）を設置した桜川の下流部  
（茨城県霞ヶ浦河口から、約5km上流）



「河川水導入・流水式水槽（仕切は水面）～ウキクサ」を用いたバイオモニタリング（連続照明，水温調整）



桜川の河川水を導入した流水式水槽（照明・水温調整）  
—ヌカエビ，魚，シジミ，水草等を連続暴露—



河川水（除草剤汚染）連続暴露によるウキクサ（2種）への影響，大半は枯死（1996年5月）



河川導入・流水式水槽内で死亡（7月末日）したヌカエビ  
—殺虫剤の急激な濃度上昇による—



河川水導入・水槽内でのウキクサ増殖  
—除草剤非汚染時期（1996年8月）—

口絵写真（1） バイオモニタリング（桜川）施設，及び試験生物から  
—桜川河川水に連続暴露—

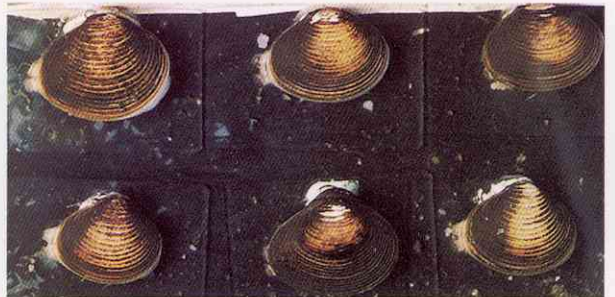




バイオモニタリング施設内に設置した河川水導入水路  
後方、暗幕内はヌカエビ画像解析装置



河川水導入水路内でのバイオモニタリング（生長・薬物代謝）  
に用いたドブガイー水路内のカゴに個別に導入ー



河川水連続暴露のシジミ水管の伸縮による  
バイオモニタリング（水管伸縮を自動撮影）



除草剤総合毒性のバイオモニタリングに使用した  
イチョウウキゴケ（ウキクサと同様に使用）



実験水田を用いた除草剤の藻類群集に及ぼす影響解析  
ー耐性種、耐性系統の出現ー

口絵写真（２） バイオモニタリング（桜川）施設，試験生物，  
及び除草剤散布実験水田

## 序

本報告書は、平成7年度から平成9年度にかけて実施した特別研究「化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究」をとりまとめたものである。

河川は四季折々の風情で、何事もなかったように流れている。しかし、河川や湖沼は現在様々な化学物質で汚染され、特に最近では内分泌攪乱物質の汚染調査が全国的な規模で実施されている。本研究の主要テーマは、「試験生物を河川水に連続的に暴露し、その生物反応から環境水の安全性を評価すること」であった。そのためのモデルとして、桜川（霞ヶ浦流入、最大河川）の河畔に実験室を設け、河川水を連続的に室内の水路や水槽に流し、試験生物の様々な反応を調べた。このような手法の有効性には二つの面がある。

1) 急性的に高まる毒性物質の検出とその影響評価である。現在我々は、河川水の毒性が試験生物に致死的なほど高まっても、河川には何の変化も見ることができないであろう。何故なら、今更致死的な影響を被るような生物は既に消失しているであろうし、もし水中である生物が死亡しても人の目に止まることはないであろう。ところが、バイオモニタリング施設内では、試験生物が河川水中の化学物質により急性的に死亡したり、その生長が極端に阻害される現象が詳細に観察され、その原因物質もほぼ特定することができた。このような環境では、生態系の持続的な回復は当分期待できそうもない。

2) 低濃度、複合汚染による慢性的な生態影響の評価である。実環境における化学物質の複合的な汚染を再現することは、ほとんど不可能である。しかし、バイオモニタリング施設内では、生物の繁殖に影響する水温や光周期を制御した条件下で、試験生物を環境水に長期間暴露することができる。これらの手法は、内分泌攪乱物質の各種生物の繁殖に及ぼす影響評価にもきわめて有効な手法である。

バイオモニタリング手法は画像解析、自動制御など技術的な側面に負うところが大きく、その開発や実用には生物学と工学の密接な協力関係が必要である。その応用例として、リアルタイムで生物の反応を記録し、例えば生物の反応がある閾値を超えた場合、自動採水（原因物質解明）や警報を発することができる。環境安全性の継続的な診断と、それに基づいた環境保全対策のため、本研究の成果がその一助となれば幸いである。また、未来の環境保全を担うのは、少年・少女たちの役割であるが、そのためにはこのような施設を通じた、実体験による環境教育も重要と考えられる。

言うまでもなく、化学物質の生態系への影響評価はきわめて多面的なものであり、本研究の成果はその一端にすぎない。本研究の成果については、様々な評価とご批判をいただき、今後も化学物質の生態影響評価の確立に向けての調査・研究に役立たせて頂く所存である。

おわりに、研究を推進する上で研究所外の多くの方々にご協力と助言を頂いた。ここに深く感謝の意を表します。

平成11年3月

国立環境研究所  
所長 大井 玄

## 目 次

1 研究の目的と経緯	
1.1 研究の目的	1
1.2 研究の構成	2
2 研究成果	3
2.1 化学物質のバイオモニタリング手法の開発	3
2.1.1 桜川バイオモニタリング施設の概要	3
2.1.2 一次生産者によるバイオモニタリング	3
2.1.3 ヌカエビ ( <i>Paratya compressa improvisa</i> ) 死亡によるバイオモニタリング	8
2.1.4 ヌカエビの行動を利用した有害化学物質のモニタリング	10
2.1.5 淡水産二枚貝によるモニタリング	15
2.1.6 魚類によるモニタリング	21
2.2 生態影響評価に関する研究	24
2.2.1 藻類/群集レベルの除草剤耐性変化	25
2.2.2 ミジンコ	29
2.2.3 ヌカエビ・ヨコエビ	30
2.2.4 河川底生生物相とヌカエビ死亡率変化の相関	32
2.2.5 底質試験法の検討とユスリカを用いた生態影響評価	35
2.2.6 イボニシを用いた有機スズの沿岸生態系への影響評価	39
2.3 まとめと提言	
2.3.1 バイオモニタリング手法に関するまとめと提言	41
2.3.2 バイオモニタリング結果とこれに基づく生態影響評価に関するまとめ	42
[資 料]	
I 研究の組織と研究課題の構成	
1 研究の組織	47
2 研究課題と担当者	47
II 研究成果発表一覧	
1 誌上発表	48
2 口頭発表	50

# 1 研究の目的と経緯

## 1.1 研究の目的

化学物質による環境汚染の実態が明らかにされつつある中で、生態系への影響評価が一層重視されるようになってきた。そのため、化学物質ごとに様々な生物を用いた生物試験がなされている。しかし、環境は多様な化学物質で汚染され、それらの濃度も変動していることが多い。本研究は生物の反応により、このような複合的、動的な環境汚染が水界生態系に及ぼす影響を常時監視し、それを評価するためのバイオモニタリング手法を検討・開発することを目的とした。環境汚染に対する生物の反応は、化学物質に対する感受性、暴露形態、生長段階などで様々に異なり、バイオモニタリングに用いる生物も生態系の構造を反映したものであることを考慮して選択することとした。

本研究の発端は主として、国立環境研究所特別研究報告「水環境における化学物質の長期暴露による相乗的生態系影響に関する研究（1989～1993年）」（特別研究報告，SR-19-95）に基づいている。この報告書の前半では、農薬汚染の生態影響評価のため、河川水サンプル中でのセレナストルム（単細胞緑藻）増殖試験、ヌカエビ試験、河川水導入水路による実験、農薬汚染河川における生態影響調査などに関する研究成果をもとに、農薬類の潜在的な生態毒性とその原因物質を検討した。また、報告書の後半では実験生態系を用いた研究から、生物間相互関係を介した化学物質の生態影響の重要性を明らかにしてきた。

これまでの研究は主として、採取した河川水に試験

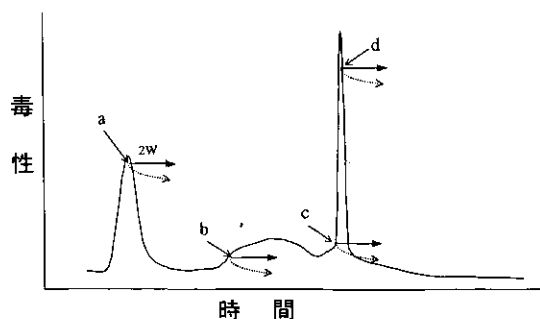


図1 化学物質濃度変化と採水タイミングに基づく、化学物質の生態影響評価における過大評価及び過小評価の可能性。破線は試験容器中の毒性物質濃度

生物を暴露して、河川水中の生態毒性を評価した。当時の調査河川では、農薬類の潜在的な生態影響は大きく、感受性種の持続的な生存や生態系の回復はきわめて困難な環境であることを示してきた。その反映として、農薬汚染河川では、殺虫剤に対する薬剤耐性種や抵抗性系統の存在も明らかにされた。しかし、採水サンプルを用いた生物試験の場合、化学物質の濃度変化が著しい環境において、水中の毒性物質の影響を過小評価したり、過大評価しがちとなる。例えば、河川水中の毒性物質の濃度が、図1のように変動し、採水日がそれぞれ a)～d) であった場合、これらのサンプルを用いて生物試験を実施したとすると、このとき、試験水の毒性物質の濃度が波線のように減少したとすると、a) と d) の場合は毒性物質の生態影響を過大評価し、b) と c) の場合は毒性物質の影響を過小評価することになる。

以上の調査・研究の成果と問題点の整理から、さらに検討すべき課題として、以下のような理由から試験生物を環境水に連続して暴露し、その生物反応を室内で連続的に観測する手法の開発が必要と考えられた。

1) 以前に調査・研究を実施した河川は比較的農薬汚染レベルが高い河川であったため、採水サンプルを用いた試験でも十分生物反応（生長阻害・死亡など）が現れた。しかし、汚染のレベルが一段低い河川では、試験生物を河川水に連続的に暴露して、慢性影響まで含めて生物反応の検出感度を高める必要がある。

2) 内分泌攪乱物質の繁殖影響などは1～2世代にわたる長期暴露試験が必要と考えられるが、実験室内で実環境の汚染状態を長期間再現することはほとんど不可能である。

3) 河川水のサンプルに暴露する場合、例えば週3回の頻度で採水して、生物試験や分析を実施しても、農薬類の濃度は時間や日単位で変動することがあるため、大きな毒性影響を見逃す可能性がある。

もし、各種の試験生物を実際の河川水に連続的に暴露し、その影響を適当な手法でモニターすることができれば、環境水の毒性が水生生物に及ぼす影響をかなり正確に評価できるものと考えられる。また、生物の反応を連続的に監視するシステムを構築することがで



できれば、毒性物質の存在や流入を速やかに検出し、それへの対応・対策（化学分析サンプルの採取、原因物質の同定、汚染抑止対策など）に有効な情報を提供することが可能となる。

## 1.2 研究の構成

これらの経緯と目的から、本研究課題「化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究（1995～1997年）」では、以下のような調査・研究の課題を設けた。その前提として、桜川（霞ヶ浦に流入する最大河川）に隣接して、霞ヶ浦河口から約5 km上流にバイオモニタリング施設を設置することにした。研究期間（1995～1997年）の初年度、7月に同施設の稼働を開始したが、沈殿槽、調温水槽、給水配管など随時改善することとなった（施設概要は、別記）。

施設を現在の場所に設置したのは、1）前回の研究（1989年）で、その約1 km上流を調査地点の一つとして選び、農薬類の汚染状況などある程度実績があったこと、2）霞ヶ浦の河口に近いので水位が安定し、年間をとおして河川水を確保できること、3）河川に隣接した国有地があり借用できたこと、4）研究所から比較的近かったこと（約12 km）、などによる。なお、試験生物は、主として従来から国立環境研究所・水生生物実験棟（以下、アクアトロン）で継代飼育しているものから選択した。

### （1）水生生物によるバイオモニタリング手法の開発

- 1）1次生産に対する化学物質の影響評価のため、水草から数種を選択して、河川水に連続暴露してその生長に及ぼす影響を評価した。それに併行して、従来の採水サンプルを用いてのセリナストルム増殖試験を実施し、水草類の感受性と比較した。
- 2）水生動物は、主としてアクアトロンで飼育して

いる水生生物から、6種（ミジンコ2種、ヌカエビ、ヨコエビ、ヒメダカ、ゼブラフィッシュなど）を選択して用いた。これらの生物を河川水に連続暴露、または採水サンプルに暴露し、行動、死亡、生長、産卵、酵素活性の変化などに基づいたバイオモニタリング手法の開発とその有効性を検討した。

- 3）現在、試験生物化はなされていないが、二枚貝としてドブガイ、マシジミ（これらは施設の実験水路に生息した）を用い、生長速度の変化などによるバイオモニタリング手法を検討した。

### （2）生物試験に基づいた生態影響評価

- 1）化学物質に対し様々な生物試験が実施されるが、実環境は様々な化学物質で汚染され、薬剤抵抗性系統への置換など、水に添加した化学物質の試験結果のみからでは、生態影響の評価が困難な場合が多い。本課題では、藻類の除草剤感受性試験、除草剤暴露による耐性系統への置換などの調査結果から、除草剤の河川藻類群集に対する影響評価を行った。
- 2）筑波山麓を流下する河川では、ヌカエビに高い毒性が4月から9月まで継続して観察された。このような河川で、これらの毒性と水生昆虫の出現種類数やその生息密度との関係を明らかにした。そのため、生物サンプルの採取方法も調査河川に適合した手法を用いて生物調査を行った。
- 3）多くの化学物質は底質に沈降吸着する。そのためこれら化学物質の底生生物に対する影響評価が必要であるが、国内ではほとんど実績がない。試験生物としてユスリカとヌカエビ、化学物質としてエトフェンプロックス、フェンチオン（殺虫剤）を用い、試験法の検討とその影響評価を試みた。

## 2 研究の成果

本報告書の前半では、桜川バイオモニタリング施設内で試験生物を連続的に河川水に暴露したバイオモニタリング手法の開発とその有効性に関して記述した。後半では、生物試験や生物調査の結果に基づき、化学物質の生態影響評価を検討した成果に関して取りまとめた。一部の研究成果に関しては、紙面や時間的な制約から本報告書で取り上げることはできなかった。本報告書の最後に、本研究で開発したバイオモニタリング手法とその実用性（有効性）、生物試験による生態影響評価に関して総括を行い、本研究の「まとめと提言」とした。

### 2.1 化学物質のバイオモニタリング手法の開発

#### 2.1.1 桜川バイオモニタリング施設の概要

桜川バイオモニタリング施設（床面積50m<sup>2</sup>）は建屋と、桜川から河川水を汲み上げる揚水ポンプ、貯水槽、排水槽・排水ポンプ、給排水の配管などからなっている（図2a）。揚水ポンプにより、河川水を連続して貯水槽に汲み上げ、そこから落差で建屋内部に配水されるが、余分な水は排水槽にオーバーフローさせた。ただし、揚水ポンプのストレーナーに付着するゴミを定期的に除去するため、ポンプの電源を1日3回一時的に自動停止させ、貯水槽の水を逆流（逆洗）させた。揚水された水は貯水槽（一部は沈殿水槽）を経て、2分程度で実験水槽や水路に給水されるため、バイオモニタリングはほぼリアルタイムで河川水の水質で行われたと考えられる。

#### 室内設備

室内に調温水槽を置き、河川水の一部を年間を通じて23～25℃に制御して用いた。このほか、幅40cm×長さ4mの水路・2基、大小の流水式ガラス水槽、行動記録計および環境要因のモニタリングシステムを設置した（図2b）。また、建屋室内は24時間空調を行い（23～25℃）、室内は14時間明/10時間暗で照明した。

#### 環境要因のモニタリング

施設内に導入した河川水（水路）の水質を水路において常時モニタリングして記録した。測定項目はpH、

溶存酸素濃度・水温・電気伝導度である。4月から8月末までは、週3回（月・水・金）の頻度で、河川水中の各種農薬濃度、クロロフィルa濃度、栄養塩類（1997年）、水中懸濁粒子（1997年）などに関して分析を行った。例年7月末に行われる桜川流域での農薬の空中散布時期には、ヌカエビの生物反応のデータ収集、分析のための採水など実施頻度を高めた。

#### 2.1.2 一次生産者によるバイオモニタリング

一次生産に及ぼす化学物質の影響を評価するため、河川水サンプル中でセレナストルム（単細胞緑藻）の増殖試験を実施し、セレナストルムの増殖阻害とその原因物質に関して報告してきた（特別研究報告SR-19-95）。しかし、セレナストルムは単細胞緑藻のため、河川水に連続暴露することができない。本研究では、水草類を河川水に連続的に暴露するバイオモニタリング手法の開発とその有効性を検討した。水草類は魚など様々な水生生物の栄養源となる上、これら生物の繁殖や生息の場所としての役割を果たす。除草剤などによる水草の生育阻害あるいはその消滅は、魚類などの水生生物に直接的な影響を及ぼさなくとも、その間接的な影響は大きい。

本研究では試験生物として、ウキクサ（2種類）、イチョウウキゴケ、オオカナダモなどを選択した。ウキクサはOECD生態影響試験の新たな試験生物としてガイドライン（案）が作成され、現在（1998年）国際間リングテストが実施されており、本試験法の最終的な検討がなされている。

#### （1）材料と方法

2種のウキクサ（アオウキクサ *Lemna aoukikusa*、ウキクサ *Spirodela polyrrhiza*）はアクアトロン温室内水槽で維持していたものを恒温室内（22±1℃、蛍光灯・連続照明）で培養し試験に用いた。ウキクサの培養液としてはすでに確立したものがあるが（ASTM-11.05, 1996, など）、ここでは藻類の培養液（C-培地）60%を人工軟水40%で希釈したものを用いた。イチョウウキゴケ（Bryophyta, *Ricciocarpus natans* (L.)) とオオカナダモ（*Elodea densa* Planch）は、温室内の水槽に地下水

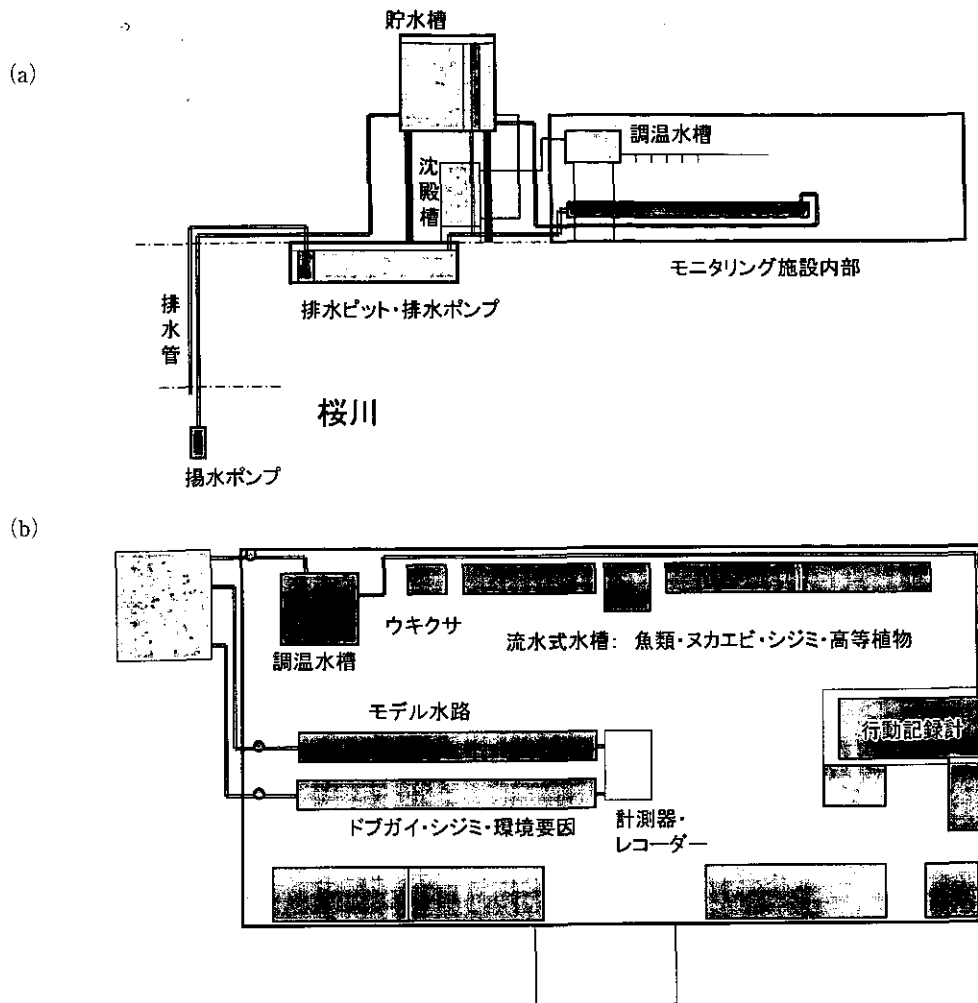


図2 桜川バイオモニタリング施設の給排水設備 (a) と建屋内部の配置 (b)

をかけ流し、その中で生育させておいた個体を随時実験に使用した。イチョウウキゴケは農薬汚染の影響により、生息域が激減したとされる生物種の一つである。

バイオモニタリング施設内の一面を暗幕で囲い、連続照明（蛍光灯、約 3000 lx）下で、ウキクサ、イチョウウキゴケを河川水に連続暴露した。そのため、小型水槽（12.5 × 18.5 × 5.5 cm）の水面を仕切り、仕切内にウキクサ（n=10）とイチョウウキゴケ（n=10）を個別に浮かべ、試験開始の 4、7、14 日後に葉面積を測定した（口絵参照）。ウキクサの場合は 2 葉、イチョウウキゴケの場合は 1 葉の状態から試験を開始した。試験は 4 月から 7 月までは 1 週、その後は 2 週ごとに実施した。

河川水は調温し（22±2℃）、約 170 ml/min の流量で小型水槽（610 ml）に流し、水交換率は約 400 回/日となったため、水中の化学物質濃度は河川水と同様で

あったと思われる。

生長の指標として、葉面積を算出するため、全個体を写真に撮るか、ビデオに録画し画像解析により求めた。オオカナダモは、先端から 10 cm に切断し、流水式水槽に沈めてその生長を 7 日後と 14 日後に測定した（照明；蛍光灯，16L-8D）。

水草によるバイオモニタリングと併行して、施設内で河川水を週 3 回の頻度で採水し、河川水中でのセレナストルムの増殖試験を実施した。セレナストルムの増殖試験法のため、河川水をろ過除菌（0.25 μm フィルター）し、対照培地（C-培地）と同等の N と P を添加した試験水に、セレナストルムを初期密度  $1 \times 10^4$  cells/ml で植継ぎ、連続照明（約 3500 lx）下で 3 日間培養した。3 日後に細胞密度を測定し、その増殖量を対照（80 倍前後に増殖）と比較した。増殖阻害率の変動を  $SGR = (W - C) / C \times 100\%$  の値として示した（W；河川水，C；C 培地中での細胞密度）。

(2) 結果と考察

図3に、河川水に連続暴露したウキクサ2種、イチョウウキゴケ、オオカナダモの生長速度、河川水中サンプル中でのセレナストルムの増殖阻害（週3回試験）、河川水中のクロロフィルaの濃度、ウキクサ葉面の光合成活性の変化を示した。いずれの植物も5月中旬をピークとして生長阻害を受けたが、アオウキクサが最も強い影響を受け、5月から6月20日頃までその

生長は著しく阻害され、極端な場合は葉の一部が枯死する個体もあった。しかし、この種も水中の各種除草剤濃度が低下する（図4、1996年の場合）6月下旬から、その生長は完全に回復した。ウキクサも5月上旬から下旬まで、その生長が著しく阻害された。しかし、本種は6月上旬から生長の回復が始まり、アオウキクサの生長が抑制され続けている6月中旬に、その生長はほぼ完全に回復した。4月、5月及び7月に実施し

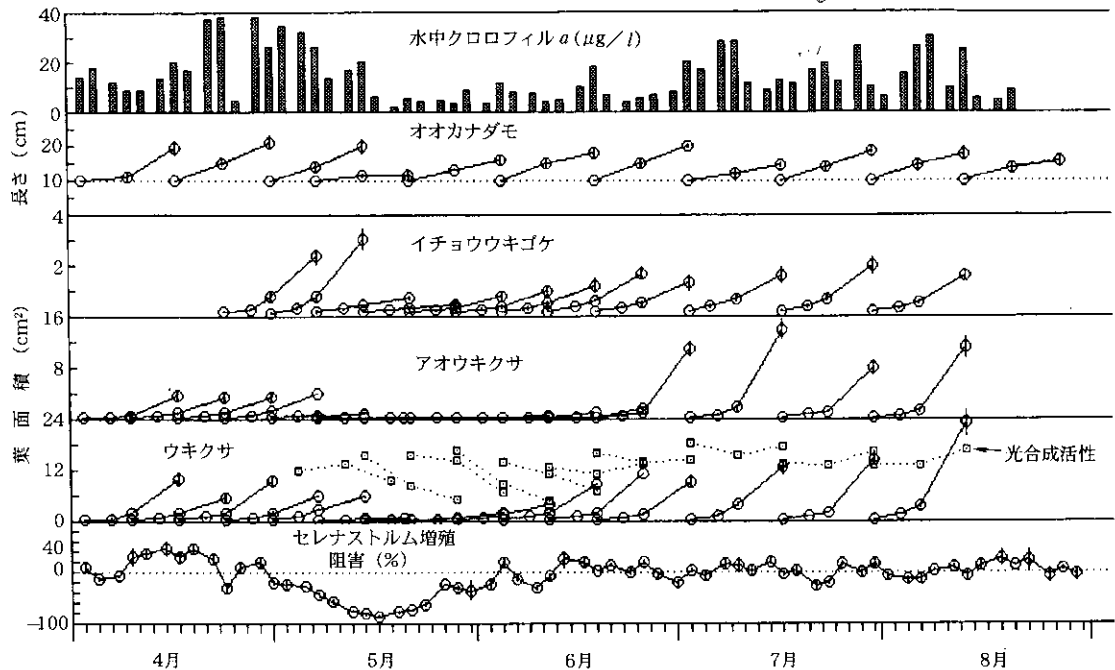


図3 バイオモニタリング施設内で河川水（桜川）に連続暴露された数種水草（ウキクサ2種、イチョウウキゴケ、オオカナダモ）の生長、ウキクサ葉面の光合成活性（相対値）、及び水中クロロフィルa濃度の変化（1997年）

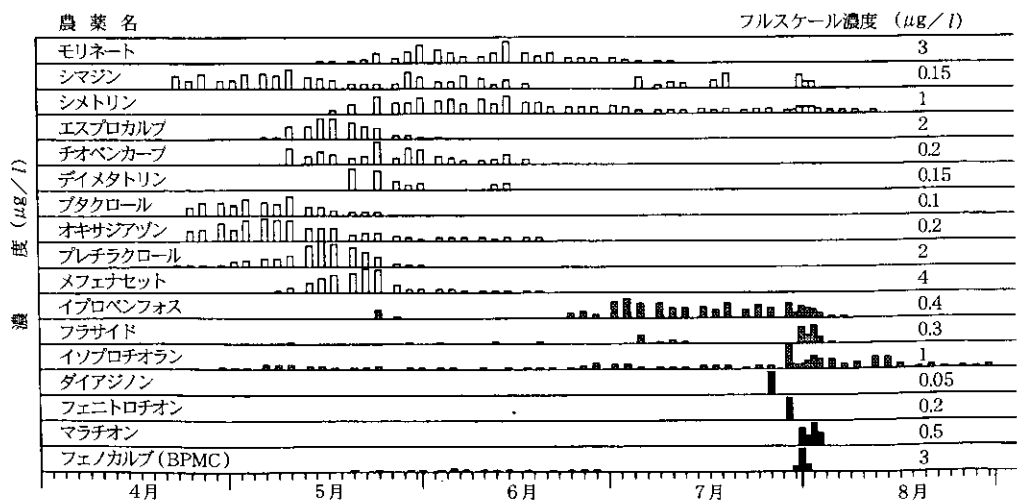


図4 桜川バイオモニタリング施設水路から採取した河川水中の17種農薬濃度の消長（1996年）

たウキクサ試験における、2週後の生長（2週後／開始時；葉面積比）は表1のようにアオウキクサの場合、除草剤汚染時期の前後は20倍、あるいは50倍程度（葉数と比例）まで生長したが、汚染時期の5～6月中旬に2.5倍程度の生長に停まった。一方、ウキクサの方は、この時期でも8倍程度には生長した。葉面積の測定に平行して（4日後は省略）、ウキクサ葉面に励起光（ハロゲンランプ白色光、 $\sim <710$  nm）でスポット状に照射し、光合成に利用されなかったエネルギーを蛍光として測定して、葉面の光合成活性を測定し、その変化を相対値として図3に示した。その結果、光合成活性も5月から6月中旬までは、他の時期の2週後の値と比較すると50%以下に低下していた。

イチョウウキゴケの生長も5月初旬から、その生長は急に抑制され始めたが、ウキクサのように極端に抑制されることはなく、5月中～下旬でも抑制前の20%程度の生長（葉面積）を維持した。しかし、本種の生長はウキクサの場合と異なり、7月以降でも5月以前のレベルまで達することはなく、その原因は化学物質の影響なのか本種の特性だったのかはさらに検討を要する。試験に用いた水生植物のなかで、オオカナダモが最も感受性が低く、5月上旬に暴露した場合のみ、生長が著しく抑制されたが、それ以外は顕著な生長阻害は認められなかった。

表1 河川水に連続暴露したウキクサの2週後の生長倍率（開始時／2週後；葉様面積比）

試験開始	アオウキクサ	ウキクサ	
開始葉面積(cm <sup>2</sup> )	0.19±0.026	0.34±0.04	(n=10)
4月中	20.2±2.7	24.3±5.7	(n=40)
5～6月中旬	2.5±1.4	8.4±6.3	(n=50)
7月以降	56.3±15.1	41.2±8.6	(n=40)

一方、河川水サンプル中でのセレナストルムの増殖も5月初旬から抑制が始まり、5月中旬にはほぼ完全に増殖が阻害されたが、それ以降は変動はあるが6月上旬～中旬までには回復した（図5）。セレナストルム試験とウキクサによるバイオモニタリング間で感受性に差が生じた。前者の場合、試験中に除草剤濃度が減少するので、微量な汚染には感受性が低かったものと思われる。

ウキクサをはじめとして、5月初旬から6月にかけてすべての植物は、顕著な生長阻害を受けたが、この時期の各種栄養塩類の濃度は他の時期に比べ、特に低い値を示していない（図6）。また、セレナストルム試験のデータ（1995年）から、セレナストルムの増殖阻害の原因物質はプレチラクロール（主因）とブタクロール、メフェナセットの相対的影響では説明が付き、

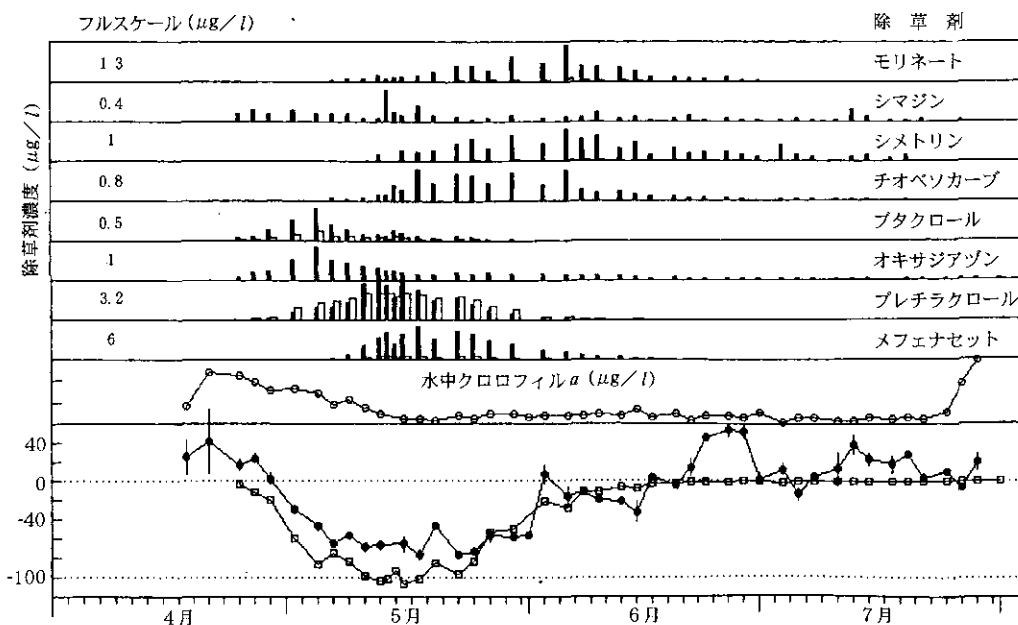


図5 河川水サンプル中でのセレナストルム増殖阻害とその原因物質、水中の各除草剤濃度における増殖阻害率の加算値（%）に基づく（1995年の場合） 1996年の場合も同様の傾向を示す。



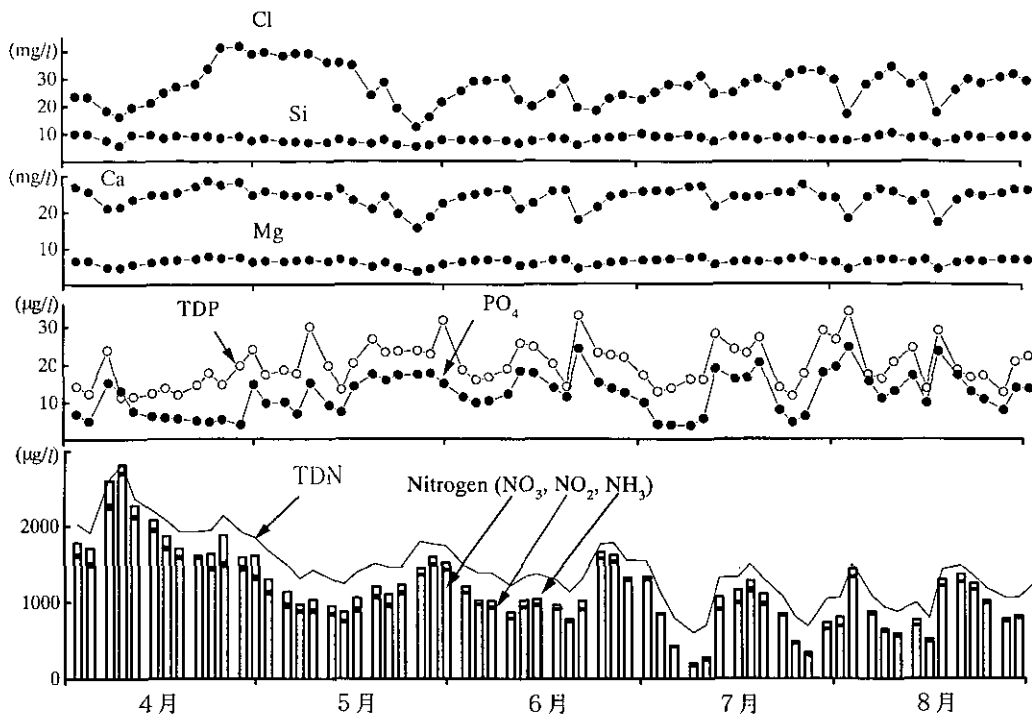


図6 桜川モニタリング施設に導入した河川水の水質変化(1997年4~8月)

モリネート、シメトリン、ベンチオカーブなどの除草剤は比較的濃度が高くとも増殖阻害にあまり関与していなかったと思われた(図5)。ウキクサに対する各種除草剤の試験は実施していないが、上記の試験結果と各種除草剤の消長とウキクサ生長の阻害・回復の時期が一致することから、ウキクサの著しい生長阻害も数種除草剤の影響であった可能性はきわめて高い。

一次生産者を用いたバイオモニタリング手法として、ウキクサ(特にアオウキクサ)を環境水に連続暴露し、その生長量を測定する手法は感受性、簡便性、システムの安定性から有効な手法を考えられる。国内の河川は、降雨後に濁流となることが多く、水中生物のバイオモニタリングに障害となる。しかし、ウキクサは常時水面に浮かんでいるためその影響を受けない。ウキクサの生長に関し、今回は葉面積から生長量を測定したが、葉面積と葉の数は比例関係にあり、葉の増殖数から生長量を記録したほうがより簡便である。OECDのテストガイドライン(案)でも、第一に葉(frond)の増殖数を数え、オプションとして葉面積、またはその重量(7日間試験の最終日)を測定することとなっている。

河川水中の藻類量を、クロロフィルaとして測定し

た。水中のクロロフィルaは、5月初旬から減少の傾向にあり、変動があるものの5月中~6月下旬には低レベルにとどまり7月から回復の傾向を示した(図3)。6月は梅雨時のため日照時間が減少し、増水のためクロロフィルa濃度の減少が起こった可能性が高い。しかし、5月の減少はセレンASTルムや水草類の生長阻害から類推して、数種除草剤の影響であると考えられる。ここでは、1997年の結果(図3)を示したが、除草剤流入後におけるウキクサの顕著な生長阻害と、除草剤消失後の生長回復は1996年もほぼ同様であり、また春期の河川水中のクロロフィルa濃度の減少も同様に観察された。

除草剤の生態影響に関し、モリネート、アトラジンなどむしろ魚類に対する影響に関心が持たれている。しかし、本調査河川のように水田地帯を流下する河川では、春に様々な除草剤汚染が高まった場合、本試験で用いたウキクサと同等以上の感受性を有する水生植物は、壊滅的な影響を受ける可能性がある。水草類の減少・消失の原因として、護岸工事等によって生育場所がなくなることが問題視されているが化学物質(特に除草剤)の影響評価も必要であることを示した。ウキクサを用いたバイオモニタリング手法の有効性を示

したが、本来その環境に生育していた水草との感受性の種間差など、基礎的なデータをさらに集積する必要がある。また、より自動化されたバイオモニタリングとしては、葉面の光合成活性の変化なども測定項目として検討の価値がある。

### 2.1.3 ヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) 死亡によるバイオモニタリング

ヌカエビは戦後農薬類が多量に使用され始められるまでは全国各地の水路、河川、湖沼などに大量に発生し、乾燥・保存が効くことから日本人の重要なタンパク資源になっていた。本来エビ類は大発生し、底質表面の有機物を効率よく消費し、魚類などの餌となって生態系の維持に重要な役割を果たしていたことであろう。

これまでの（特別研究報告，SR-19-'95他）では、河川水サンプルにヌカエビを導入して生物試験を行った。その結果、河川水サンプル中におけるヌカエビ死亡の原因は、数種殺虫剤の単独または相加的・相乗的な影響でほぼ説明することができた。河川水サンプルにおけるヌカエビ死亡率は、平成元年当時、調査河川（霞ヶ浦水系河川など）では著しく高いものであった。しかし、平成7年の数河川の調査では殺虫剤濃度の減

少とともにヌカエビ試験の死亡率は著しく減少した。

#### (1) 材料と方法

これまでの試験では、河川水サンプル（100 ml）にヌカエビ（生後1カ月前後7個体，3連）を導入し、その後4日間（～1995年）または2週間暴露して（1995年以降～）1，2，3，4，7，14日後の死亡率を求めた。試験の4日後，7日後に容器当たり魚の飼料（日本配合飼料，クランブル-4C）を1粒（4～5mg）を与えて飢餓による死亡を防いだ。

本課題での連続暴露では、バイオモニタリング施設内のガラス水槽（8l 図参照）に河川水を連続して流し（約0.3 l/min，交換率50回/day），その中に生後1カ月のヌカエビを100個体導入し，その後15日ごとにヌカエビの生存数を記録した。その間にもほぼ毎日観察を続け，適量の給餌（上記飼料）と，死亡個体（白濁）や行動異常があった場合は記録した。試験は4月から毎月，月初めに100個体導入し，9月まで続けた（1996，1997年）。

#### (2) 結果と考察

1995年に実施した河川水中サンプル中のヌカエビ試験では，高い死亡率が頻繁に観察され，その原因となるような殺虫剤も検出された（図7）。しかし，1996

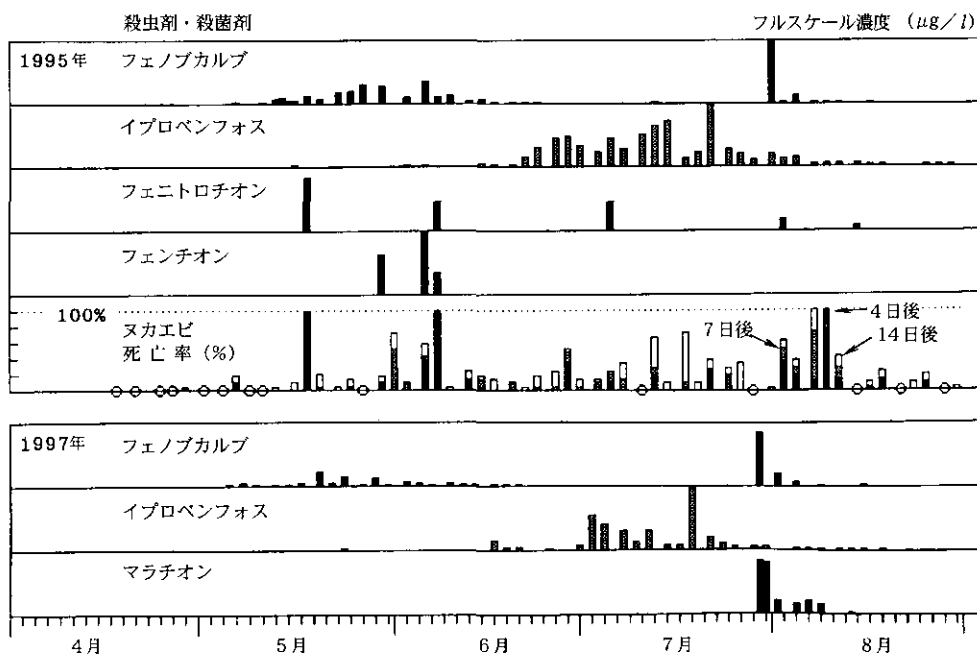


図7 桜川バイオモニタリング施設における河川水サンプル中の殺虫剤濃度（1995，1997年）と河川水サンプル中でのヌカエビ死亡率（1997年の死亡率は図8に示す）

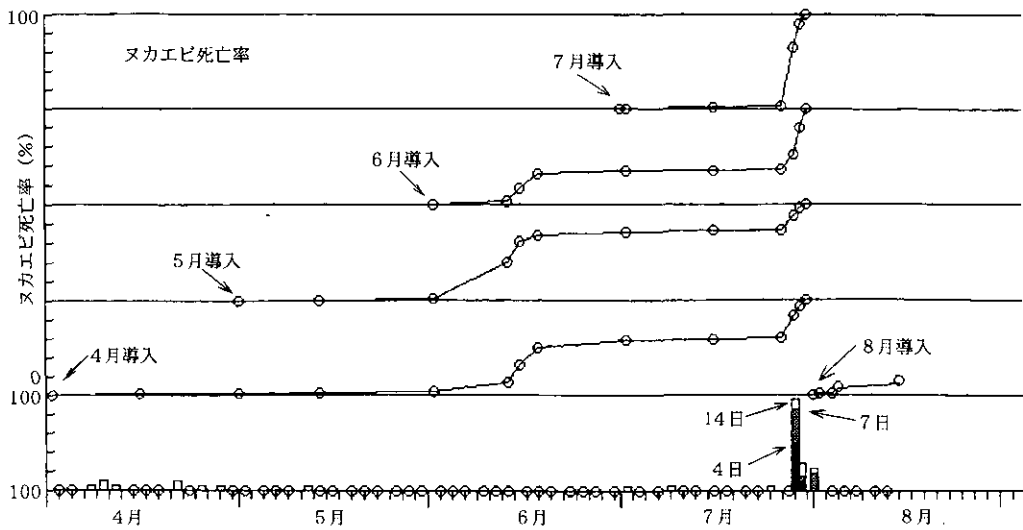


図8 河川水サンプル中、及び河川水連続暴露（毎月、月初めから100個体暴露開～）におけるヌカエビ（暴露開始時のAge；生後1カ月）の死亡率の変動

年と1997年は7月末と8月上旬の数日以外は、河川水サンプルを用いた試験では、ヌカエビの死亡は14日後でもほとんど観察されず、その間殺虫剤もほとんど検出されず河川水の毒性は顕著に減少したと思われた（図7）。しかし、河川水連続暴露では6月初旬から中旬の間で、ヌカエビの死亡率は急激に高まり、4月、5月、6月導入（いずれも100個体）のヌカエビ死亡率は、それぞれ約50、70、40%まで増大した（図8）。

その後7月末までは死亡率は高まらなかったが、7月末から8月始めにかけ、いずれの集団（4～8月導入）ともその死亡率は2、3日で急速に100%に達した。4月や5月から河川水に連続暴露していた個体では、親になり抱卵している個体もあったが、これらもすべて1～2日以内に急死した（口絵参照）。死亡に至る過程で、ヌカエビは水槽内で激しい忌避・逃避運動を続け、あるものは水面に飛び出そうとさえした。実環境では、もし毒性の高い河川水に急速に取り囲まれた場合、ヌカエビのような運動性の高い生物はその環境から逃避しようとするであろうが、逃避する方向が認識できるかどうかなどが問題である。流水式水槽内の河川水は、実際の河川水と同じと考えられ、感受性の高い生物には水槽内で起こった攪乱が同様にたらされた可能性が高い。7月下旬に河川水毒性が急速に高まったが、このときだけは、河川水サンプル中の死亡率も高い値が記録された（図8）。

この時期の急速な毒性の高まりは、上流域の水田に空中散布された殺虫剤が原因であり、中でもマラチオン、フェノブカルブ（BPMC）が毒性の主原因物質であった（図7）。殺虫剤の空中散布は、調査期間中毎年実施されたため、1997年は毒性の出現時期とその強さ（ヌカエビ行動異常・死亡）がある程度予測され、実際ほぼそのとおりの現象が引き起こされた。河川水サンプルを用いた試験ではヌカエビ死亡率は、1996年以降顕著に減少した。しかし、河川水に連続暴露した結果は、6月中旬に17種の農薬分析値では説明がつかない毒性の高い物質が流入したことを示唆している。また7月末のような、一両日中の急速な毒性（2種の殺虫剤）の高まり、などは連続暴露のバイオモニタリングで初めて明らかにされるものである。

上記のバイオモニタリングでは、その都度あらたな集団を河川水に暴露するものであるが、実環境では、同じ集団がバイオモニタリングで明らかにされたような毒性に暴露され続ける。生物は春に生まれ、春から夏にかけ生長するが、その間の感受性は概して高く、ヌカエビ死亡で明らかにされたような毒性により、その生存に影響を受ける可能性は高い。バイオモニタリング施設周辺の河川（霞ヶ浦河口、約5km上流）は、本来は生産性が高く、多種多様な生物種が維持されるような環境と考えられる。しかし、本研究で明らかにされたような生物影響が毎年繰り返されると、感受性

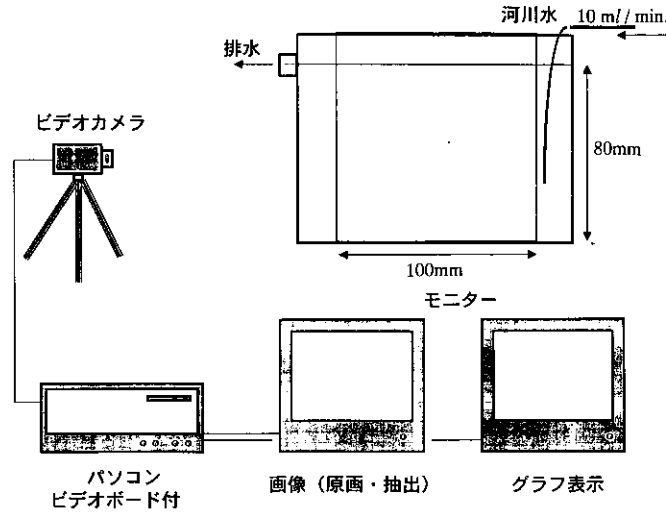


図9 ヌカエビの行動記録装置の構成

の高い生物の消滅や、生態系の回復が阻害されるなど、生態系の受ける影響はきわめて大きいものと考えられる。

#### 2.1.4 ヌカエビの行動を利用した有害化学物質のモニタリング

淡水産エビ類に対する殺虫剤の影響は、致死濃度以下でも行動・酸素消費量の変化、DNA損傷などが知られている。ヌカエビを用い、行動への影響から低濃度の有害化学物質をモニタリングする手法を開発した。その際、ヌカエビの観察が非接触で行えること、影響をリアルタイムで計測できること、さらに省力化のために自動化されたシステムの開発を目標にし、そのため画像処理技術を用いて行動の変化を検出することとした。

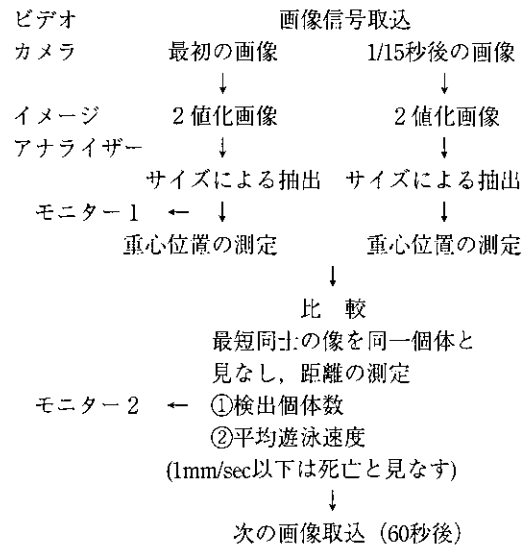


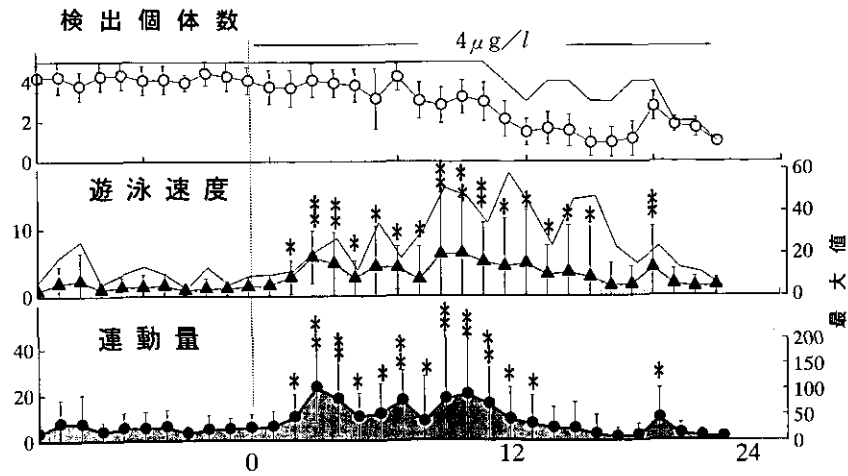
図10 行動解析装置のデータフローチャート

#### (1) 行動解析装置の概要とヌカエビを用いた試験法

河川水を連続的に小型ガラス水槽に導入し、この水槽に生後30日齢のヌカエビ5個体を入れ、白黒ビデオカメラで映像化し専用ビデオボードをつけたパーソナルコンピュータにつないだ。装置は2つのディスプレイを備え、1台目には実画像とともに処理された画像を、別のディスプレイには解析結果を表示させた。画像処理は、1/15~1/30秒間隔で取り込まれた2つの映像をそれぞれ2値化し、得られた像の大きさ(長さ・面積)から判断させてヌカエビだけ抽出し、個々の重心座標を求め、さらに連続する2つの画像を比較して同一個体と推定される対を選び(それぞれ、最も近

い位置関係にある像を同一個体とした)、そこからヌカエビの遊泳速度を算出しその画像を表示した。解析結果は別のディスプレイにグラフ表示した。この一連の遊泳速度の計算・表示等は30秒に1回のサイクルで実行させた。図9に観察のための装置の模式図、図10に画像データの処理フローを示した。平均遊泳速度と検出個体数はコンピュータに記録され、この記録データに基づいて運動量(遊泳速度と検出個体数の積)を求めた。なお、河川水中でのヌカエビ行動を観察した試験は流水式で行い、この場合は河川水は調温して23℃一定としたが、薬物添加試験では止水で試験した。この場合も水温は23℃一定であった。

(a)



(b)

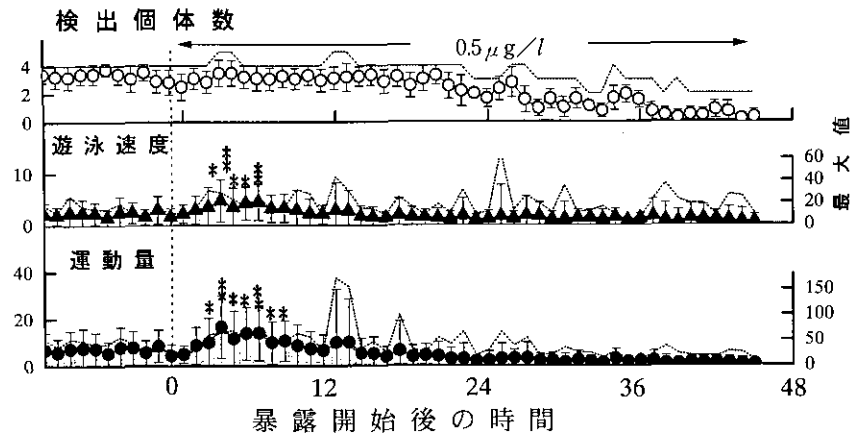


図11 フェニトロチオン  $4\mu\text{g/l}$  (a) および  $0.5\mu\text{g/l}$  (b) 暴露下のヌカエビの行動変化  
 横軸は行動記録開始後の時間で、薬剤投入時を0とした時間で表している。  
 検出個体数は水槽に入れたヌカエビ数5個体が最大値で0.5の範囲で変動する。  
 遊泳速度は検出された個体の速度で、運動量は検出個体数と遊泳速度の積である。  
 それぞれの値は1時間の平均値、点線はそれぞれの最大値を表している。

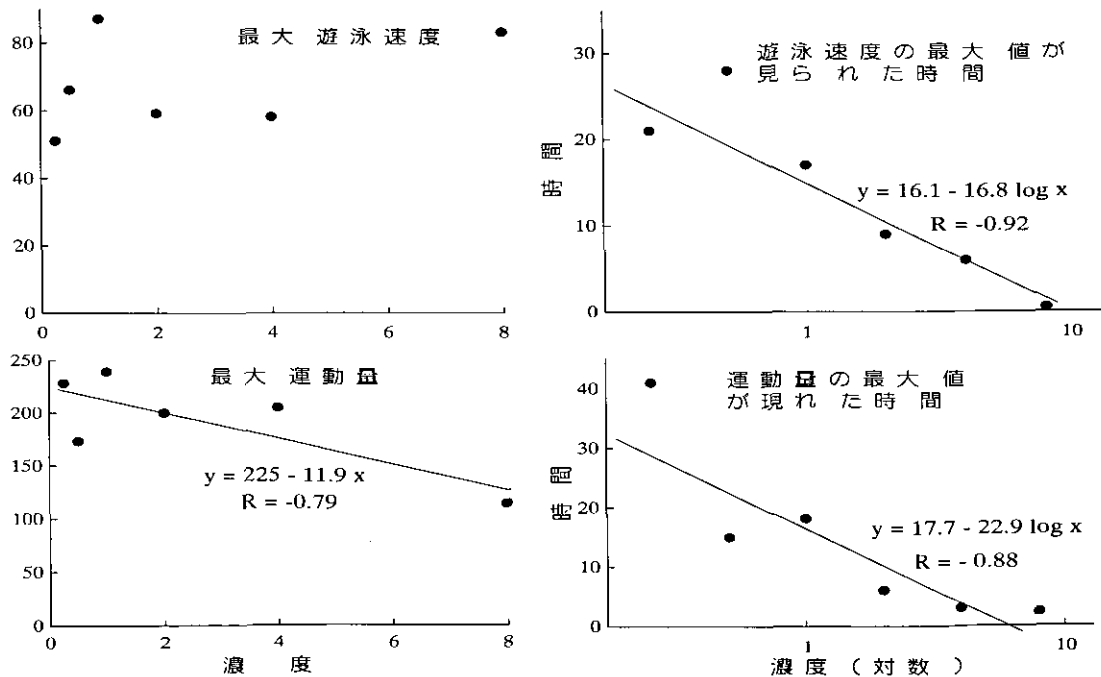


図12 殺虫剤(フェニトロチオン)暴露下のヌカエビの最大遊泳速度最大運動量および発現までに要した時間の関係



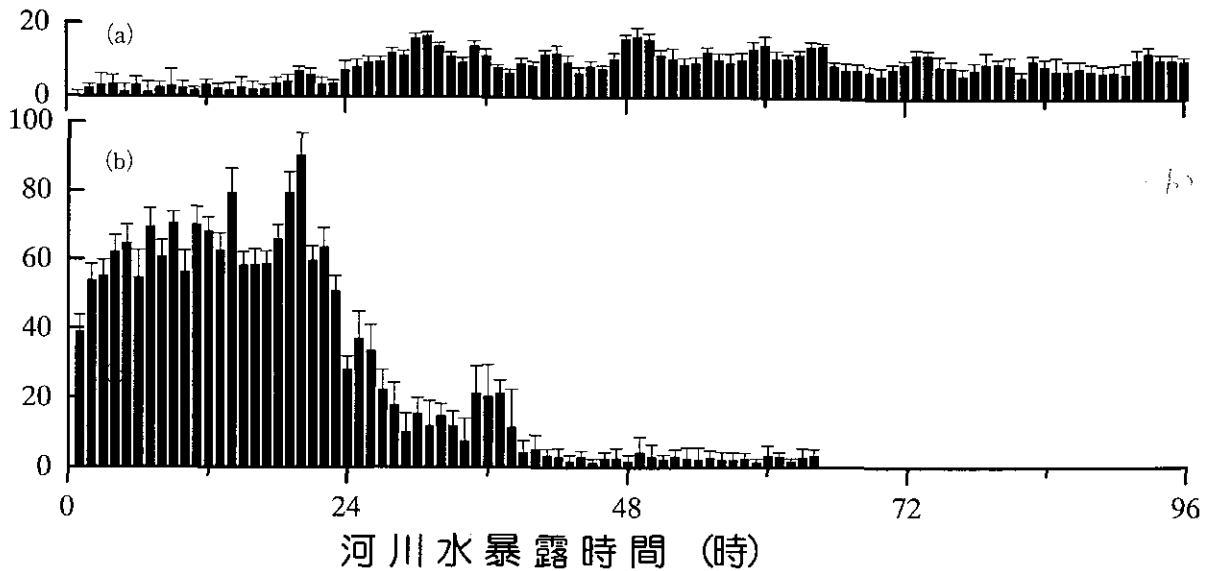


図13 ヌカエビ運動量(時間平均値)の経時変化

(a) : 非汚染時期で運動量は低く安定

(b) : 水田への農薬空中散布の時の変化, 激しく運動しているがその後急速に動きは緩慢になる

## (2) 殺虫剤のヌカエビの行動に及ぼす影響

河川水に暴露する前に, 有害物質の影響を把握するため飼育水(脱塩素上水)にフェニトロチオン等を添加し, 行動変化を観察する実験を止水条件で行った。その結果, 清浄水中でのヌカエビの遊泳速度は比較的緩慢で(平均遊泳速度 5 mm/sec 以下), しかも水槽底部分・壁面において水中に泳ぎ出すのはまれであることがわかった。これに殺虫剤を投入すると水中に(上方に)泳ぎ出す個体が増加し, フェニトロチオンの場合, 48時間半数致死濃度以上の  $2 \mu\text{g/l}$  (図11a) では1時間以内に遊泳速度が上昇した。この手法では  $0.25 \mu\text{g/l}$  (図11b) の濃度でも発現までの時間は要するものの異常行動が観察され, しかも遊泳速度が極端に上昇することがわかった。異常行動が見られるまでに要する時間は殺虫剤濃度が高いほど短く(図12) 運動量の最大値とも逆相関を示した。ただし最大遊泳速度と暴露濃度の間には相関が見られなかった。

## (3) 河川水中でのヌカエビの異常行動の季節変動

ヌカエビの異常行動は大きく分けて遊泳速度と水中への泳ぎだし頻度の上昇となって現れることが明らかになった。そこで, 河川水のモニタリングでは底や壁面に休止している個体を除いて泳ぎだした個体だけを計数し, さらにこの検出個体数と平均遊泳速度との積を運動量として表示し, 行動異常の検出能を向上させた。

1996年4月から流水式水槽・画像解析装置を用い, 河川水に連続暴露したヌカエビ行動のモニタリングを開始した。計測は1997年11月まで最低でも月1回, 農薬類の汚染時期には高頻度で行った。その結果, ヌカエビの運動量は季節によって変動し, 最も異常な動きが記録されたのは1996年, 1997年の両年とも, 7月末に実施された水田への農薬(殺虫剤; マラチオン, フェノブカルブ, 殺菌剤; フサライドなど) 空中散布時期であった。このとき観察された運動量を(図13b)に, これとは対照的に動きが静かであった1997年1月の行動記録を(図13a)に示す。図から明らかのように, 空中散布時期には河川水暴露直後からヌカエビは激しく水槽中を動き回るものの, この動きは長続きはせず暴露開始24時間後には著しく減少し, さらに時間がたつと平静時よりも緩慢になり, 行動記録中は死亡していなかったが, 72時間後には5個体中3個体が死亡した。一方, 冬期間は水温・照明条件は同じであったが静かな動きが続いた。

ヌカエビを河川水に暴露した後の行動記録は, 原則として72~96時間行ったが, 図11bのように汚染が著しい場合, 暴露後1日で運動量の低下が起こった。そのため, ヌカエビの運動量を河川水暴露後24時間以内の平均値として, その年間変動を(図14)に示した。図から河川水中でのヌカエビの行動は4月初旬, 6月を中心とした農薬類の汚染時期(5~8月), および11月

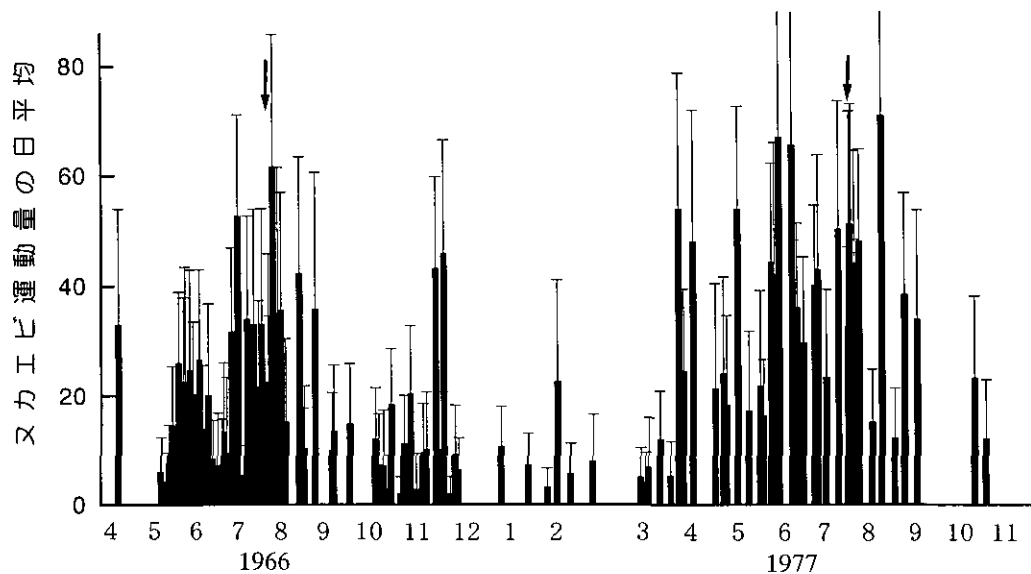


図14 ヌカエビの日平均運動量の変化 ↓は空中散布による水田への一斉農薬散布時期を示す

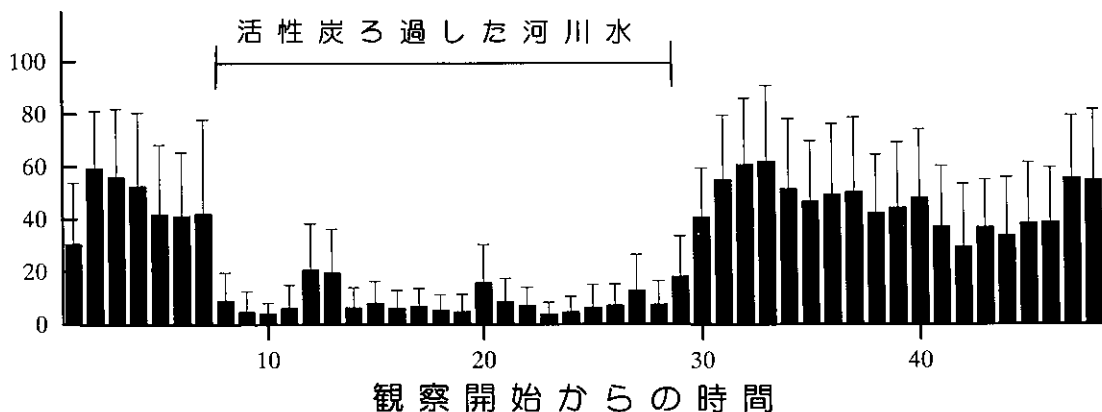


図15 ろ過水および生河川水中でのヌカエビの運動量

測定開始から7時間と29時間以降は生河川水を中間はろ過水中でのヌカエビの動き。

ろ過水中ではその動きは静かなのに対し、生河川水中では動きが激しい。

にそれぞれ運動量の高い時期があり、冬期間はその動きは平靜であることが示された。行動の季節的な変動は両年ともよく似たパターンを示し、河川における農薬類の消長と大筋で一致した。なお、図には示さなかったが1997年11月以降の傾向も同様であった。

図13bに示すように、河川水中の毒性物質の濃度が高すぎると、ヌカエビの運動量は観察開始後しばらくは高い値を示すが、短時間に減少し極端な場合は死亡する。そのため、長期間のバイオモニタリングには定期的な試験生物の交換が必要である。試験法が確立し、年間を通して決まった日齢の試験生物が供給できるヌカエビはその意味でも試験生物として適している。また、農薬類（特に殺虫剤）に対する感受性は、魚類よりも桁違いに高い。

#### (4) 軽度の行動変化と生長への影響

年間を通したモニタリングの結果、5～7月の時期は比較的ヌカエビの運動量が継続的に高いことがわかった。致死濃度以下ではあるが、継続的な運動量の増加がヌカエビ、あるいは他の水生生物に生長面などで何らかの影響を及ぼしている可能性が高いと推察されたので以下の実験を行った。確認のための実験として、ヌカエビ（30日齢）を農薬汚染時期に（6月上旬）の河川水に暴露し、その8時間後に、活性炭ろ過した河川水（ろ過水）に切り替えた。ヌカエビの運動量は速やかに低いレベルに達したが、再び28時間後に河川水に切り替えると、数時間でもとの高いレベルに上昇した（図15）。

そこで、活性炭ろ過水と生河川水を連続してかけ流

表2 河川水に暴露したヌカエビの生長

	30日暴露後の体重 平均 (95%信頼区間)	期間中の生長速度
ろ過水	8.54 (7.77-9.31)mg	0.039 (0.036-0.042)
生河川水	6.44 (5.51-7.38)	0.030 (0.025-0.035)

- 1) 暴露開始時のヌカエビの体重は2.64 mg
- 2) 体重増, 生長速度とも有意差 (P<0.01, n=100)
- 3) 期間中の死亡率は河川水, ろ過水とも低く差はなかった。

した水槽で, 6月中旬から1カ月間をヌカエビを飼育し(両区とも4水槽, 合計100個体)生長を比較した。その結果, ヌカエビは生河川水より活性炭ろ過水の方が有意に生長が速かった(表2)。本試験の結果は, この時期の河川中には致死濃度以下ではあるが, 活性炭ろ過で除去可である毒性物質が継続的に存在し, ヌカエビの行動を増加させ, 結果的にヌカエビの生長を

抑制したことを示す。ヌカエビやそれと同等の感受性を有する水生生物にとって, 継続的に運動量の増加を余儀なくされた場合, それだけエネルギーの消費になり, 実験結果が示すような生長の阻害が起こる。さらに行動の異常が交尾行動などに悪い影響が及んだ場合は, 繁殖障害の原因となる。

#### (5) ヌカエビの行動を用いたモニタリング手法

行動変化に基づき, 致死的な反応よりも短時間, 高感度で連続的なモニタリングが可能な手法を検討した。ヌカエビは死亡直前に異常に高い遊泳速度(逃避行動に似た行動)をとるのに対し, 致死濃度以下ではその平均遊泳速度は上昇するが通常の遊泳とは区別できないものであり, これら2つの行動様式は同じではない。本研究では, このような異質の行動を運動量の変化という単一の尺度で扱ってきたが, 両者の分別が可能ならさらにバイオモニタリングの情報量が増える。

表3 桜川におけるヌカエビの異常行動のパターン

汚染度	遊泳速度	検出個体数	運動量	継続時間*	影響
****	**	****	***	短い	致死
致死濃度以上					
***	***	***	****	中程度	-
致死濃度以下					
**	**	**	**	長い	生長阻害
軽度の汚染					
*	*	*	*	-	
非汚染					

\*異常行動が継続して記録された時間

ヌカエビの行動を運動量として, リアルタイムでモニターする手法は開発できた。しかし, 運動量やその遊泳速度の最大値と河川水中の有害物質濃度との間には必ずしも直線的な比例関係が認められない。その原因は毒性が強すぎると, いったんは上昇した運動量より早めに低下することにある。その点では, 行動変化の解析手法, 暴露システム, (複数の水槽を準備しておくなど) など, 検討の余地がある。表3に桜川で観察された異常行動のパターンと汚染の程度との関係をまとめて示した。汚染の程度と検出個体数の増加とはほぼ一致するが(運動量の変化よりも, 短時間に起こ

る現象), 汚染度と異常行動の継続時間は逆比例する傾向にあること, 汚染度と遊泳速度・運動量の関係が必ずしも一次的な比例関係にならない点など, モニタリング結果から行動変化の原因物質に関し多様な示唆が得られるであろう。

ヌカエビの運動量を増加させている物質は, 7月末の空中散布による殺虫剤(他に殺菌剤も散布されている)であることは数種殺虫剤の添加実験などからも確認されたが, 空中散布時期以外でも運動量が高く, 水田以外(畑地, ゴルフ場, 果樹園など)で使用された殺虫剤(あるいは, 除草剤・殺菌剤)なのか, それと

もまったく別の物質であるのかは現在不明である。少なくとも、河川水から農薬類が消失した冬期の運動量は低いレベルで推移したが、11月にヌカエビ行動を異常に高めた原因物質に関しても不明である。また、運動量の高い時期でも、河川水を活性炭ろ過すると運動量は正常なレベルに低下し、活性炭に吸着する化学物質がヌカエビの異常な動きを誘発していた可能性が高い。

### 2.1.5 淡水産二枚貝によるモニタリング

#### (1) 試験生物としてのドブガイの開発

ドブガイ (*Anodonta woodiana japonica*) は冬から春に抱卵し母体内で受精・発生し、春先にグロキディウム幼生としてふ化し母体を離れ魚類に外部寄生する。寄生世代中に稚貝に変態しやがて自由生活期に移行し(5~6月)底質中で生活するようになる。本研究で用いたドブガイは、1) 桜川バイオモニタリング施設内の人工水路の底質中から採取したもので、稚貝となった後、桜川からの河川水とともに運ばれてきたものと考えられる。生長速度測定にはこの個体を用いた。

そのほかに、2) 霞ヶ浦小野川河口の淡水真珠養殖施設・福島県三春町の養魚場に自生していたものを一部必要に応じて用いた。

ドブガイは日本の河川・湖沼に広く分布していたが、近年その生息地が少なくなっているとされ、霞ヶ浦(西浦・北浦)でも生息密度が減少しており、この種を含め淡水産二枚貝を産卵床として利用しているタナゴ類の絶滅を防ぐ意味でも本種の生息状況の把握と減少の原因追及が求められている。二枚貝は底質に斧足で体を固定し(斧足類)、水中の懸濁性有機物(植物プランクトン)を摂食している。したがって本種は、溶存体(水中)、あるいは懸濁粒子や底質に吸着した化学物質を、それぞれ鰓、経口、あるいは斧足表面等と異なった経路で体内に取り込むものと考えられる。このように有害物質の直接的な影響とともに、主な餌が植物プランクトンであるので藻類の生産が阻害されれば、餌量の減少として2次的な影響も受けていると考えられる。そのため本種の生長速度の変動を用いたモニタリング手法の開発を進めることにした。

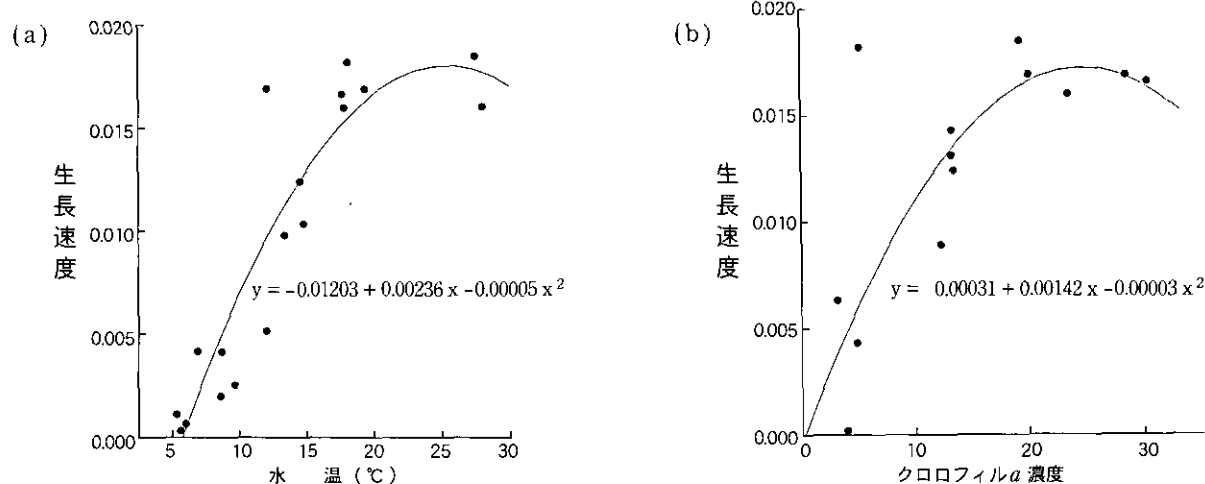


図16 ドブガイの温度と生長の相関およびクロロフィル濃度と生長の相関

まず、生長段階・生育温度・餌密度と生長速度の関係を明らかにするために、桜川の河川水を導入した水路に36個体のドブガイをステンレス製の網かごに入れて個別に飼育し、2週間ごとに体重・殻の大きさ(幅・長さ・厚さ)を計測し、水温およびクロロフィルa濃度との関係を解析した。その結果、生長を把握するためには生体重量の変化が最も実験誤差の少ない方法であること、殻幅(貝殻の長軸長)1cm以上10cm未満では生体重量変化をもとにした生長速度に差がないことを明らかにした。生長速度と水温(a)、及び餌量

(水中クロロフィルa濃度として(b))の間には以下のような経験式が求められた。

$$(a) y = -0.01203 + 0.00236x - 0.00005x^2 \quad (\text{図16})$$

$$(b) y = 0.00031 + 0.00142x - 0.00003x^2 \quad (\text{図16})$$

ドブガイと同じ属の数種は海外で毒性試験に用いられ、その報告例は多い。飼育に関しても研究が進められおり、抱卵個体からグロキディウム幼生を採取し、人工培地中で稚貝まで変態を完了させる飼育法が開発されている。ドブガイは、稚貝に変態した後では飼育

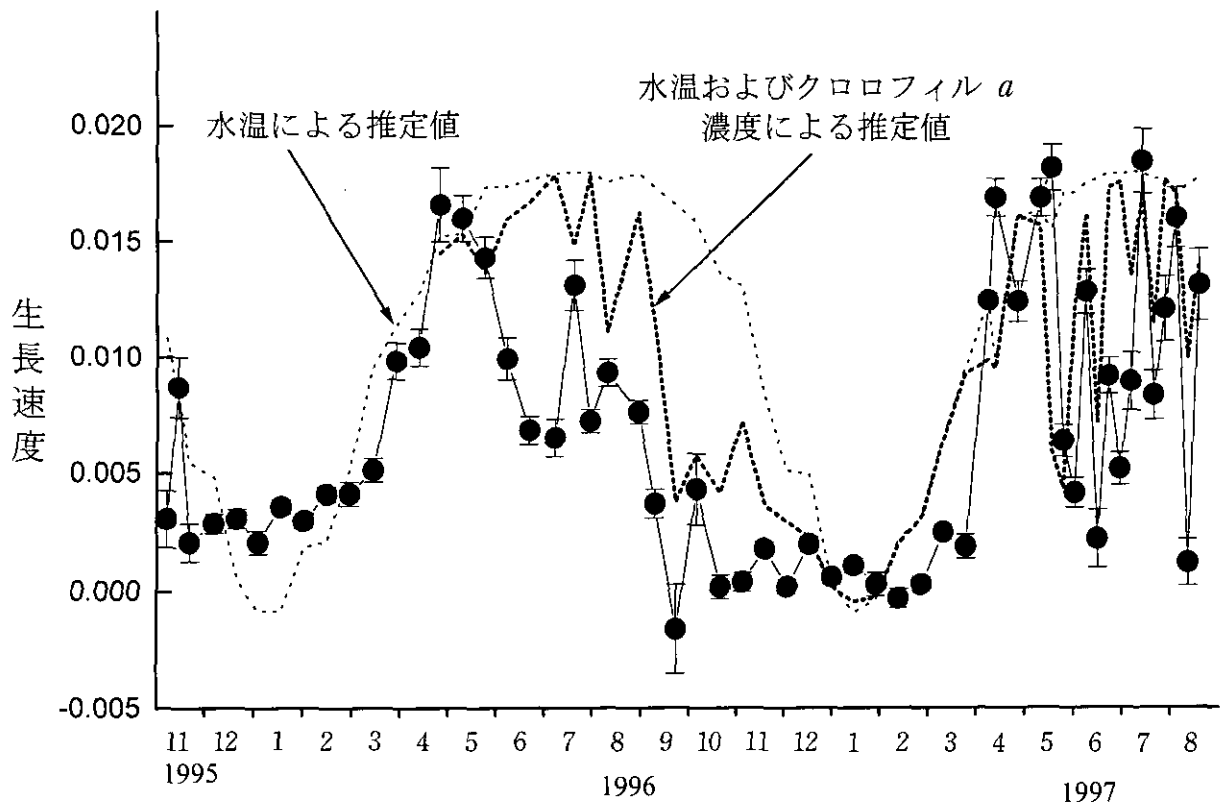


図17 河川水導入水路でのドブガイの生長速度の変動 (95年11月~97年8月)  
 実線●は実測値, 2つの波線はそれぞれ水温単独および水温とクロロフィルa濃度から予測した生長速度 (本文中)

も比較的容易ではあるが、人為環境下で受精卵を得ることが困難であり現状では試験生物化ができていない。一方、モニタリング生物としては、当該水域に移植する in situ (現場) 試験が容易で、先の飼育上の問題が解消されれば、底質汚染の影響評価のために優れた試験生物となる。

## (2) モニタリング手法の検討

淡水産二枚貝は底質に体を固定して生活し、あまり移動することがないため、野外(調査地点)における in situ 試験にも適している。生長は水温と餌密度以外に、環境中の有害物質にも影響されると考えられる。本研究は将来の in situ 試験を考慮しつつ生長変化のモニタリングを、1995年10月から約2年間、桜川バイオモニタリング施設の水路を用いて行った。

ドブガイは 50 × 200 × 200 h (mm) のステンレス製の網(目合10 mm)かごを桜川河川水を導入した人工水路(幅40 cm × 長さ4 m × 深さ30 cm, ただし水深は10 cm)中に並べ1個体ずつ入れた。ドブガイの生体重は、1週または2週ごとに網かごから取り出して計測した。計測はドブガイの生長に影響を与えないように短

時間で終わるように行い、終了後はただちに水路に正常な向きに戻した。同時に水温・pH・溶存酸素濃度・電気伝導度については連続的に、クロロフィルa濃度・農薬類濃度は週3回(4~8月)または1回測定した(9月以降)。

なお上記とは別に疑似現場試験として、水路を長さ1 mに仕切った後に、底に川砂を厚さ5 cmほど敷きつめそこにドブガイ20個体を個体識別のために油性インクで記号を付し放し同様の計測を行ったが、以下の結果と同様であった。

生体重の変化は

$$\text{生長速度 (d}^{-1}\text{)} = \ln (W_{t+1} / W_t) / t$$

ただし  $W_{t+1}$  : t+1日目の生体重

t : 計測間隔(日数)で表した。

## (3) 生長速度の年間変動とその要因

ドブガイの生長速度は水温が最低となる冬期間著しく小さくなるが生長が停止することはない、水温が上昇する春期に急速に生長速度も増加し始め、4月から5月はじめに最も高い値を記録した。この数値は1週



間に体重が約1.2倍に増加する速度である。ところが5月後半から6月になると生長速度は急激に減少した。その後一時的に回復することはあったが、水温・餌量から生長に適すると考えられた7~8月に、かえって生長率が減少する傾向を示した(図17)。水温およびクロロフィル*a*濃度と生長速度の関係は前述したとおりであるが、生長速度を下式で推定して観測された速度 $V_o$ と比較した。

$$\text{推定生長速度 } V_e = V_{\max} \cdot f(\text{temp}) \cdot f(\text{chl. } a)$$

ここで、 $V_{\max} \cdot f(\text{temp}) = V(\text{temp})$ である。推定値は、生長速度の水温特性とクロロフィル*a*濃度が小さい、つまり餌が不足した場合の生長抑制効果の積として求められると仮定した。観測された速度 $V_o$ と推定生長速度 $V_e$ はかなり一致し、ドブガイの生長速度は水温と餌濃度に従うものと考えられた。

ただし1996年の6月は2つの値が著しくかけ離れており、これら以外の要因が加わったと判断できる。この時期はドブガイにとって生長が停止するような季節ではないが、河川からこの時期様々な農薬類で検出されている。ドブガイの生長と農薬濃度の関係を直接さし示す実験例はないが、このような汚染もその生長阻害の原因となっていた可能性が高い。これに関連し、同じ水路で飼育したドブガイは農薬類汚染の一時期に、薬物代謝酵素(GST, 後述)の活性が上昇するなどの影響を受けていた。しかし、このような酵素活性の変化が、生長の抑制を起こすほどの効果があるかどうかは不明である。

1997年の同時期(6月)では $V_o$ と $V_e$ に大きな差が認められなかった。これは、この時期にクロロフィル*a*濃度が前年より著しく低下しており、このために水中の農薬類の影響が表に現れなかったと考えられる。上記の研究で、水中のクロロフィル*a*濃度は、5月中旬から6月にかけて水田に散布される除草剤の影響を受けて低下することが明らかにされている。ドブガイの生長を基準にしたモニタリング手法では、農薬の直接的な影響と餌濃度の低下を介しての間接的な影響の両者を分離することはできないが、代謝酵素活性の測定を併用することで農薬類全般の影響を正確に反映するモニタリングが可能となる。

#### (4) マシジミの生長によるバイオモニタリング

様々なサイズのマシジミがバイオモニタリング施設

内の水路から得られた。それらの体重と体長を測定して、平均体重から、3つのサイズ(100 mg (S), 300 mg (M), 900 mg (L))に分け(各サイズ,  $n=20$ ), 標識して水路内に戻した。4月17日(1997年)から、1週ごとに体重・体長を測定して生長速度の変化を翌年の2月までモニタリングした。マシジミを用いた理由はドブガイの場合と同様であるが、ドブガイよりも様々なサイズの個体が多数採取されたため、成長段階による感受性の差が検討できると考えられたためである。餌(クロロフィル*a*として)の減少や水温低下の時期以外に、生長速度が最も大きく減少したのは、6月中旬で2週間にSサイズでは生長速度が、試験期間最大の0.0280から0.0139まで急速に減少した。しかしLサイズでは、その変化は0.0087から0.0063とそれほど減少せず、少なくとも成長速度からいえばこの間の影響は少なかった。6月中旬は、河川水に連続暴露したヌカエビの死亡率が増大した時期でもあり(図7)何らかの毒性物質により、シジミの生長が抑制された可能性が高い。

#### (5) マシジミ水管長の変化

マシジミは桜川河川水を流した水路にも繁殖し、河川水への連続暴露により死亡することはないが、河川水の毒性が高まった場合、殻を閉じそれに伴って水管を収縮させると考えられた。文献では二枚貝の殻の一方に微小なコイルを取り付け、殻の開閉に伴う微弱な電流を測定するバイオモニタリング手法が報告されている。しかし、国内河川の多くは増水時に濁流と化すため、このような微小な装置は長期間維持しきれないものと考えられた。そのため、このような障害にも安定なシジミ水管の伸縮に基づくバイオモニタリングを検討した。

シジミ水管伸縮の記録法: マシジミを浅いプラスチック容器(22×16×4(水深)cm)の底に接着剤で固定し( $n=12$ ), 河川水を連続的に流して(約350 ml/min, 水交換率; 約360回/day), シジミ殻の開閉に伴う水管(2本)の伸長を、任意の時間(10:00~14:00の間)から20分ごとに8時間自動撮影した(夜間は、タイマーにより蛍光灯照明)。試験に用いた個体の横体長は $18.4 \pm 1.2$  mm ( $n=12$ )であった。5月下旬にセットし、農薬類が河川から消失する9月17日まで、月数回の頻度で撮影を行った。この間の維持は増水時

などシジミに沈着した泥を洗い落とす程度で、給餌は不要である。

1) 水管伸縮と河川水毒性の変化

図18に3日分の測定例を示したが、河川水の毒性が高まりヌカエビが急速に死亡した7月28日の場合(前記)、水管の平均長は0.5 mm以下のレベルにとどまった。一方、河川水の毒性が低かった7月23日の場合は1 mmから2.7 mmの範囲で常に伸長していた。5月下旬から撮影を始め、6月から1カ月に6回前後の頻度でマシジミ水管の伸長を撮影し、各個体の平均値(8時間当たり、n=24枚)の平均値(n=12)を図19に示した。5月中旬、6月中旬、7月末に水管は収縮する傾向を示したが、これらの時期はそれぞれ、除草剤汚染のピーク時期(図4)、河川水連続暴露のヌカエビ死亡率が急上昇(原因物質不明)した時期(図8)、2種の殺虫剤によりヌカエビが急性死亡した時期(図7, 8)に当たる。感受性の面から除草剤の汚染をヌカエビの死亡率でバイオモニタリングできないが、上記のようにヌカエビ(行動)やシジミ(水管伸縮度、あるいは殻開閉度)など行動の変化によるバイオモニタリングは有効である可能性が高い。マシジミは農業汚染に感受性が低く(桜川河川水導入水路に自然発生)、5月から水槽に固定して河川水を流し続けたが、9月まで生存し給餌しなくとも水中の懸濁粒子を取り込んで、不自然な体位のため生長が良くなかったが、

実験開始時の $18.4 \pm 1.2$  mmから $22.4 \pm 1.1$  mm (n=12)に生長した。長期間のバイオモニタリングでは、ヌカエビのように試験生物を頻繁に取り替える必要はない。また、シジミは本来砂泥に生息するため、増水時の濁流によりたびたび泥に覆われても、上記のように安定して試験系を維持することができた。ただし、ドブガイの場合と同様、試験生物化が未解決であり、さらに化学物質ごとの感受性のデータを収集する必要があるなど、検討課題は多い。

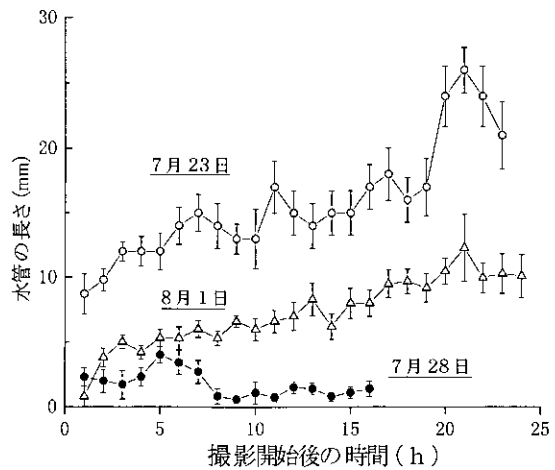


図18 桜川河川水に連続暴露したシジミの水管の伸縮20分間隔で自動撮影

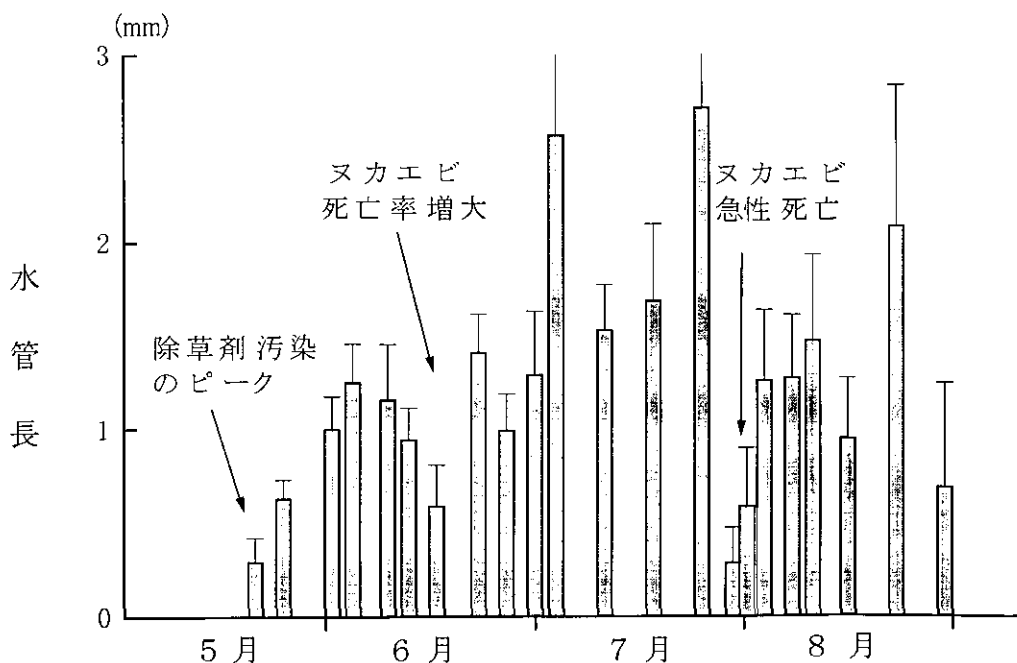


図19 桜川河川水に連続暴露(5月中旬~8月, 1997年)したシジミの水管伸縮(殻の開閉に連動)の変動

(6) ドブガイの異物代謝酵素活性測定による農薬汚染レベルのモニタリング

生体は環境汚染に対する防御の一環として脂溶性化合物を排泄しやすい親水性代謝物に変換するための生化学的機構を備えている。これらの生化学的過程の多くは酵素的であり、シトクロムP450 (P450) やグルタチオン抱合酵素 (GST) などが主にその役割を担っている。

水生生物においてもこれらの異物代謝酵素が存在し、環境汚染物質に暴露されることで、その酵素活性が変動することが報告されている。淡水性の二枚貝である *Anodonta* 属は環境汚染への適応能力が高いことが報告されている。ドブガイ (*Anodonta* の1種) でも、汚染物質暴露によって誘導された異物代謝酵素が働き外来異物を生体外へ速やかに排泄している可能性が考えられた。そこで、河川が農薬で汚染される5月から汚染度が低くなる10月まで、ドブガイを1カ月おきに水路中の河川水に暴露し、異物代謝に重要な臓器である中腸腺 (ほ乳類の肝臓に相当) の酵素活性の変動を測定した。本実験では異物代謝酵素活性の変動が環境汚染レベルのバイオマーカーとして指標になるかどうかの可能性を検討し、同時に環境汚染への適応に寄与する代謝酵素を明らかにすることを目的とした。

薬物代謝酵素 P450

P450は多くの生物種で異物代謝に際して最も重要な役割を果たしており、有機塩素系化合物や多環芳香族、農薬など環境汚染物質への暴露でその酵素活性が変動する。P450には多くの分子種が存在するが、今回多環芳香族類のベンゾピレンやステロイドホルモンであるテストステロンを基質として、ほ乳類ではP4501A, P4502C, およびP4503Aサブファミリーに相当する代謝活性の変動を測定した。

ベンゾピレンの3位水酸化は、ドブガイ中腸腺において5~10月の測定期間中、その代謝活性は低く、明らかな変動は見られなかった (図20a)。テストステロンを基質としてドブガイ中腸腺の酵素活性を測定したところ、6β位の水酸化によって起こるテストステロン6β水酸化体及び17β位の水酸化によって起こるアンドロステンジオンが代謝物として検出できた (図20b) ラットにおいてテストステロンの6位水酸化はP4503Aサブファミリーが、17β位の水酸化はP4502C11

が行っている。どちらも性成熟したラットでは雄に特異的なステロイドの代謝経路である。17位水酸化は5~10月を通して大きな変化は見られないが、6位水酸化は8月に最も高い値を示している。テストステロンからアンドロステンジオンへの反応は可逆的であり、このことが5~10月を通して17位水酸化活性に変動がないように見える原因の一つと思われる。さらに、ラットにおいてテストステロン17位水酸化を担っているP4502C11は、薬物投与などによってほとんど酵素誘導を受けない。したがってドブガイでも、ラット同様、外来異物による酵素変動の起こらないP450サブファミリーがその代謝を行っている可能性も考えられる。一方、P4503Aは食餌性の変化によっても代謝活性が変

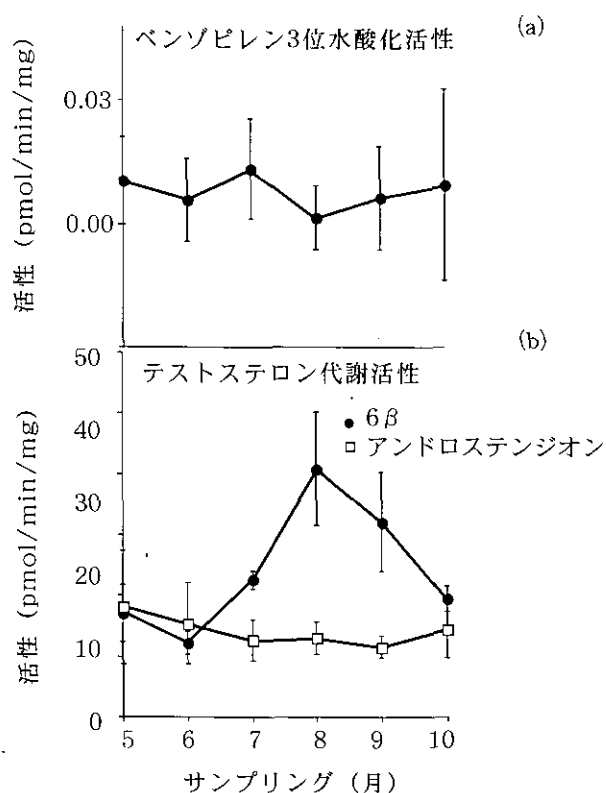


図20 河川水に暴露したドブガイにおけるシトクロムP450依存の代謝活性の変動 (縦棒は標準偏差(SD)を示す)

動することが報告されている。8月は水温が最も高く、餌となる植物性プランクトンも豊富であり、ドブガイの体重増加も著しい (図21)。6位水酸化体が増加した原因として、食餌性の変化や、成長に伴うテストステロンの増加が、6位水酸化を担うP450を誘導したのではないかと考えられる。したがって、ドブガイのP450に関しては農薬など環境汚染の影響よりもむしろ

食餌性の要因の方が酵素活性の変動に影響を与えることが示唆された。

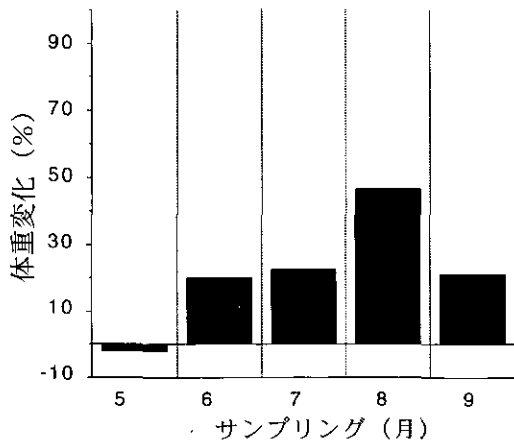


図21 河川水に暴露したドブガイにおける月ごとの体重変化(%)

#### コリンエステラーゼ

薬物代謝酵素の中でも、加水分解酵素は有機リン剤など多くの外来異物の活性化や解毒に関与している。コリンエステラーゼはコリンエステルや多くのエステル化合物を加水分解し、その活性はカーバメイト系殺虫剤や有機リン系殺虫剤によって阻害されることが *Elliptio complanata* や *Corbicula fluminea* の二枚貝で報告されている。そこで、今回ドブガイの中腸腺の可溶性細胞画分のコリンエステラーゼ活性を測定したが、5～10月を通して大きな変動は見られなかった(図22)。エステラーゼは近年、詳細な研究が行われるようになり、そのアイソザイムが明らかにされつつある。特に肝臓のエステラーゼは外来異物の代謝・排泄に大きく寄与しており、肝小胞体に局在するエステラーゼは薬物投与によって変動することが報告されている。今回はサイトソル画分を用いたために、酵素誘導に変動が見られなかった可能性も考えられ、神経組織のアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した場合や、小胞体画分のエステラーゼ活性を測定した場合は、有機リン剤などによるエステラーゼ活性の変動がより明らかになる可能性が考えられるが、今後の研究を待たねばならない。

#### GST

P450などによって酸化還元反応を受けた外来性物質

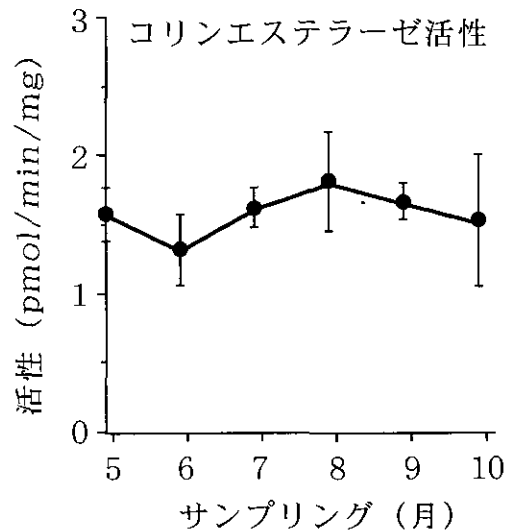


図22 河川水に暴露したドブガイにおけるコリンエステラーゼ依存の代謝活性の変動(縦棒は標準偏差(SD)を示す)

は、ついで抱合体に変換される。GSTは、農薬など環境汚染物質の抱合反応に関して重要な役目を果たしている。今回、ドブガイの中腸腺におけるGST活性について測定した。

クロロジニトロベンゼン(CDNB)を基質としたGST抱合活性は、5～10月を通して比べると、河川が最も農薬に汚染されている5月に高い値を示した(図23)。また、図には示していないが、ドブガイへの農薬(ブタクロールなど)投与実験により、農薬暴露によってGST活性が上昇することが確認された。したがって、今回観察されたドブガイのGST活性の上昇も、河川域の農薬汚染によって酵素誘導を受けた結果であ

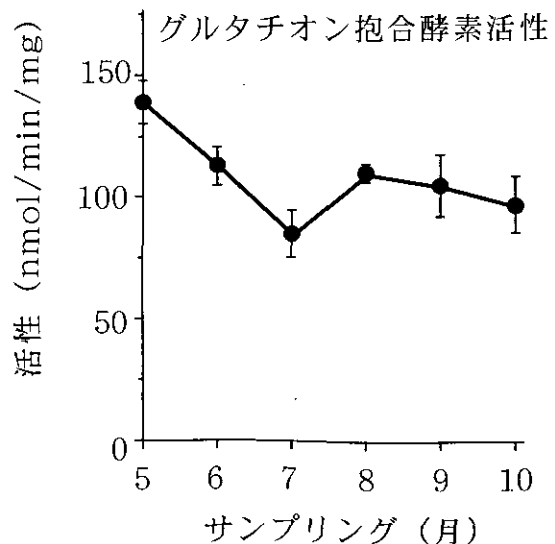


図23 河川水に暴露したドブガイにおけるグルタチオン抱合酵素依存の代謝活性の変動(縦棒は標準偏差(SD)を示す)

ることが考えられた。以上の結果から、環境汚染の指標酵素として、ドブガイのGSTの有用性が示唆された。

近年、環境汚染物質に対する水生生物の防御機構メカニズムとして、P450, GST, エステラーゼなどの種々の代謝酵素に関する報告が増えてきているものの、これらの生体防御に関する研究はほ乳類などに比べて著しく遅れている。今回の結果からドブガイなどの二枚貝類では環境汚染物質の代謝排泄にGSTが大きく寄与している可能性が考えられた。環境汚染に対して水生動物がどのような生体防御能を有するのかを調べることは、環境モニタリングのバイオマーカーの検索のみならず、生物がどのように環境汚染に適応していくか、汚染物質が生態に与える影響を考える上で非常に重要であると思われる。

### 2.1.6 魚類によるモニタリング

魚類は甲殻類、水生昆虫などの無脊椎動物よりも概して殺虫剤に耐性が高く、現在では数十年前のように毒性の高い農薬類により各地で魚が死亡するということはなくなった。しかし、低濃度・複合汚染の化学物質が魚の繁殖に及ぼす影響は、最近では内分泌攪乱物質の問題など、環境水に連続暴露して調べることは有効な手法と考えられる。調査河川の水域は、内分泌攪乱物質として挙げられている数種の農薬類で汚染されており、何らかの繁殖影響が予想された。試験魚としてはメダカ、ゼブラフィッシュを用いた。またバイオモニタリング施設付近から霞ヶ浦河口にかけての桜川でフナ、ブラックバス、ブルーギルなどを随時採集し、魚体中の農薬の動態を調べた。

#### (1) ヒメダカの産卵数に関する影響

バイオモニタリング施設内の流水式水槽（桜川河川水）内でヒメダカを飼育し、河川水中の化学物質がその生長や繁殖に及ぼす影響を評価する手法を検討した。対照水として、地下水を試みたが水質（異臭）、温度コントロールの面で問題（エネルギー費用）があり、今回は対照区をアクアトロンの地下水とした。5月始め、ふ化後一カ月のメダカを各160の2群に分け、一方はアクアトン、他は桜川施設の流水式水槽に入れ（36×30×12（水深）cm）、水温（22～24℃）、光（16L-8D）、餌など同様な条件とし、4カ月飼育し

た、その間、毎月30個体をサンプリングし生長（体長）を比較した結果を図24に示す。桜川では、すでに1カ月後（6月）から、体長が対照の78%程度に生長が抑制され、その後は常に同程度の遅れで追従した。生長の遅れが性成熟の遅れをもたらし、自然界での繁殖時期とズレが生じないか、どうかなど今後の検討課題である。

一方、アクアトン内であらかじめメダカの雌雄6対の産卵数を2カ月間調べておき、そのうちの3対を、7月10日に桜川バイオモニタリング施設の水槽（河川水連続暴露）に移動させ、引き続き産卵数を1カ月半対照（アクアトン内）と比較した。水槽（流水式）、水温、照明、餌条件などを対照とほぼ同様にコントロールした（図25）。桜川施設に移動前の、雌雄3対の累積産卵数の平均値はほとんど同じであった。その後、桜川河川水に暴露した3対の平均産卵数は、対照と比較し約半月間低いレベルにとどまった。累積産卵数は、その後7月末から8月上旬にかけ回復の傾向を示したが、8月中旬から再び低下の傾向を示した（図25）。ヌカエビ試験によれば、8月前半に河川水の毒性は高めに推移したが、メダカの産卵数はむしろその時期を過ぎた8月中旬から低下の傾向を示した。8月初旬に、本施設付近の河川で採取された魚体（筋肉）中には、水中の農薬類が急速に蓄積していた（後記）。河川水に暴露されたメダカは、その原因物質は不明だが、生長速度や産卵数に鋭敏に影響を受けることがわかった。今後はバイオモニタリング施設を利用した1世代にわたる繁殖影響、それらの原因物質の解明など、さらに長期間の詳細な試験が必要と考えられる。

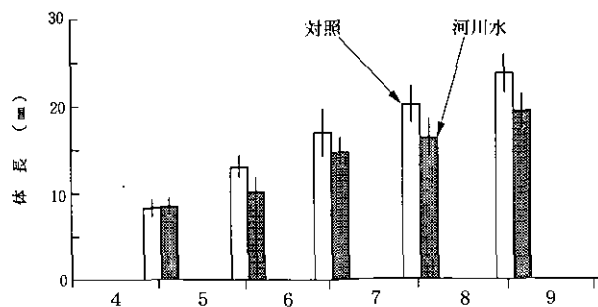


図24 桜川バイオモニタリング施設内で河川水に連続暴露したメダカの生長 (mean±S.D., n=30)  
対照は、アクアトロンの地下水。

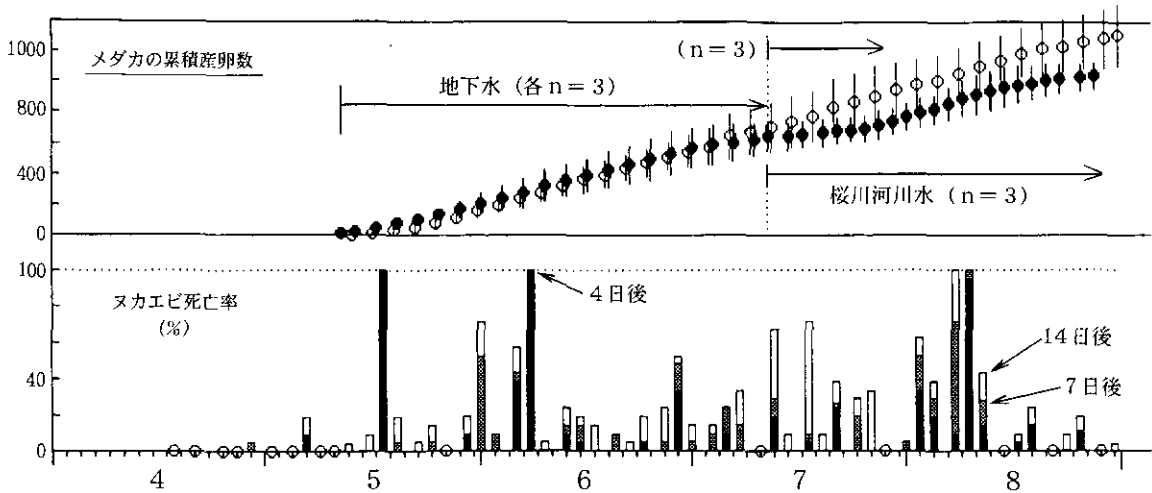


図25 桜川河川水に連続暴露したメダカの累積産卵数の変化、及び河川水サンプル中でのヌカエビ死亡率による河川水の毒性

(2) ゼブラフィッシュの繁殖に及ぼす影響

淡水魚類の一種ゼブラフィッシュの河川水長期暴露試験を実施した。ゼブラフィッシュは OECD の生態影響試験法において、魚類急性毒性試験、魚類延長毒性試験および魚類初期生活段階毒性試験の試験生物として用いられている。

1997年4月から10月にかけて桜川の河川水を常時オーバーフローさせた流水式水槽に雌20尾、雄20尾を別々に飼育し、1カ月に一度、魚をアクアトロンに持ち帰り、アクアトロン室内で地下水にて飼育しているゼブラフィッシュ雄雌とそれぞれ交配させた。対照区としてアクアトロン室内飼育の雄雌の交配も同時に行

った。交配は地下水の入った実験水槽に雌5尾と雄5尾を入れて行った。ゼブラフィッシュの交配・産卵は午前中、明期の始まりとともに行われる。タイマーでセットした照明装置が点灯してから3時間経過した時点で、卵を回収し、卵数を計測し、人工軟水の入ったプラスチックシャーレに移して25℃16Lのインキュベータで発生・ふ化を観察した。観察期間は毎日飼育水を交換し、餌は与えなかった。採卵後7日目まで稚魚のふ化率および奇形の有無を観察した。交配に使用した魚は再び桜川の流水式水槽に戻して飼育を続けた。

図26は各交配における1雌あたりの産卵数の変化を示し、図27は各交配で得られた卵のふ化率を示す。桜

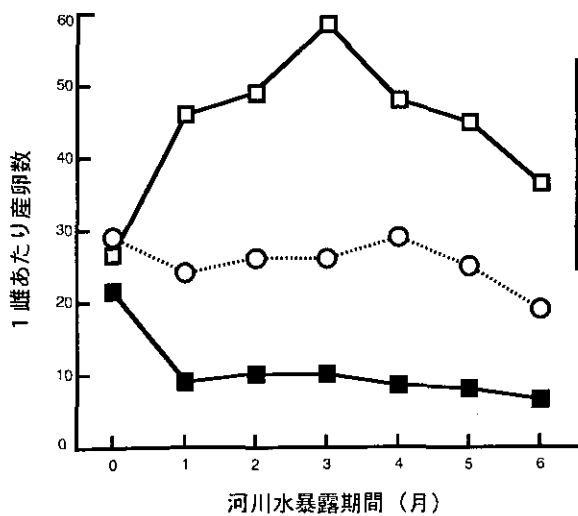


図26 ゼブラの産卵数に及ぼす河川水長期暴露の影響  
 —□— 桜川♀ × 対照♂  
 ---○--- 対照♀ × 対照♂  
 —■— 対照♀ × 桜川♂  
 桜川：河川水暴露個体，対照：研究所地下水で飼育

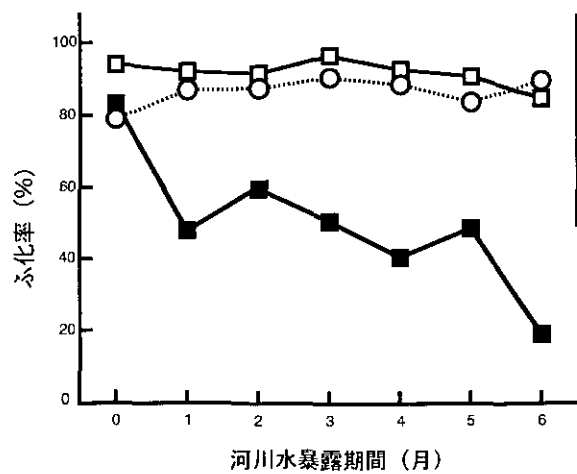


図27 ゼブラのふ化率に及ぼす河川水長期暴露の影響  
 —□— 桜川♀ × 対照♂  
 ---○--- 対照♀ × 対照♂  
 —■— 対照♀ × 桜川♂  
 桜川：河川水暴露個体，対照：研究所地下水で飼育

川の水槽に入れた直後に回収した魚は雌雄とも、室内飼育の雌雄と交配し、ほぼ同数の卵が生まれた。しかし、試験開始1カ月後から河川水で飼育している雄の生殖能力が低下し、アクアトロン室内飼育の雌（対照）との間で交配させても産卵数は低く、ふ化率も低くなった。一方、河川水で飼育している雌は逆に生殖能力が向上し、室内飼育の雄と交配させると、室内飼育の雌雄どうしの交配に比べて倍の産卵数が得られ、ふ化率も高くなった。これらの傾向はその後の交配試験でも変わらなかった。ふ化した稚魚はいずれも奇形は認められず正常に発育した。

本研究の結果より、桜川の河川水中にはゼブラフィッシュの雄の生殖能力に悪影響を及ぼし、逆に雌の生殖能力を増加させる物質が含まれていることが示唆された。この現象を見る限り、河川水中に何らかの内分泌攪乱物質が存在していた可能性が高い。英国において雄のニジマスに雌で合成されるはずのビテロジェニンが検出されるなどの報告がなされているが、野外における生殖機能異常の原因を追究するためには、長期的な再現実験が不可欠である。本研究では河川水長期暴露によるゼブラフィッシュの生殖能力の変化をモニターすることで、河川水中の内分泌攪乱物質の存在とその影響を示唆する結果が得られた。

内分泌攪乱物質の魚類への繁殖影響を評価する上で、水温や光など魚の繁殖に及ぼす条件をコントロールし、メダカやゼブラフィッシュなどの試験魚を環境水に連続暴露する手法はきわめて有効であると考えられる。今後は、河川水中に含まれる物質を分析し、魚類の繁殖能力に対する各物質の単独および複合効果を室内実験によって確認する必要がある。このような実験には、水槽を並べた対照区が望まれるが、本実験では離れたアクアトロン施設に依存した。施設・メンテナンス費用などで、可能であれば、河川水、あるいは上水の活性炭ろ過水、地下水などが対照水供給源として考えられる。

### (3) 魚体中の農薬類濃度の変動

バイオモニタリング施設内で、魚類を河川水に連続暴露し生長・繁殖への影響が見られた。それらの原因物質を明らかにする目的で、環境中及び魚体中での農薬類の変動を調べることにした。調査は桜川のバイオモニタリング施設付近から霞ヶ浦河口にかけ、1997年

4月末から8月中旬まで行い、採水は2週間に1回数地点で、魚類の採取は、5月から8月にかけ随時行った。分析に供した魚類サンプルはフナ22尾、ブルーギル47尾、ブラックバス26尾で合計95サンプルであったが、魚種によって捕獲できた時期に違いがあった。5月、6月は主としてフナが採集され、7月、8月にはブルーギル、ブラックバスであった。

農薬の分析は、水中からは固相抽出法、魚の筋肉からは超臨界抽出法を用いて農薬の分離濃縮を行った後、ガスクロマト質量分析器 (GC/MS) により行った。分析した全農薬72種中、水中からは32種、魚体からは19種が検出された。それらのうちアトラジン、チオベンカーブ、プロモブチド、エスプロカルブ、フェノブカルブ、イソプロチオラン、メフェナセット、モリネート、オキサジアゾン、プレチラクロール、プロボキシル、シマジン、シメトリンの13種が定量分析できた。これに加え、カルボフランとペンタクロロフェノールが、マススペクトルにより同定された。

春に採取された魚体（筋肉）中からは、その時期に使用された多くの農薬類が検出された。表4に5月と6月に桜川下流域で捕獲されたフナの筋肉中で検出された19種類の農薬濃度を示す。筋肉中も様々な農薬類

表4 桜川下流域で採取されたフナ筋肉中から検出された農薬類 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾重)

物質名	5/21	6/12	6/27
Dichlobenil	1.07	0.82	0.57
Molinate	100.17	17.66	8.87
Isoprocarb	nd	0.72	nd
Fenobucarb	nd	3.21	nd
Propoxur	4.60	22.23	8.62
Iprobenfos	14.32	nd	60.25
Bromobutide	63.26	83.01	55.29
Simetryne	6.37	8.60	8.90
Esprocarb	255.61	44.51	nd
Benthiocarb	66.88	nd	nd
Fthalide	0.01	nd	13.10
Dimepiperate	374.94	9.67	nd
CVMP	nd	nd	0.90
Napropamide	nd	nd	4.61
Flutolanil	23.12	nd	nd
Isoprothiolane	31.20	35.50	nd
Oxadiazon	32.73	9.97	14.18
Bifenox	69.71	nd	nd
Mefenacet	736.16	136.61	87.28

フナは1997年5月21日から6月27日にかけて桜川下流域（河口から4km上流）で採取された。

nd 検出限界以下

表5 桜川における魚体中の農薬濃度の変化 (µg/kg)

魚種	農薬名			7/8	7/23	7/29	7/30	8/02	8/04
ブラックバス	空中散布 農薬*	殺虫剤	フェノブカルブ	1.07	nd	-	5.77	6.20	0.92
			マラオキソン	nd	nd	-	4.76	65.17	4.99
		殺菌剤	フサライド	4.04	nd	-	nd	7.63	nd
			ペンシクロン	nd	nd	-	19.76	nd	nd
	非空中 散布	殺菌剤	イプロベンホス	19.10	4.14	-	9.77	2.84	3.73
			イソプロチオラン	21.10	4.33	-	14.05	35.36	15.08
		除草剤	モリネート	9.01	5.03	-	6.26	10.21	7.57
			オキサジアゾン	2.19	1.61	-	2.12	5.22	1.94
(サンプル個体数)			9	3	0	3	2	4	
ブルーギル	空中散布 農薬*	殺虫剤	フェノブカルブ	nd	0.64	45.50	-	-	1.78
			マラオキソン	nd	nd	nd	-	-	nd
		殺菌剤	フサライド	nd	3.01	51.59	-	-	2.85
			ペンシクロン	nd	nd	79.14	-	-	26.75
	非空中 散布	殺菌剤	イプロベンホス	6.04	6.39	5.03	-	-	4.83
			イソプロチオラン	8.43	14.36	6.46	-	-	16.39
		除草剤	モリネート	7.09	5.77	7.04	-	-	6.66
			オキサジアゾン	nd	1.24	1.80	-	-	1.52
(サンプル個体数)			10	10	2	0	0	4	

\*7月28日から30日までに桜川中流域においてヘリコプターを使って空中散布された農薬種。  
非空中散布(薬剤)は、空中散布は行われなかったが河川水中でも検出された農薬(一部)

で汚染されており、肝臓など他の部位ではより高濃度の薬剤で汚染されていたものと考えられる。

#### 空中散布時期の魚体中の濃度変化

農薬の空中散布は、7月28日(1997年)の早朝から桜川中流域において行われた。魚の採取は、散布時期の29、30日と終了後の8月2、4日に空中散布地域より下流の河口より4~5 km地点から河口にかけて行った。採取された魚種は、ブラックバスおよびブルーギルであった。空中散布された農薬は、殺虫剤のフェノブカルブ、マラチオン、殺菌剤のフサライドおよびペンシクロンであった。フェノブカルブ、フサライド、ペンシクロンの3種の農薬は、散布翌日に採取されたブルーギルからすでに高い濃度で検出されており、散布された農薬が魚体に速やかに移行したのと考えられ、特にペンシクロンはこの時期以外では検出されず、空中散布によるものであろう。これらの農薬はブラックバスでも7月30日には高い値を記録し、いずれも散布1週間後の8月4日には低くなる傾向があった。一方、マラチオンは、水中や魚体中で速やかにマラオキソンに変化するため、水中、魚体中のいずれからも検出されず、オクソン体になったマラオキソンがブラックバスから検出された。マラオキシンの濃度ピークは散布5日後の8月2日であるが、ブルーギルからは

検出されず魚種によって異なる挙動を示した(表5)。表には空中散布では使用されなかった4種類の農薬濃度を示したが、これらの農薬(イソプロチオランとモリネート)は調査の全期間(5~8月)常に検出され、その濃度の変動は少なかった。

このように魚体中の農薬濃度は基本的には、河川水中の濃度に依存しており、水中から魚類は農薬類を速やかに吸収し、水中濃度の低下後物質によっては魚体内から速やかに排出されることが示唆された。フェノブカルブが5日後には急速に濃度を低下させるのに対し、ブルーギル中のペンシクロンのように同期間に1/3の濃度減少にとどまり、物質により魚体内での挙動に差があることが示された。バイオモニタリング施設周辺で採集された魚体中には多くの農薬類が蓄積していた。バイオモニタリング施設内で、試験魚の生長や繁殖に障害が認められたが、これらの農薬類の複合的汚染が、試験魚にいかなる影響を及ぼしていたかは今後の検討課題である。

#### 2.2 生態影響評価に関する研究

前節では、試験生物を河川水に連続暴露したバイオモニタリング手法を試みた。ここでは生物側の制限などから連続暴露ができないもの、あるいは広域的な生態影響評価のため、連続暴露に適さない調査・試験結



果などを取り扱っている。水中の化学物質の多くは、底質に移行し蓄積するため底生生物に対する影響が危惧されているが、国内ではそのような生態影響試験例がほとんど皆無であった。実際の汚染底質を用いた生物試験を実施したが、ここではユスリカの結果を報告する。環境試料（水、底質）を用いた生物試験、あるいはそれと平行して実施した生物調査の結果などから、化学物質の生態影響を評価した結果について報告する。

### 2.2.1 藻類/群集レベルの除草剤耐性変化

実際の自然環境で藻類群集がどれくらい除草剤の影響を受けているかは、それぞれの場所に生息している藻類の種や遺伝的組成によって異なる。しかしながらそれぞれの群集に及ぼされる影響を個々に調べるためには多大な時間と経費を必要とし、汎用化した評価法を探る必要がある。本研究では、藻類が実際に除草剤にさらされる河川や水田から様々な藻類を分離し、それらの除草剤感受性と現場の除草剤濃度を比較検討することによって、藻類群集に対する除草剤の影響がどの程度なのかを推定した。有害物質に藻類群集がさらされた場合、暴露量が藻類群集の許容量を超えたとき、その物質に対する群集としての耐性が増加することがいくつかの化学物質で調べられている。この原理を参考にしながら、より感度を上げるために、群集をひとまとめにした測定法ではなく個々の藻類の感受性に着目した方法を用いた。

まず、実験水田に高い濃度の除草剤を投与し、除草

剤耐性の誘起が容易に起こる条件での除草剤暴露と除草剤耐性の関係について、次に個々の除草剤は低濃度だが、様々な除草剤が混入し、複合的には比較的大きな影響を藻類群集に長期間にわたって及ぼすと考えられる中河川、および水田地帯の集水域の小さい小河川の結果を示し、最後に実際の除草剤影響の評価を試みた。

#### (1) 実験水田における除草剤耐性の発達

国立環境研究所構内にある実験水田（各  $8\text{ m}^2$ ）に、田植え後、除草剤ギーボン（主成分：シメトリン）あるいはソルネット（主成分：プレチラクロール）をそれぞれ使用法に示された適用量投与した。水田水中の除草剤濃度は投与直後に最大になり、その後、1週間後に水田水を入れ替えるまで徐々に減少した（図28）。

投与後7、27、48日後にそれぞれの処理水田から主要な藻類を分離し、単藻培養を行った。これらの藻類に対して、水田に投与した除草剤の主成分であるシメトリンとプレチラクロールを用いた増殖阻害試験を行い、それぞれの藻類の除草剤耐性を調べた。試験に供したのは、珪藻では *Nitzschia palea*, *N. fonticola*, *Achnanthes* spp, *Navicula* spp などの11種 56株、緑藻では *Chlorella* spp, *Monoraphidium* spp, *Scenedesmus* spp, *Raphidosphaera minuta* などの24種87株である。除草剤投与後の日数にかかわらず除草剤耐性の発達が見られたので、珪藻と緑藻の分類群ごとに試験結果を分け、その平均値を図29と図30に示した。珪藻は無処理水田から分離した株でも両方の除草剤に対して高い除草剤

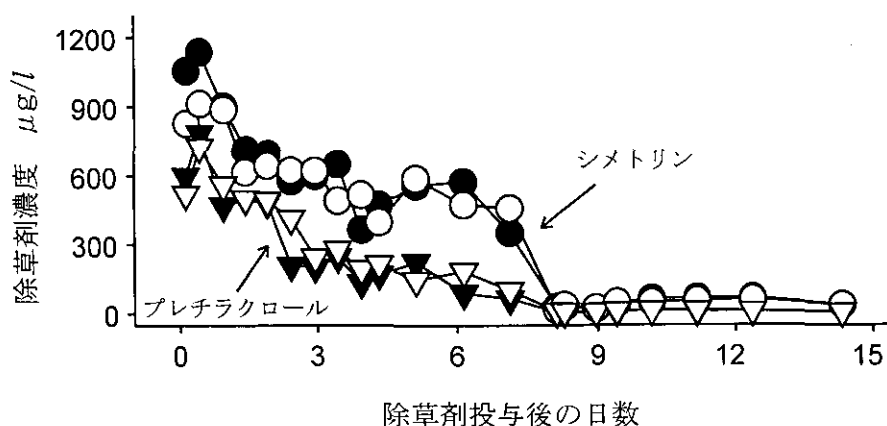


図28 実験水田の水中除草剤濃度の変化。田植え後2週間目に、 $8\text{ m}^2$ の実験水田各々2面に除草剤ギーボン48gとソルネット24gをまいた。一週間後に水田水を入れ替えるまで止水にした。

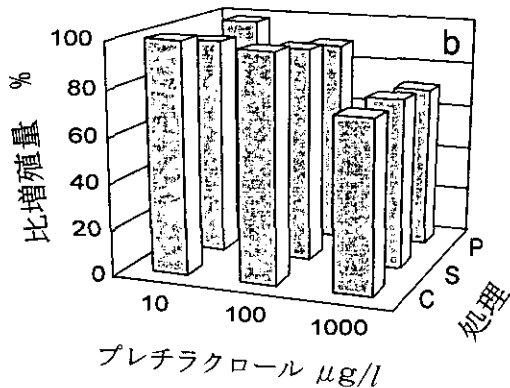
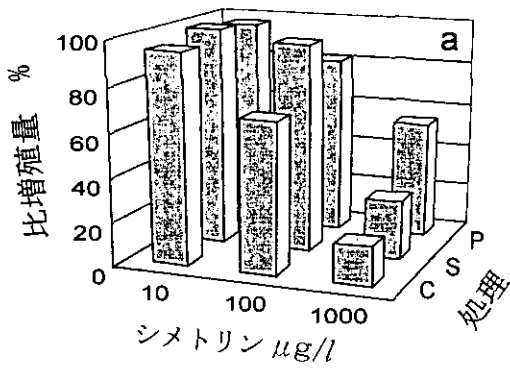


図29 各処理水田から分離した珪藻を10, 100, 1000 mg/l の a, シメトリンと b, プレチラクロール中で7日間培養した時の増殖量  
比増殖量は除草剤なしのコントロールと比較して何%増殖したかを示している。C, 無処理水田, S, シメトリン処理水田, P, プレチラクロール処理水田から分離した株。それぞれのバーは試験した株の平均値。

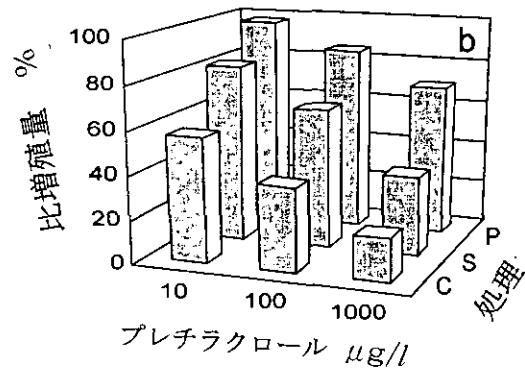
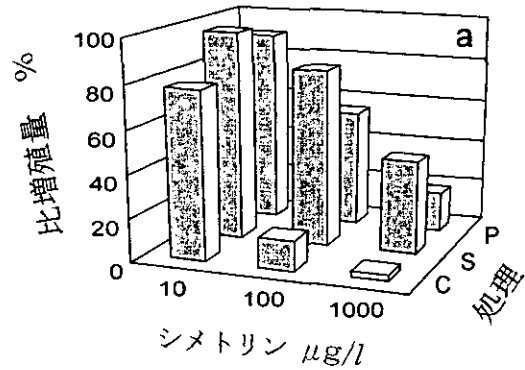


図30 各処理水田から分離した緑藻を10, 100, 1000 µg/l の a, シメトリンと b, プレチラクロール中で7日間培養した時の増殖量  
説明は図29と同じ。

耐性を示した (図29 a, b)。一方、緑藻は無処理水田から分離した株は除草剤に対して高い感受性を示し、シメトリン処理水田から分離した株はシメトリンに、プレチラクロール処理水田から分離した株はプレチラクロールに耐性を示した (図30 a, b)。また、処理した除草剤ではない方の除草剤にも無処理水田から分離した株より高い耐性を示した。

このように、緑藻は比較的高い除草剤投与によって除草剤耐性を発達させることがわかった。また、珪藻は高濃度の除草剤暴露によって、より高い耐性系統へのシフトが示唆されたが、除草剤シメトリンとプレチラクロールにはもともと強いことがわかった。

(2) 水田地帯を流れる中河川の藻類群集に及ぼす影響  
茨城県南部を流れる小貝川は、比較的広範囲の水田の流出水が流れ込む中河川で、田植え時期の5月上旬

から6月中旬にかけて、河川水中の様々な除草剤がセレナストルムの増殖を著しく阻害することが報告されている。この河川水を導入した人工河川から、除草剤投与時期前、投与中、投与後のそれぞれの時期に分離した藻類の除草剤感受性を比較した。この時期に検出された主要な除草剤はプレチラクロール、シメトリンとブタクロールであった (図31a)。ブタクロールはプレチラクロールとほぼ同様の構造を持つため、前者2除草剤に対する感受性を調べ、EC<sub>50</sub>値 (増殖量を50%阻害する濃度) で表した。プレチラクロールについては、珪藻や一部の緑藻がどの時期に分離しても非常に高い耐性を示したため、それらの値を除き、感受性の高かった株についてのみ示した。試験に供した藻類は、シメトリンについては珪藻8種22株 (*Melosira varians*, *Cyclotella meneghiniana*, *Aulacosira ambigua*, *A. granulata* など)、緑藻10属51株 (*Scenedesmus* spp, *Monoraphidium*

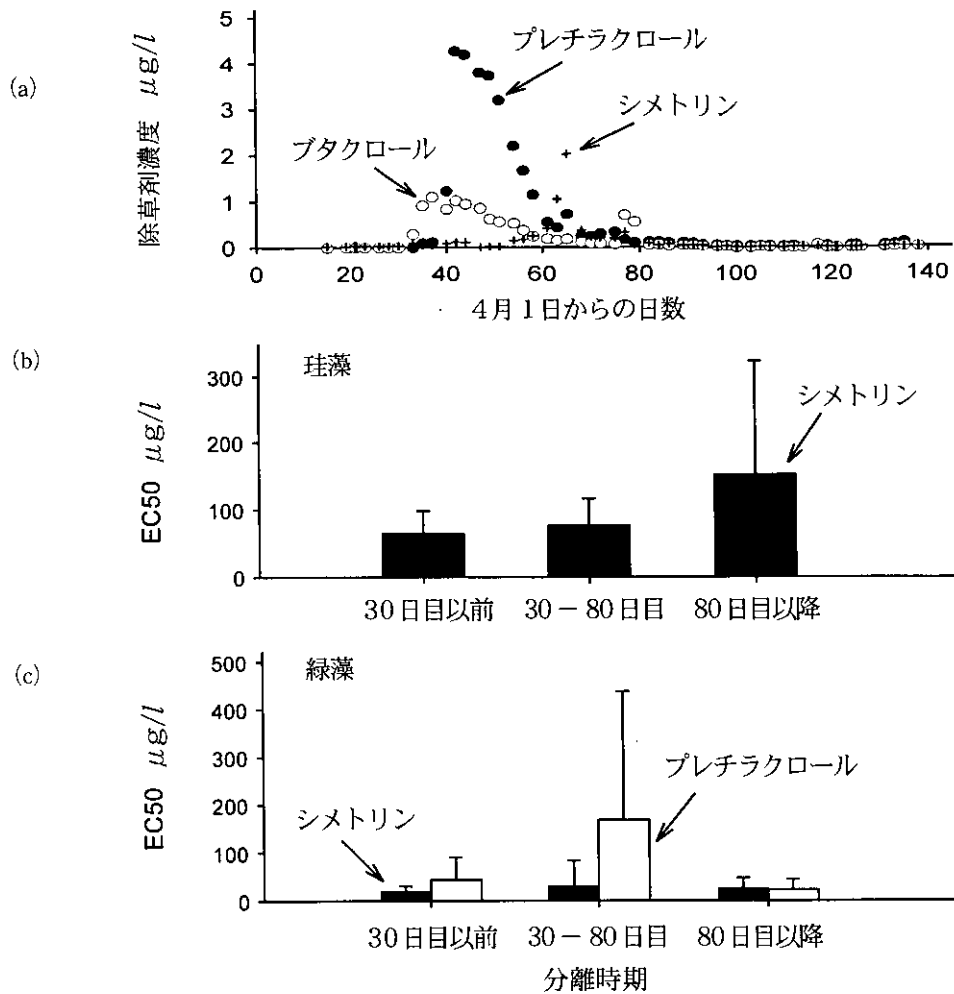


図31 小貝川の河川水中の主な除草剤濃度の変化 (a) と様々な時期に分離した藻類の除草剤感受性 (EC<sub>50</sub> 値: 増殖を除草剤なしのコントロールに比べて50%阻害する除草剤濃度), 除草剤散布前, 散布中および散布後に分離された珪藻 (b) と緑藻 (c) のEC<sub>50</sub> 値の変化  
 それぞれのバーは分離された株の平均値と標準偏差を示す。珪藻はプレチラクロールに耐性のためシメトリンに対する値だけを示した。緑藻は両方の値を示したが、プレチラクロールに耐性の株は除いた。

spp, *Dictyosphaerium* spp, *Chlamydomonas* spp, *Pandorina* sppなど), プレチラクロールについては珪藻18株, 緑藻33株である。

珪藻は除草剤投与時期後にシメトリンに対するEC<sub>50</sub> 値を増した (図31b)。これは耐性が増したことを意味するが, 河川水中のシメトリン濃度は非常に低く, シメトリン耐性の増加が河川水中のシメトリン濃度の増加に伴ったものではなく, むしろプレチラクロールの増加に伴った現象と考えられた。緑藻では除草剤散布時期にプレチラクロール耐性が上昇した (図31c)。これらの結果から, 小貝川では非常に感受性の高い種類, 例えば一部の緑藻がプレチラクロールの影響を受け, 普段は抑制されている耐性種または耐性系統へ置換したものと考えられた。

(3) 集水域の狭い小河川の藻類群集におよぼす影響  
 恋瀬川水系の小桜川と川又川も, 小貝川ほどではないが水田に散布される除草剤で汚染された。検出された主要な除草剤はメフェナセットとプレチラクロールであり最高濃度はそれぞれ, 8と2 mg/lを示した (図32)。これらの河川に設置した人工基物 (タイル) から様々な時期に藻類を分離し, 上記と同様に除草剤感受性の変化を調べた。試験に供した藻類は, 珪藻42株 (*Nitzschia* spp, *Synedra* spp, *Cyclotella* sppなど), 緑藻41株 (*Chlamydomonas* spp, *Pandorina morum*, *Actinastrum* sp., *Pediastrum duplex*, *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sppなど) である。ここでも, 珪藻はどの時期に分離しても高いプレチラクロール耐性を示した (図33a)。緑藻は除草剤流入時期およびその後100

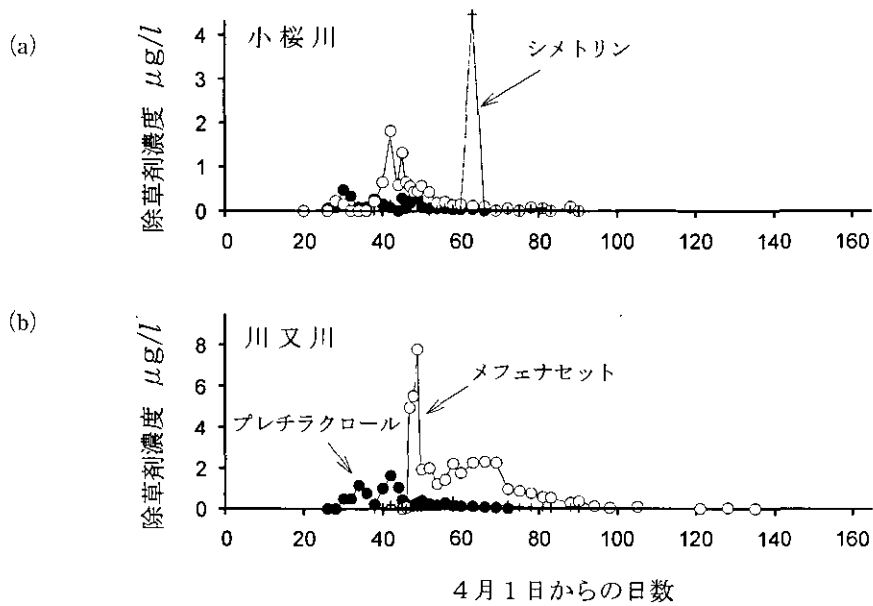


図32 集水域の小さい小河水中の主要な除草剤濃度の変化

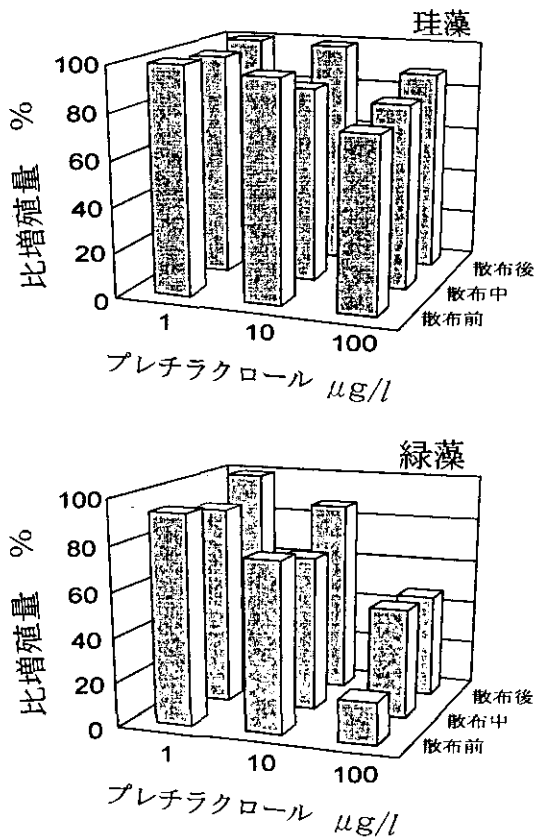


図33 除草剤散布前、散布中、散布後に河川から分離した珪藻(上)と緑藻(下)を1, 10, 100 µg/lのプレチラクロール中で7日間培養した時の増殖量。比増殖量は除草剤なしのコントロールと比較して何%増殖したかを示している。それぞれのバーは試験した株の平均値。

mg/l 中での比増殖量の増加に見られるようにプレチラクロール耐性の増加を示した(図33b)。プレチラクロールのセレナストルムに対する毒性は強く( $EC_{50}$ 値,  $0.94 \mu\text{g/l}$ ),  $1 \mu\text{g/l}$ 前後のプレチラクロール濃度が2週間程度続き、藻類群内で耐性種、あるいは耐性系統への置換が生じたものと考えられる。また、メフェナセットは検出された最高濃度以上の $10 \mu\text{g/l}$ でも分離されたほとんど全部の緑藻の増殖が阻害されなかった。メフェナセットはセレナストルムの増殖阻害試験でも毒性が非常に低いことが報告されている( $EC_{50}$ 値,  $55 \mu\text{g/l}$ )。これらの結果から、狭い集水域から比較的短期間に除草剤が流入する小河川でも緑藻はプレチラクロールの影響を受けて、より耐性のある種、あるいは系統に置換したことが示された。

(4) 除草剤の影響評価に対する考え方と提言

藻類群集に対する除草剤の影響を考える場合、①藻類種間の除草剤感受性の違い(種間差)、②ある藻類種内の除草剤感受性の違い(系統間差)、③生息場による優占種の違い、④混入した除草剤の特性、といった要素を考慮しなければならない。さらに⑤現場の藻類相がどのように維持されているか(どのように遷移するか、どこから供給されているかなど)、⑥上位の栄養段階の生物にどのように利用されているかといっ

たことも、まさしく生態影響評価には必要である。⑤、⑥の問題はこれからの問題として、①から④についてはこれまでの研究成果からある程度の子測や一般化が可能であろう。まず、水田のように除草剤が直接まかれ、一時的ではあるが除草剤濃度が非常に高くなる場所では、藻類群集構成種のほとんどは耐性種か、耐性系統に置換し、藻類群集の耐性を獲得することがわかった。

このとき、耐性は発達するが、同時に一時的に著しい現存量の低下も起こるのであろう。藻類を餌とする生物への除草剤の移行や餌不足などが起こる可能性もある。また、水田で除草剤耐性を発達させた藻類が河川に流出したとき、他の藻類にどのような影響を与えるのかを知ることも今後の研究課題である。除草剤が直接流入する河川では、除草剤は著しく希釈され、最早すべての藻類に影響を与えるほどではない。通常、河川で優占するのは珪藻、藍藻、緑藻である。調査時点で河川水中に検出された除草剤のうち、濃度と藻類増殖への影響などから最も主要な薬剤はプレチラクロールであった。

プレチラクロールは、セテナストルムのような緑藻には高い毒性を示すが、試験を行ったほとんどの珪藻や藍藻と、緑藻でも厚い細胞壁やゼラチン質を細胞の周囲に持った一部の種には全く効かないという特徴を持っていた。したがって、感受性の高い緑藻類には大きな影響が及んだ可能性が高いが、河川全体の藻類群集に対してあまり影響を与えなかったと考えられる。

除草剤が周辺の水田にまかれた短期間のみ、除草剤濃度が上昇する小河川でも除草剤耐性のわずかな増加が見られたことは、かなり集水域の小さな河川でも除草剤影響のポテンシャルがあることを示した。

これらの結果から、特に、今回の調査で主要な除草剤であったプレチラクロールのように特殊な働きをする除草剤に対しては、セテナストルム試験のように緑藻1種のみでの試験結果だけでは、除草剤影響を過大評価する可能性がある。そのため、除草剤の藻類群集に対する影響評価では、セテナストルムに加えて、河川に生息する珪藻と藍藻を試験生物として加えた標準的増殖阻害試験と、主たる優占種が珪藻、藍藻、あるいは緑藻なのかなど生物調査の基づいた基礎的なデータから、藻類群集に及ぼす除草剤の影響評価がある程度可能であると考えられる。さらに除草剤の一部は、

年ごとに異なった種類のもが使われるため、河川水の分析によってどのような除草剤が主要な毒性になっているのかを調べることも必須である。またこの際、各除草剤が特定のグループの藻類に特徴的な毒性を示すかどうか、緑藻、珪藻、藍藻からなる標準的試験生物を用いた影響評価が必要である。

## 2.2.2 ミジンコ

藻類を摂取する一次消費者にあたる試験生物としては、動物プランクトンであるワムシ類・ミジンコ類、底生生物ではカゲロウ類、貝類、ユスリカ類などがその代表例であろう。バイオモニタリング施設が、霞ヶ浦水系の桜川河口域ということから、動物プランクトンのミジンコをバイオモニタリングの試験生物として選択することとした。長期のバイオモニタリングには、試験生物を環境水（河川水、湖水など）に連続的に暴露することが望ましいが、動物プランクトンを環境水に連続暴露し、繁殖に及ぼす影響を定量的に評価することは技術的に難しい。環境水中の植物プランクトン量の変動し、動物プランクトンの餌量の変動すること（産仔数に影響）と、餌の定量的な給餌、動物プランクトンの子供の流出防止ネットが藻類付着や増水時の懸濁粒子などにより詰まり、試験系を維持することがほとんど不可能なためである。

### (1) 試験生物と試験法

本試験では河川水サンプルを0.45 mm のガラスフィルターでろ過して水中の藻類を除去し、クロレラ（単細胞緑藻）を定量添加してミジンコの繁殖試験を実施することとした。試験に用いた種類は、霞ヶ浦の優占種としてのカプトミジンコ (*Daphnia galeata*) 試験生物としてオオミジンコについて使用される頻度の高いミジンコ (*Daphnia pulex*) の2種類である。いずれも、生後24時間以内の個体を100mlの河川水中で個別に暴露し (n = 10)、ろ過した河川水にクロレラを約  $1 \times 10^6$  cells/ml の密度で与え、2週間の産仔数を記録した。河川水は、月（試験開始）・水・金曜日にその日に採水したものに交換し、2週間後に終了した。その間に子供を数回算出するため、試験容器を毎日観察し、産仔数を記録した。桜川定点（バイオモニタリング施設）のほか、これまでの調査（1989～1993年）、ヌカエビ試験で最も高い毒性を示した小貝川（全長、約110

km, 利根川支流) の下流域定点から採水して, ミジンコ繁殖に対する河川水の毒性をモニタリングした(図34)。河川水に対する対照は, 温室内で暴気により脱塩素した上水(霞ヶ浦由来)とした。両河川では週1回の頻度で試験を実施したが, 本報告書では他に住宅地・水田地帯を流下する花室川の河川水を含めた3河川の河川水サンプルを比較した試験結果を積算産仔数として示す(1997年, 6/2, 7/28, 9/29 採水サンプルの場合)。

(2) 河川水サンプル中でのミジンコ死亡・繁殖阻害  
ミジンコの方が影響を強く受け, 小貝川の河川水サンプルでは6月, 7月, 花室川と桜川のサンプルで7月に親自体が死亡し, 産仔数はゼロとなった。カプトミジンコの場合, 親が死亡したのは小貝川の6月のサンプルのみであったが, 花室川の7月のサンプルでは, 産仔数が対照の半数以下に減少した。間欠的ではあるが, 動物プランクトンも農業汚染時期には致死性的, あるいは繁殖に有意な影響を受けており, 春はさらに餌となる藻類量の減少やその汚染(食物連鎖による影響)も関与する可能性がある。

今回は2種類のミジンコで生物試験を実施したが, 4種殺虫剤に対する8種ミジンコの急性毒性試験を実施した結果, それぞれの薬剤に感受性の差が大きく

表6 8種ミジンコ(生後24時間以内)の4種殺虫剤に対する感受性の種間差(死亡;顕微鏡観察により触角など律動運動が失われた瀕死状態も含む)

	MEP	MPP	BPMC	Ethofenprox
<i>D. magna</i>	91.7	76.8	47.2	21.0
<i>M. macrocopa</i>	54.6	93.7	100.7	188.9
<i>M. micrura</i>	50.5	25.7	124.7	29.6
<i>D. ambigua</i>	8.2	253.0	4.0	3.7
<i>D. similis</i>	16.3	180.2	16.3	21.2
<i>D. pulex</i>	11.5	32.1	16.3	29.2
<i>D. galeata</i>	5.5	1.5	13.8	22.2
<i>C. dubia</i>	6.9	2.0	5.4	153.9
<i>C. reticulata</i>	14.4	35.0	8.3	26.7

MEP(フェントロチオン), MPP(フェンチオン)  
BPMC(フェノブカルブ)

(表6), 殺虫剤の生態影響評価には, できるだけ様々な生物種を用いた生物試験が必要と考えられる。

### 2.2.3 ヌカエビ・ヨコエビ

#### (1) ヌカエビ・ヨコエビ広域調査

これまでは, 特定河川の定点(桜川バイオモニタリング施設)におけるヌカエビ毒性の変化を詳細に試験したが, 河川水の毒性が河川全域にいか分布するかを生物試験により調べた。小貝川(全長, 110 km)の上流から下流定点(利根川合流前, 約4 km)までの94 km間に16定点(図35, 地点5, 地点16は支流; 後者

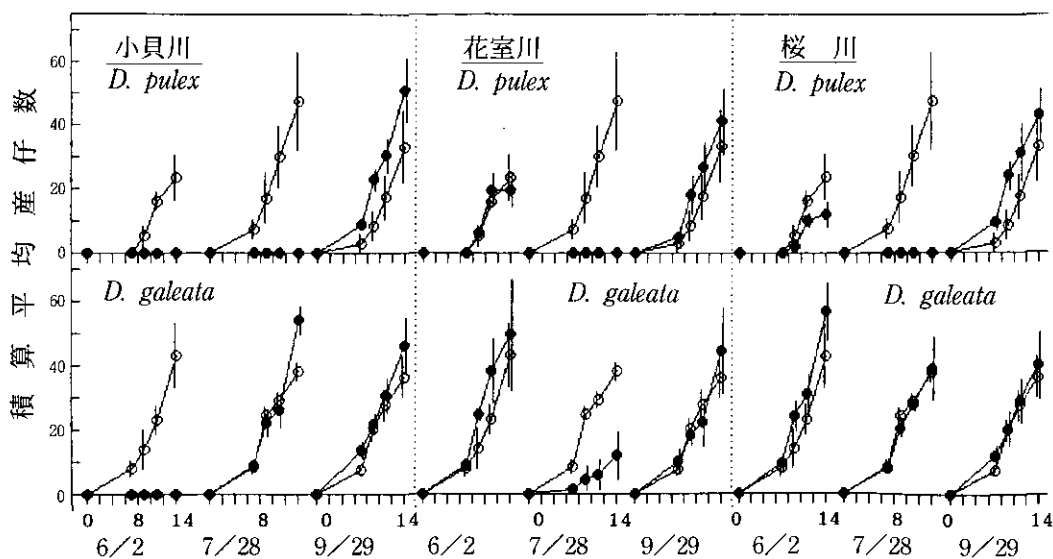


図34 河川水サンプル(桜川, 花室川, 小貝川)中におけるミジンコ(*D. pulex*), カプトミジンコ(*D. galeata*)の産仔数の変化(河川水とろ過後, 餌としてクロレラを給餌, 試験開始時のミジンコ; 生後24h以内)

は牛久沼から流下)を設けた(採水地点間の距離は、最大、最小がそれぞれ、4.0, 7.5 km)。採水日は、1997年6月10日、7月1日、8月2日とし、採水日から河川水に暴露を開始した。

ヌカエビは、前記の河川水サンプルの試験法と同様である。ヨコエビ (*Hyalella azteca*, 国外種) は、人工環境室 (22 ± 1 °C, 16L-8D) 内で、枯葉 (カエデ) と魚の人工飼料 (日本配合飼料, クランプル-4C) を餌として繁殖させ、生後約1カ月の個体を試験に用いた。

6月の場合(図35, 上段), ヨコエビ試験により上流から下流までいずれの地点でも高い毒性が検出された。採水当日は前日までの降雨のため、河川はかなり増水し流速が早かったにもかかわらず、100 km の区間で感受性の高い生物に致死的な影響を有する毒性物質が流下していた(図35)。しかし、支流(地点16)の水中ではヨコエビの死亡はまったく観察されなかった。他の地区の同様な試験では、概してヌカエビの感受性が高かったが、この場合はヨコエビに対する毒性が高い物質が流下したことになる。たとえば、4種殺虫剤に対するヌカエビ、ヨコエビの生物試験を実施した結果、薬物種によって両者の感受性はそれぞれ異なることがわかった(表7)。

表7 4種殺虫剤のヌカエビとヨコエビに対する48時間半数致死濃度 ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )

殺虫剤	ヌカエビ	ヨコエビ
フェンチオン	0.9	18.4
フェニトロチオン	1.9	20.0
フェノバルブ	13.2	50.8
エトフェンプロックス	1.1	0.3

7月の場合は、いずれの地点でも両種の生物に対する毒性は軽微であった。しかし、8月には、地点4から地点7(この間、約1 km)間で再び、毒性が著しく高まった。当日は、河川の流量が少な目で流速も遅かったため、毒性物質の流下が遅く、地点8から下流では低い毒性が記録された。いずれにしろ、河川の水生生物に対する毒性はダイナミックに変動しており(特に農薬汚染の場合)、水田を流下する河川では月1回程度の採水による試験、分析による生態影響評価は極めて不十分であることがわかる。これらの毒性は検出された殺虫剤の濃度と毒性から、フェノバルブとピリダフェンチオンの相加的影響(6月)、マラチオン(8月)の単独影響が主因と考えられるが、ヨコエビに関しては生物試験が不十分なため、定量的な因果関係は明らかでない。

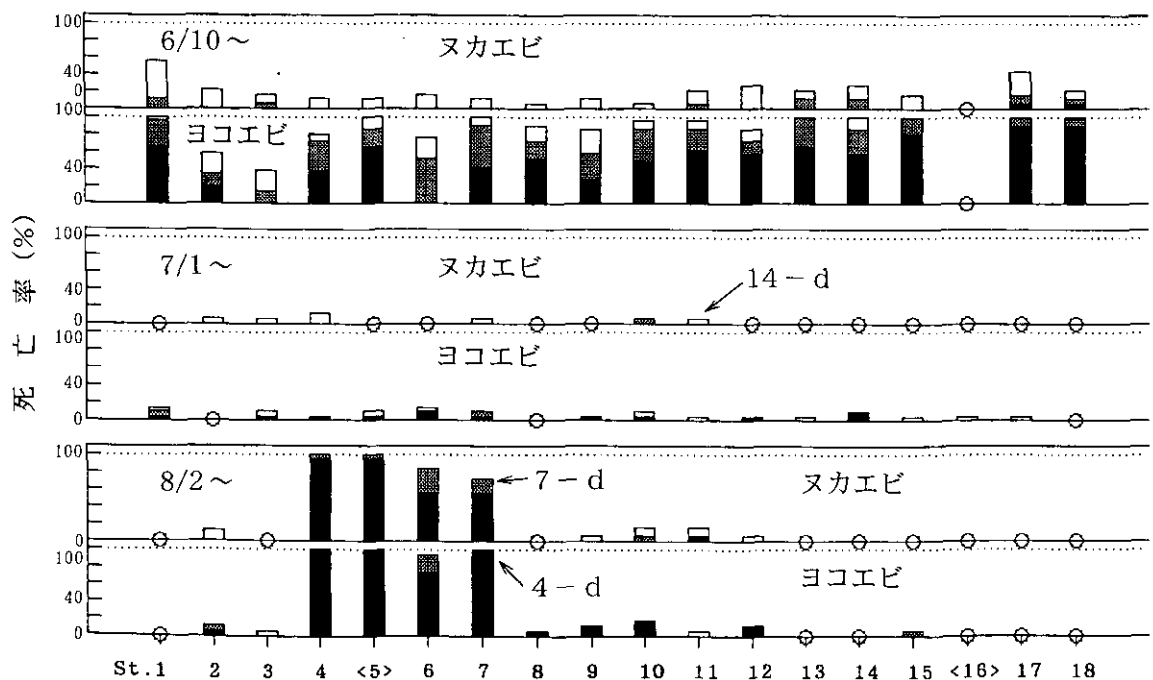


図35 小貝川(全長110km)の17地点(上流~下流間, 95 km)から採取した河川水サンプル中でのヌカエビとヨコエビ(米産, *Hyalella azteca*)の死亡率(1997年採水)

表8 筑波山麓（八郷町）の小桜川（調査地点1）と川又川（調査地点2）の水生昆虫相

水生昆虫種名	調査地点1		調査地点2		
	袋	底質	袋	底質（砂）	底質（れき）
エルモンヒラタカゲロウ	○	○			
シロハラコカゲロウ	○	○	○		○
コカゲロウ（sp.）	○	○	○	○	○
キタマダラカゲロウ	○	○	○		
アカマダラカゲロウ	○	○	○		
フタスジモンカゲロウ	○	○			
オナシカワゲラ（spp.）	○	○			
ヘビトンボ	○	○	○		
ウルマーシマトビケラ	○	○	○		
コガタシマトビケラ			○		○
ニンギョウトビケラ（sp.）	○	○			
マルツツトビケラ（sp.）	○	○			
コカクツツトビケラ	○	○			
ヒメトビケラ（sp.）			○		○
ウスバヒメガガンボ	○	○	○		○
<i>Antocha</i> sp.	○	○			
<i>Tipula</i> sp.	○	○			
ブユ（spp.）	○	○	○		
ユスリカ（spp.）	○	○	○	○	○
アブ（spp.）	○	○			
ヒゲハナノミ（sp.）	○	○			
ヒメドロムシ（spp.）	○	○			
種数	20	20	11	2	6

#### 2.2.4 河川底生生物相とヌカエビ死亡率変化の相関

これまでのバイオモニタリング（ヌカエビ試験）によって明らかとなった農薬等による河川水中でのヌカエビの死亡率の増大が、実際の河川生態系への影響をいかに指標するかに関して生物調査を実施した。調査地点はヌカエビ死亡率が顕著であった川又川（調査地点2，以下地点2）とその支流の小桜川（調査地点1，以下地点1）にそれぞれの定点を決めた。川又川の定点では川底が砂質で、礫（れき）がほとんどなかった。そのため水生昆虫の定着を促進する目的で、1995年4月13日から、底面積が50~100cm<sup>2</sup>の礫（一辺10 cm大）を4個入れた袋（一辺30 cm，メッシュサイズ3 cm）を河川の中央の瀬の部分に4組（以下，袋-礫）ずつ配置した。地点1は川底が礫であったが、比較のため、地点2と同様に袋-礫を4組配置した。

両調査地点に1995年4月から月2回（隔週）の頻度で環境測定（水温，電導度，pH）と袋-礫に定着す

る底生動物の回収を行った。礫をそれぞれの袋から取り出し，付着する底生動物を採集ネット（底辺25 cm，メッシュサイズ1 mm）に回収し，ポリ袋に入れて生きたまま実験室に持ち帰った。それに加えて地点1では，川底の礫（砂地を礫が覆っている）に定着している底生動物の定性的なサンプリングを採集ネットを用いて行った。地点2では，砂地にわずかに礫（一辺20 cm大）が点在しており，砂地と礫のそれぞれから採集ネットを用いて底生動物の定性的な採集を行った。これらの生物サンプルも上記と同様にポリ袋に回収し，実験室に持ち帰ってピンセットで水生昆虫を拾い出して種の同定を行った。

ヌカエビ死亡率を求めるために地点1，地点2（川又川），と川又川が合流した恋瀬川の5 km下流の3定点で，それぞれ500mlの河川水を三角フラスコに採水し，上記と同様（2.1.3，p.8）に14日間の試験を実施した。



### (1) 河川環境要因の変動

水温は、夏期の一時期に調査地点1で高い傾向(25~28℃)が見られた。電導度は、調査地点2で5月の終わりから10月にかけて高い状態(100 $\mu$ S/cm以上)が続いたが、冬期には上流の調査地点1と同様に低い傾向(20~60 $\mu$ S/cm)が見られた。一方、pHは両地点ともに6.5~7.5の間で変化した。

### (2) 両調査地点におけるヌカエビ死亡率の変動

地点1では7月下旬から試験を始めたが、河川水サンプル中でのヌカエビ死亡率は、下流の地点2ほど高くはなかった。それでも7月から8月にかけて14日目までの死亡率が最大60%程度まで高まった。地点2の川又川では、6月から8月にかけて高い死亡率が見られた。とりわけ8月には、4日後の死亡率が90%以上となることもあり、6月から8月にかけて、6月下旬に一時期毒性が低下する期間があったが、それ以外は高い毒性が継続して観察された。これらは農薬の分析値などから殺虫剤の毒性が主因である可能性が高い。しかし農薬類が消失する秋以降も低い毒性が検出されている(地点2と下流の恋瀬川)。これについては、かつて上流域の谷間に産業廃棄物の不法投棄があり、それが現在も流出していることも考えられるが、分析データがなく原因は不明である。

### (3) 河川水毒性と水生昆虫相との関係

調査期間に採集された底生生物全サンプルにおける種類数を表8に示した。袋一礫からは、地点1で20種類、地点2で11種類が確認された。地点1では清流で見られるニンギョウトビケラ、マルツツトビケラやコカクツツトビケラとアブが夏期に確認されたが、地点2では見られなかった。しかし、冬期には両地点でブユが見られた。一方、11月以降調査地点2では携巣タイプのヒメトビケラが確認された。また、地点1では底質(礫)から採集された種類とまったく同様な生物種が採集された。しかしながら、地点2では、底質の大部分(80~90%程度)を占める砂地からはコカゲロウ(sp.)とユスリカがわずかに採集され、ほかにイトミミズが採集されただけであった、また、砂地に点在する礫からは6種類が確認された。

以上の結果から、地点2のように川底が砂地でも適当な礫(この場合、袋一礫)を配置すれば、上流から流下する水生昆虫が定着できることを示した。しかし、地点2の袋一礫から採集された種類数は、地点1の約半数と少なく、しかもそのほとんどは薬剤耐性種や影響を受けても回復能力の速いコカゲロウなどの種類であった。

### (4) おもな水生昆虫幼虫の個体数変動

各調査地点で採集された個体数の70~85%がトビケ

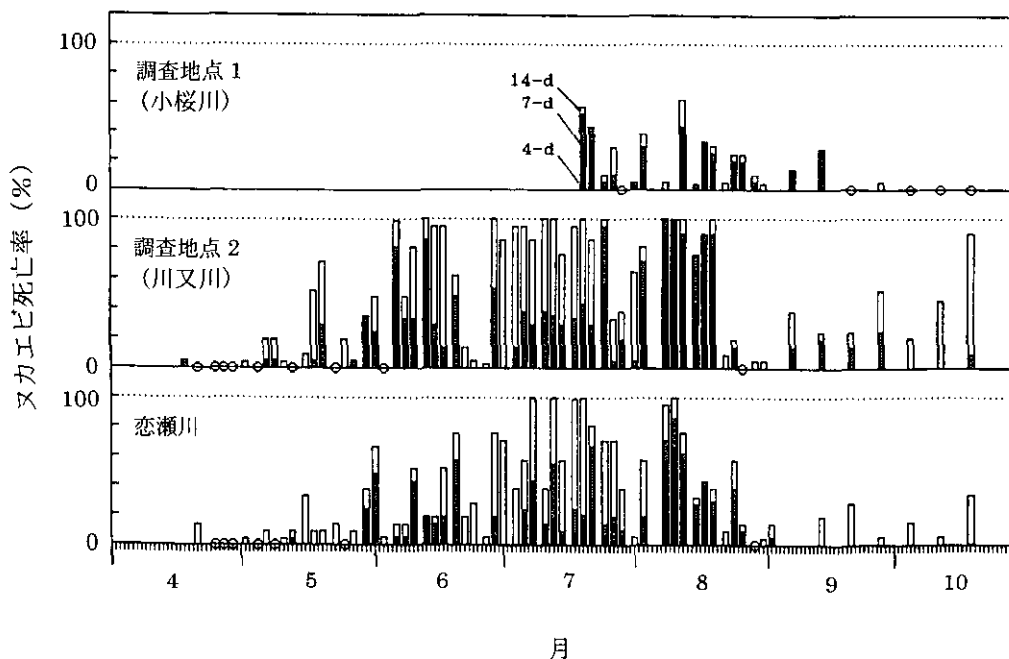


図36 河川水採取サンプル中でのヌカエビ死亡率の季節変動

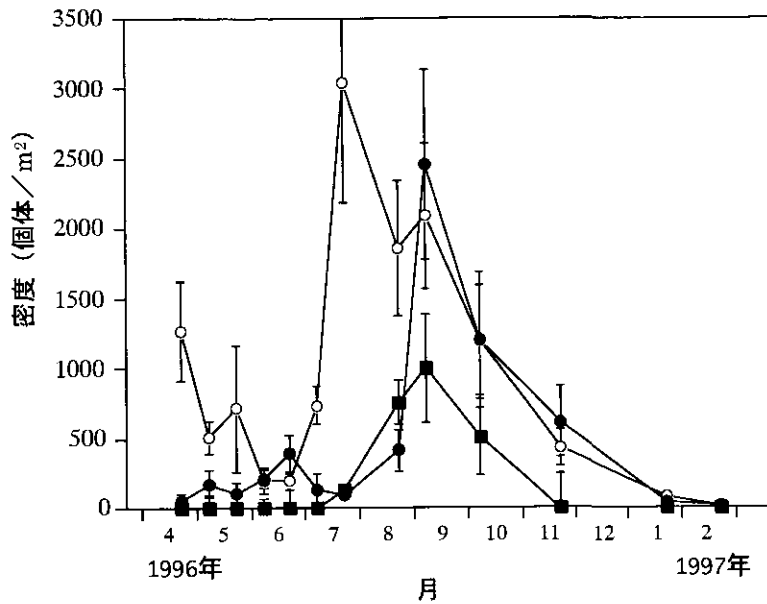


図37 筑波山麓（八郷町）の小桜川（調査地点1）と川又川（調査地点2）のシマトビケラ幼虫の季節的密度変動  
 ウルマーシマトビケラ：—○—調査地点1，—●—調査地点2 コガタシマトビケラ：—■—調査地点2

ラとカゲロウ類で占められた。そのうち造網性のトビケラとして全国に分布するシマトビケラ類が優勢した。地点1ではウルマーシマトビケラが、地点2ではウルマーシマトビケラとコガタシマトビケラが採集された。両種とも殺虫剤耐性を示すが、特に後者の耐性は著しくその耐性機構も明らかにされている。図37に示すように地点1では、7～8月にウルマーシマトビケラの個体数の増加が見られた。しかし、地点2では、8月まで密度は低いままであり、9月以降、とくにウルマーシ

マトビケラの個体数の増加が見られた。7月から8月にかけて地点2ではヌカエビ死亡率が非常に高く、9月以降は低かった。このことから、9月以降地点2へのウルマーシマトビケラの定着は、ヌカエビ死亡率で示された河川水毒性の低下に伴った可能性が高い。

一方、カゲロウ類は、図38に示すように両地点ともに個体数密度は高くないが、11月以降、地点2でキタマダラカゲロウが増加した。また、翌1～2月に地点1では、エルモンヒラタカゲロウの成熟個体が見られ

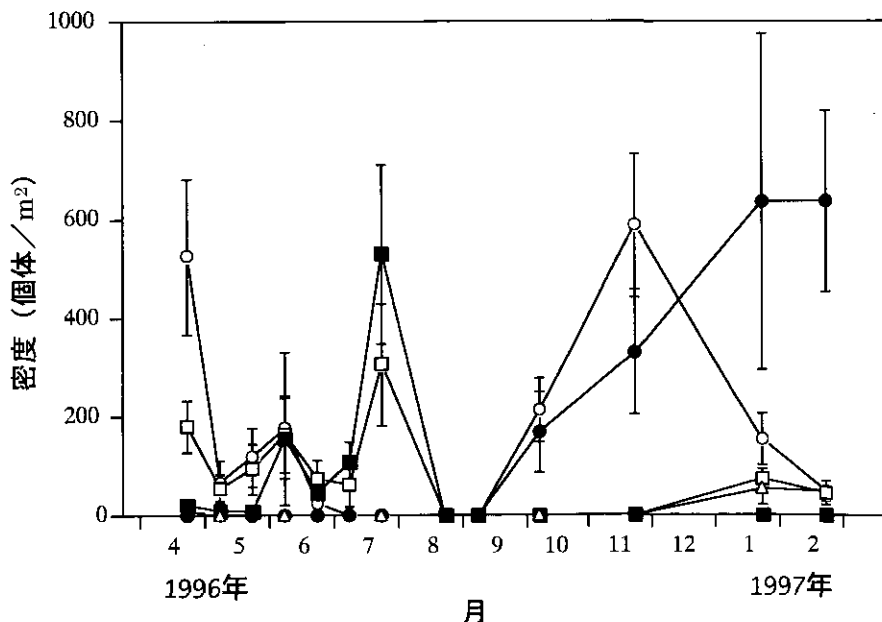


図38 筑波山麓（八郷町）の小桜川（調査地点1）と川又川（調査地点2）のカゲロウ幼虫の季節的密度変動  
 キタマダラカゲロウ：—○—調査地点1，—●—調査地点2  
 シロハラコカゲロウ：—□—調査地点1，—■—調査地点2  
 エルモンヒラタカゲロウ：—△—調査地点1

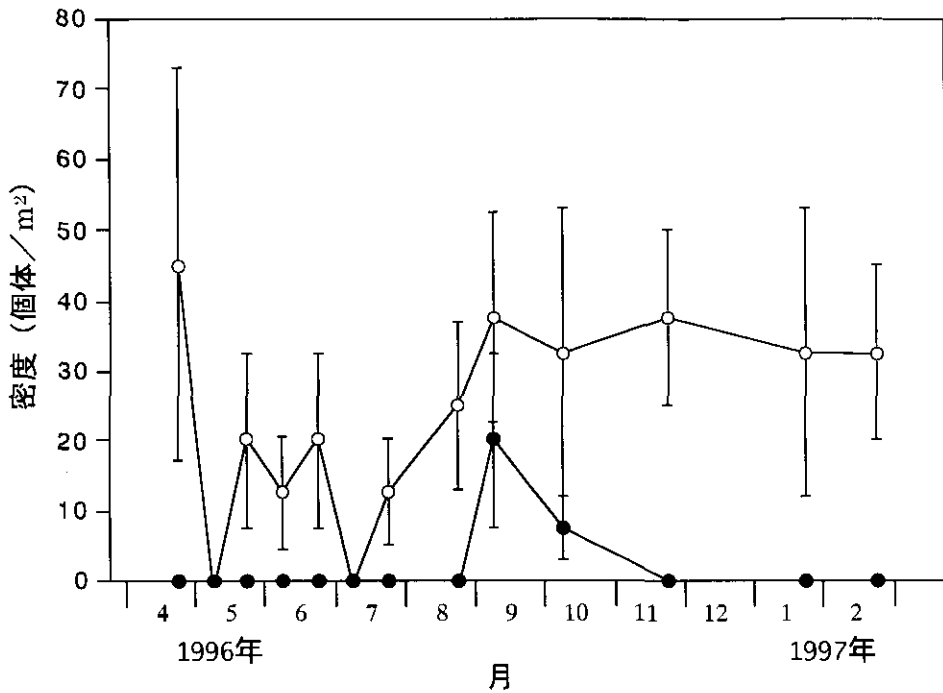


図39 筑波山麓（八郷町）の小桜川（調査地点1）と川又川（調査地点2）のヘビトンボ幼虫の季節的密度変動  
 ○—調査地点1, ●—調査地点2

た（上流から流下してきたものと考えられる）。キタマダラカゲロウの変動は両地点でヌカエビ死亡率と相関が見られたが、化学物質の複合影響を実験室レベルでさらに調べる必要がある。

地点1では水生昆虫の中でも大型の捕食者であるヘビトンボが年間を通じて生息していたが、地点2では、9～10月に確認されただけであった（図39）。これは、地点2で9月にヌカエビ死亡率が低くなり、河川の毒性が低下し、餌となるシマトビケラ幼虫等が増えたことがその原因ではないかと考えられた。また、地点2では、地点1に比べてユスリカの密度が高く（500～1200個体/m<sup>2</sup>）、ガガンボ類の密度が低かった（ユスリカも環境毒性に対応した種が必ず生息してくる）。図36の恋瀬川定点（霞ヶ浦高浜入り、河口から数km上流）から採取した河川水も、その上流に位置する地点2と同様な毒性の変動を示した。地点2（筑波山麓）の周辺は、日本の典型的な田園風景である。このような田園地帯でも、場合により河川水の毒性は生物の多様性を損なうほど高まっていることが示された（図36）。

### 2.2.5 底質試験法の検討とユスリカを用いた生態影響評価

#### (1) 高感受性セスジユスリカの検索

セスジユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*, DIPTERA;

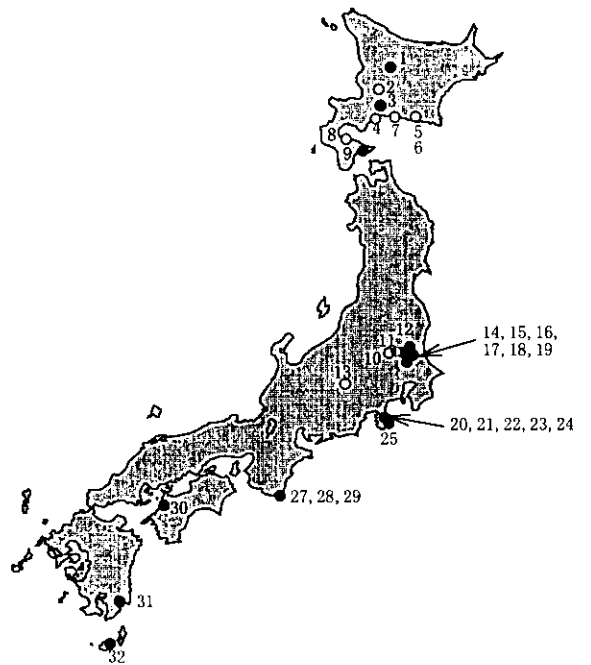


図40 セスジユスリカのフェニトロチオン抵抗性（●）および感受性（○）個体群の分布

1旭川, 2岩見沢, 3ウトナイ, 4苫小牧, 5.6静内, 7門別, 8八雲, 9函館, 10日光湯元, 11日光所野, 12今市市, 13長野県白骨温泉, 14土浦市荒川沖, 15牛久市乙戸川, 16つくば市栗原, 17阿見町本郷, 18石岡市, 19八郷町小桜川, 20～24静岡県河津町, 25下田市, 26静岡県吉田町, 27～29和歌山県串本町, 30松山市宮前川, 31鹿児島県志布志, 32屋久島

Chironomidae) は、日本特産でその幼虫は有機汚濁した流れのある水域、主に家庭雑排水の混入する排水路や小河川に出現する。南西諸島を除く全国各地に分布し、30年ほど前から全国の市街地で大発生して不快昆虫とされていたが、最近では下水道の普及とともに大発生することは以前ほどではなくなった。大発生が問題となった当初から盛んに有機リン系殺虫剤（フェンチオンやフェニトロチオン）がその駆除のために散布され、現在ではこの種の薬剤に抵抗性を獲得している。本研究では、全国的には薬剤抵抗性を獲得した個体群が分布しているものの、地域的には抵抗性獲得以前の感受性を維持している個体群があるとして、その生息地の発見と、そのような感受性個体群の実験生物化を目的に調査した。その結果、図40に示す地点からフェニトロチオン抵抗性系統(●)および感受性系統(○)が確認された。図から明らかなように感受性系統は本州では栃木県日光市湯元に生息し、その分布範囲は湯元から日光市市街地(抵抗性系統との混在)までであった。本州ではさらに長野県安曇村白骨温泉に生息していた。北海道では太平洋側の各地に生息しているものの、函館ほか石狩平野各地では抵抗性系統であった。感受性系統のフェニトロチオンに対する感受性はわ

ずかな地域的な差はあるにしても抵抗性系統(48時間LC<sub>50</sub>濃度で1mg/l以上)に比べてかなり高い(図41)ものであった。これまで調査した中で有機リン系殺虫剤に対して最も感受性が高いのは日光湯元産のもので、現在、継代繁殖し実験生物化している。なお、フェニトロチオン感受性系統は、そのどれもが他の有機リン系・カーバメート系殺虫剤に対しても高い感受性を有していた。前述のようにこれらの個体群は有機リン系殺虫剤使用以前の感受性を維持していると考えられ、これらを使っての毒性試験は、抵抗性獲得当時のセズジュスリカ一般が受けた同系殺虫剤の影響を再現するものであり、さらに現在でも抵抗性を獲得していない他の生物種に対する影響をみる上で格好の材料となる。

一方、抵抗性個体群は一般には有機リン系殺虫剤に対する抵抗性をもっているが、中には、愛媛県松山市宮前川産の個体群のように合成ピレスロイドのエトフェンプロックスに対して、高い抵抗性も発達させていることがわかった。これら抵抗性個体群も感受性個体群と組み合わせて実験に用いることにより、ユスリカ類への化学物質の影響を評価するための試験系を組み立てることが可能である。

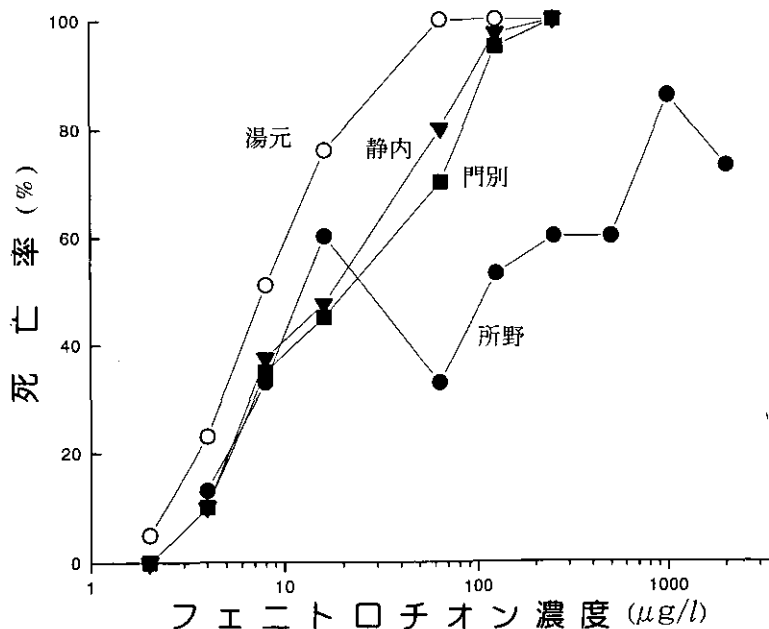


図41 セズジュスリカ感受性系統のフェニトロチオン感受性各濃度(対数目盛)における48時間暴露後の死亡率(%)で表す。図中最も感受性の高い湯元産の48時間LC<sub>50</sub>値は8µg/lであり、日光市所野産は抵抗性系統との混在しているため高濃度でも生存する個体がいた。北海道の2地点(門別、静内)産は湯元産より感受性が劣るものの抵抗性系統とは著しい違いをみせた。

表9 実験底質のエトフェンプロックス濃度

処理濃度	底泥中濃度(乾燥重当たり)
5 mg/l	55.3 mg/kg
1	10.5
0.2	1.9
0.04	0.9
0.0	0.0

(2) 底質試験法の検討

水域に流入した化学物質の多くは水中の懸濁粒子に吸着し、最終的に底質に蓄積する。底生生物はこれらの物質にさらされて影響を受ける一方、底質中の化学物質の水中への回帰を促進するなど、環境中の化学物質の動態に大きく関与する。本研究は、近くOECDで決定される底質試験法ガイドラインに、セスジユスリカを試験生物として、掲載させるべきか否かを判断するために行ったものであるが（現行案では欧米産2種で、日本国内に生息しない）、底質汚染のバイオモニタリングのため、本種を用いて殺虫剤で汚染した河川底質のユスリカ試験を試みた。現在、全国の河川や湖沼では水中には検出されないが、有機塩素の化学物質をはじめ様々な化学物質による底質が明らかにされている（環境庁・黒本など）。そのため、これら化学物質の底質試験法の確立とそれを用いた影響評価が必要と考えられる。

エトフェンプロックス添加毒性試験

本物質は極めて水に難溶（溶解度：1 μg/l 以下）で、オクタノール水分配係数も高く、環境中ではその一部は光分解を受けるが、底質へ吸着・蓄積し、底生生物への影響が懸念される物質である。しかし、溶存態の水生生物に対する毒性は報告されているが、底質を介した底生生物への影響評価はなされていなかった。また水田で使用が許可された初めてのピレスロイド系殺虫剤であるため、農業害虫ではこの薬剤に抵抗性を獲得した虫はいないと考えられ、既存の農薬に変わって今後広く使用が予想される薬剤の1つである。現在、水田のほか後述のように河川にも投入されており、これらの点に注目してこの物質を取り上げた。

実験底質の調整

底質は茨城県霞ヶ浦中央部で採取した底泥を用いた。底泥はエクマンバース式採泥器を用いて底泥表面から約10cmの深さまで採取し、全層を混合して0.3mmメッシュのネットですり過し、ゴミや生物を除去した後、容器に入れ沈殿させ10℃で保存した。

一定量（乾燥重量で38g）を1リットルのガラスビーカーに分取し人工軟水を加えて800 mlとし、所定の量のエトフェンプロックスを加え24時間攪拌した。その後、遠心分離し上澄みを捨て、再び沈殿した底泥に

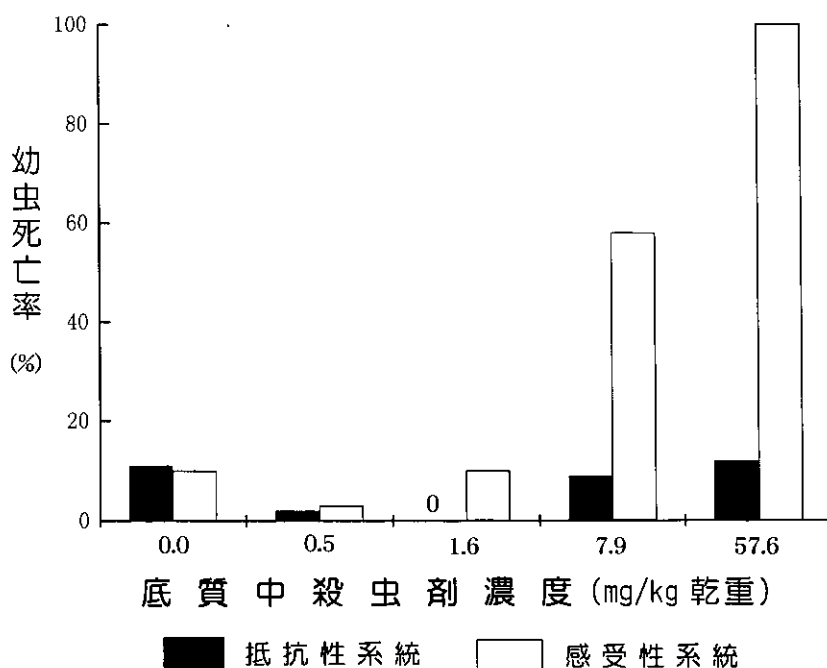


図42 セスジユスリカの感受性の異なる系統に及ぼす底質に吸着したエトフェンプロックス（殺虫剤）の影響  
 抵抗性系統では幼虫死亡率は低く、感受性系統では濃度に従って上昇した。  
 抵抗性系統：愛媛県松山市宮前川産、感受性系統：栃木県日光市湯元産

人工軟水を加えさらに2度目の遠心分離操作を行い、溶存態のエトフェンプロックスを除去した。その結果、処理したエトフェンプロックス濃度にしたがって汚染程度の異なる実験底質を得た(表9)。

試験の方法は基本的にはUS-EPAの*Chironomus tentans*を用いた試験法に準拠したが、試験生物はセスジユスリカの3~4齢初期を用い、薬剤汚染底質を入れたガラスビーカーに、上層水の交換率を10回/日の流量で、地下水を流し、ユスリカを導入して(下記)、7日間の試験を行った。さらに、試験容器からオーバーフローする上層水を、いったんビーカーに受けてここにも若齢のユスリカを入れ、水中に溶け出してくる薬剤の影響も調べた。セスジユスリカ幼虫は栃木県日光湯元産の感受性系統(飼育個体)と対照区用にエトフェンプロックスに抵抗性を獲得している、愛媛県松山市宮前川産(卵を野外で採取し室内飼育)を用いた。

試験の結果、感受性系統の幼虫が薬剤5 mg/l 処理濃度区(以下5 mg/l 区、他同様)で1日以内に全個体が死亡し、1 mg/l 区の7日後の死亡率は約60%に達し、以下濃度にしたがって死亡率が減少し0.2mg/l 区では10%であった。0.04 mg/l 区では対照区と死亡率に差がなかった。一方、抵抗性幼虫では最高濃度区を含めすべての濃度区でその死亡率はきわめて低かった(図42)。また、オーバーフローした上層水中では同感受性系統の幼虫でも死亡個体はなく、死亡の原因は底質に吸着、あるいは底質の間隙水中に溶存していた薬剤、あるいはその相加的な毒性によるものと考えられた。

ユスリカ類を使った底質毒性試験法はすでに開発されているが北米では*Chironomus tentans*、EUでは*C. riparius*と、日本には生息しない種のみが推奨され

ていた。OECDではこれに加えてセスジユスリカの感受性系統を推奨試験生物として含めた底質試験ガイドラインが公表される予定である。

### (3) 殺虫剤散布河川の水質および底質のバイオアッセイ 調査地点の水質環境

ユスリカ駆除剤を散布した愛媛県松山市宮前川において、散布前後に丸山橋(以下地点1)、三王橋(地点2)および堂敷橋(地点3)の3地点の水温、pH、DO、電気伝導度の測定を散布前1回、散布後3回行った。水温は15.4~19.0℃で上流よりも下流の地点で0.7~2.9℃ほど低かった。pHはほぼ中性で地点間の変動はわずかであるものの、下流の地点の方が高い傾向があった。溶存酸素濃度は6.0~7.1 mg/lであった。電気伝導度は日により変動したが、いずれの測定でも下流ほど多少高くなる傾向がみられた。

### 河川水中の薬剤の影響

河川水中のエトフェンプロックスの毒性を感受性系統のセスジユスリカ(湯元産)の1齢幼虫を用いて試験した。薬剤散布前日に採水した河川水では地点1~地点3のいずれでも48時間で死亡する個体は皆無であった(表10)。ところが、散布終了4時間後では河川水を清水で8倍に希釈してもすべての地点でほぼ100%が死亡し、16倍希釈でさえ生き残った数は少なかった。使用したユスリカ幼虫(1齢)のエトフェンプロックスに対する感受性は、48時間LC<sub>50</sub>値で約1 μg/lであることがわかっており、したがってこの時点での各地点の水中濃度は16 μg/l以上であったと推定される。

散布2日後に採水した河川水でも毒性は強く残って

表10 セスジユスリカ感受性系統1齢幼虫を用いた殺虫剤投与河川の毒性調査

採水日 希釈倍率	当日					2日後		
	前日 ×1	×2	×4	×8	×16	×1	×2	×4
丸山橋	0	100	100	98	68	100	21*	6*
山王橋	0	100	100	89	93	85	9*	0
堂敷橋	0	100	100	98	100	38	0	1*

数値は48時間後の幼虫死亡率(%), 前日採水した河川水では全く死亡率は0%であったが殺虫剤散布当日(4時間後)では16倍に希釈(人工軟水)しても高い死亡率であり、散布2日後でも上流側ほど高い毒性があった。なお、2日後の2、4倍希釈では幼虫の動きが不正常な個体が多く見られ、そのうち、針でつついても逃げようとしない個体は瀕死(\*)として死亡と見なした。

おり、その毒性は上流の地点ほど高く、それぞれ 地点 1 から順に、100%、85%、38%であり (表10)、2 倍希釈水においても死亡個体がみられた。このことから河川水中のエトフェンプロックス濃度は上流では  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  以上  $2 \mu\text{g}/\text{l}$  未満、地点 2 では  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  前後、地点 3 では  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  をわずかに下回るものであったと推定された。

#### 河川底質に吸着した薬剤の影響

前述の宮田川の 地点 1 および地点 2 で採取した河川底質を霞ヶ浦湖心で採取した底泥とその毒性を比較した。試験は使用したユスリカの種を前述のセスジユスリカとしたほかは US-EPA のガイドラインに沿って行った (上層水の回転率は高めた) が、試験開始 2 日目で死亡個体が見られたので 48 時間後の死亡率で比較することにし、生長への影響は割愛した。ただし、対照区では試験期間を 1 週間とした。また、試験区の底質中には底泥採取時に紛れ込んだユスリカ幼虫がいたので、試験終了時に全個体を回収した後、フェニトロチオン  $100 \mu\text{g}/\text{l}$  に暴露して実験のために用いた個体と在来の抵抗性個体を分別した。

試験の結果は表11に示すとおりで、薬剤散布後の河川底質はセスジユスリカ幼虫 (感受性系統; 3 齢幼虫) に対してかなり高い率の死亡を引き起こした。対照区では全く死亡はないが、丸山橋 (2 日後採取)、三王橋 (散布当日、2 日後採取) から採取した底質ではどのサンプルでも死亡が認められた。その中では丸山橋の 2 日後に採取した底質が最も死亡数が多く、これは丸山橋地点では薬剤 (粒剤) を直に散布されているのに対し、三王橋では丸山橋の下流でありしかも直には散布されていない地点であることの反映とも、底質の粒度・有機質量の差とも明らかではない。一方、三王橋の採取日の異なる 2 つの底質を比較すると薬剤散布当日の底質の方が 2 日後のものより毒性が強かった

表11 エトフェンプロックス散布後の河川底質に暴露されたセスジユスリカ幼虫の死亡

底質採取	場所	死亡数	±	標準偏差
散布 2 日後	丸山橋	8.5	±	1.00
当日	三王橋	7.5	±	0.58
2 日後	三王橋	5.0	±	1.63

48時間後、1 容器10個体中の死亡数 (平均±S.D., n=4)。対照: 霞ヶ浦採取底泥では死亡率 0。(試験は流水式で実施、詳細は文中)。

が、その差はわずかであった。

なお、河川底質の 50~85% の高い死亡率は、もしこれが底質中のエトフェンプロックスだけのユスリカに対する生理的な毒性の影響であるとすれば、対照区に用いた霞ヶ浦底質の添加試験の結果と比較すると、同薬剤を  $1 \text{mg}/\text{l}$ 、24 時間、混合接触させた底質と同じ程度の毒性である。

今回の薬剤散布量は上記よりもはるかに少ない ( $200 \mu\text{g}/\text{l}$ 、2 時間分) はずであるので、底質への吸着量が散布の方式や製剤によって違いがあったか、もしくは吸着量は少なくとも底質の性状によってユスリカ幼虫への暴露量 (バイオアベイラビリティ) に差が生じたかなど、底質試験特有の検討課題である。特に底質の性状 (シルト、泥、砂泥、砂質等の別)、有機炭素含有量などの違う条件での有害物質の吸着性や毒性が異なることが予想される。それにしても、本種は種々の物質に抵抗性系統が発見される可能性が高く、その応用範囲は他の種以上のものがあると考えられる。当面、化学物質 (農薬類) 抵抗性を検索するが、重金属抵抗性系統が見いだされる可能性もあると考えられる。

#### 2.2.6 イボニシを用いた有機スズの沿岸生態系への影響評価

船底防汚塗料や漁網防汚剤として世界的に使用されてきた有機スズ化合物 (トリブチルスズ (TBT) 及びトリフェニルスズ (TPT) 化合物) によって腹足類 (巻貝類) に特異的にインボセックスと呼ばれる生殖器の異常が引き起こされてきた、国内種においても、1995 年 6 月現在、38 種でインボセックスが観察されている (表12)。

インボセックスは重症になると産卵障害を伴うことがあり、その種の生息数の減少をもたらす場合がある。ここでは、室内実験の結果、極微量の有機スズ (TBT 及び TPT) によって特異的にインボセックスが誘導されることが既に確認されているイボニシ *Thais clavigera* (アキガイ科) を用いて、有機スズ汚染とそれがもたらす生態影響に関するモニタリング調査の結果を報告する。

調査は 1993 年 6 月から 1996 年 3 月にかけて全国 65 地点で実施した。イボニシを中心にアキガイ科の近縁種も含めて採集し、解剖してインボセックス症状を調査した。また体内の有機スズ含有量をプロピル化 / GC-FPD 法により分析・定量した。

表12 インボセックスの出現が確認された日本産  
海産巻貝類 (1995年6月現在)

【中腹足目】	6種
スイショウガイ科	マガキガイ
タマガイ科	ツメタガイ
フジツガイ科	アヤボラ, カコボラ, ボウシュウボラ
ヤツシロガイ科	ヤツシロガイ
【新腹足目】	32種
アクキガイ科	アカニシ, ヒメヨウラクガイ, ヒレガイ, コウシレイシダマシ, シマレイシガイダマシ, レイシガイダマシ, コゲレイシダマシ, ヒメシロレイシガイダマシ, イボニシ, レイシガイ, クリフレイシガイ, チヂミボラ, オオチヂミボラ, シマチヂミボラ, ホソスジチヂミボラ
エゾバイ科	イソニナ, エゾイソニナ, ノシガイ, ミガキボラ, バイ, モスソガイ, エゾバイ, クビレバイ, ヒメエゾボラ
テングニシ科	テングニシ
オリイレヨフバイ科	アラムシロガイ
イトマキボラ科	ナガニシ
コロモガイ科	コロモガイ
イモガイ科	マダライモガイ, サヤガタイモガイ, イボシマイモガイ, クロミナシガイ

インボセックスの症状の重さを示す指数である相対ペニス長指数 (Relative Penis Length (RPL) Index ;  $\{ \text{雌の平均ペニス長} / \text{雄の平均ペニス長} \} \times 100$ ) と産卵障害を起こしていると考えられる輸卵管末端開口部(生殖開口)の閉塞個体の出現率に関する結果の一部 (1996年瀬戸内海沿岸調査) を図43に示した。

雌におけるペニスの発達が著しい海域が全国的に見られ、輸卵管閉塞による産卵不能個体も瀬戸内海全域をはじめ、鹿児島・内之浦や三浦半島及び三陸海岸などの地点で多数観察された。これはイボニシ以外の種においても同様であった。なお、イボニシにインボセックスが認められなかったのは佐多岬(尾波瀬)と志布志の2地点のみであった。

図44には1996年までの全国的な調査における、相対ペニス長指数と輸卵管閉塞個体出現率との相関を示した(57地点)。相対ペニス長指数が30付近から輸卵管閉塞個体が現れ、同指数が60以上になると採集した雌の半数以上の個体で輸卵管が閉塞すると考えられた。相対目ペニス長から産卵障害を推定する上で一つの目安となるであろう。

三浦半島にある油壺(神奈川)では毎月の定期野外調査においてイボニシの産卵がほとんど観察されず、解剖による判定結果とよく一致した。また湾奥部のマリナーに近づくにつれて個体群密度が小さく、また小型(若齢)個体が少なかった。イボニシ個体群において

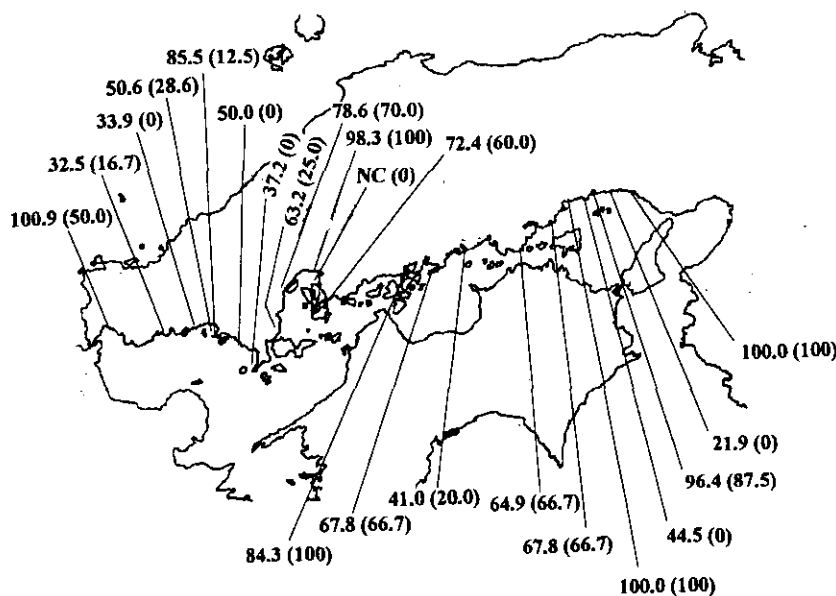


図43 瀬戸内海沿岸 (1996年) 各地から採集されたイボニシの相対ペニス長指数 (文中説明) と輸卵管閉塞個体の出現率 (カッコ内)





速な濃度変化に敏速に対処し、生態影響を最小限にするには、常時監視的なバイオモニタリング手法が望まれる。ヌカエビの行動変化に基づくバイオモニタリング手法は反応性にも優れ、特に殺虫剤汚染に関しては魚類より桁違いに高い感受性を有し、バイオモニタリング手法として提案できる。

●マシジミの水管伸縮も、反応性が敏速と考えられ、簡易・安定性などバイオモニタリング法として有用と考えられた。しかし、試験生物化、化学物質に対する感受性の問題などは今後の検討課題である。

●環境水に連続暴露されたウキクサ葉面の光合成活性の変化なども、瞬時に一次生産への影響をモニタリングする手法として有効と考えられる。これらの応用面では、生物反応がある閾値を超えた場合、信号により採水（分析）や警報などを発信させ、各種の規制・環境管理などに早急な対策を執ることができる。

## 2) 慢性的な影響評価のバイオモニタリング

生長や繁殖に及ぼす影響は、環境水に連続的に暴露してはじめて現れる。特に、内分泌攪乱物質の影響評価には試験生物をコントロール（光・温度など）した状態で、環境水に連続的に暴露し、繁殖への影響を見る必要があるが、バイオモニタリング施設を用いた各種実験が有効と考えられる。

●水草類の生長に及ぼす化学物質の影響をモニタリングする手法として（一次生産者への影響評価）、流水式水槽（水温調整・連続照明下）を用いたウキクサ試験（2週間）は、河川の濁りにも影響されない、高感度で安定したモニタリング手法をして提案できる。

●ヌカエビは流水式水槽を用いた長期間のモニタリングにおいて、行動変化、死亡・生長、あるいは繁殖への影響評価が可能であり、試験生物として推奨できる。環境水への連続暴露により、間接的な試験では見過ごすような、毒性の変動を観察、あるいは記録（行動解析装置）することができた。河川水中の毒性物質により、継続的な運動量の増加（エネルギー消耗）を受けたヌカエビは、対照（活性炭ろ過・河川水）に比較し、生長阻害を受けることを示した。

●二枚貝（ドブガイ・マシジミ）は、水中のみならず懸濁粒子や底質に吸着した化学物質、あるいは底質の間隙水中の化学物質とすべての暴露経路から化学物質の総合的な影響を受ける可能性がある。しかも、給餌の必要がなく、増水時の濁水にも安定して生存する

ため、年間をとおした長期のバイオモニタリングに適している。生長率、薬物代謝酵素活性の変化などを測定項目として検討した。ただし、現在のところ入手は可能であるが、試験生物化されておらず実験生物化が今後の課題である。

●メダカやゼブラフィッシュは、環境水に連続暴露して繁殖影響までモニタリングする場合、サイズなどから試験生物として適当である。試験魚は、毒性の原因物質は不明であるが生長・産卵、あるいは繁殖に影響を受けており、今後はさらに長期の試験、原因物質の解明などを実施する必要がある。今回は対照水は費用の面（施設・維持費）から供給できなかった。河川水、あるいは上水の活性炭ろ過水、地下水などから、現場状況や水質分析結果・維持費用（河川水活性炭ろ過は頻繁に交換必要）など勘案して選択すべきである。

●バイオモニタリング施設周辺の河川で、魚類を採取し、筋肉中に様々な農薬類を検出した。農薬の種類によっては、長期間安定して存在したり、農薬の散布後に急速に吸収され、その後速やかに排出されるなど、様々な挙動が見られた。濃縮係数を算出するには、魚の移動が不確定要因となるためバイオモニタリング施設内で飼育した魚を試料として用い、水中と魚体中の濃度を定期的に測定することは有効である。

## 2.3.2 バイオモニタリング結果とこれに基づく生態影響評価に関するまとめ

試験生物によっては、環境水への連続暴露試験がほとんど不可能であるか、その実施のためには大がかりな試験系を開発する必要がある。このような制約以外にも、化学物質の河川全体への影響評価などに、広域的なバイオモニタリング手法が求められる。試験生物として、これまで環境研究所アクアトロンで継代飼育している水生生物から数種を選択した。環境水や汚染底質に対する生物試験と関連する生物調査の結果から、化学物質の生態影響評価を行った。

●化学物質（特に除草剤）の一次生産者への影響を、藻類群集の耐性の獲得過程から評価した。数種の除草剤に関し、除草剤汚染程度の異なる環境（実験水田・河川）から多数の藻類種を分離培養し、耐性試験を行った。珪藻類は概して耐性があり、緑藻類は比較的低い耐性を示した。そのため、除草剤の影響が強い場合、緑藻ではそれまで抑制されていた薬剤耐性種、あるい

は耐性系統が感受性系統と置換して顕著になる。このような耐性獲得の推移を明らかにし、除草剤汚染の状況にある程度推定可能であることを示した。珪藻・藍藻は概して耐性があったが、河川に優占する種類が多く、適当な種を選択し、生物試験に供することが必要である。

●一次消費者としてミジンコ試験が重視されている。8種のミジンコを飼育しているが、ここではカプトミジンコ (*D. galeata*)、ミジンコ (*D. pulex*) を選択し、河川水中でミジンコの14日間一繁殖試験を実施した。河川水をろ過(ガラスフィルター)し、懸濁粒子や植物プランクトンを除去し、餌としての決まった量のクロレラを与え、死亡・産仔数を記録した。ミジンコにおいても産仔前に死亡し、産仔数が減少するなど様々な影響が観察された。

●田園地帯を流下する小貝川(全長110 km)の上流から下流まで、94 km 区間に16定点を定め、6、7、8月に河川水を採取して、ヌカエビ、ヨコエビを用いた14日間生物試験を実施した。6月に採集した河川水では、河川水が増水していたにもかかわらず、ヨコエビに対する毒性は上流から下流まで高い値を示した。また、8月の河川水では上流側の4地点のみ、両種ともに著しい毒性を示すなど河川の毒性は広域的にもダイナミックに変動し、感受性の高い水生生物には致死的であり、生態系の回復を阻害していることが示唆された。

●典型的な田園地帯を流れる小河川(筑波山麓)の河川水では、ヌカエビ試験により5月から8月まで、

著しい毒性が継続して検出された。これと関連して、河川の生物調査を実施し、生物試験による毒性との相関を検討した。ヌカエビ試験による毒性が著しい定点で採集された生物は、コガタシマトビケラをはじめ、殺虫剤に耐性を有す水生生物がほとんどであった。捕食者ヘビトンボも薬剤耐性を示す種であるが、高い毒性が続く時期には下流定点に定着しなかった。直接的な影響以外に、捕食すべき水生昆虫が生息しなかったこともその原因と考えられる。

●水中の化学物質の多くは、最終的に底質に沈降する。そのため、底生生物試験が重視されているが、国内では実績がほとんどない。欧米では、試験生物として、ユスリカ(2種)とヨコエビ(1種)の併せて3種が試験生物に選択されている。OECD ユスリカ底質試験法に、本報告で調査したセスジユスリカ感受性系統を試験生物として提案している。本種を用いた底質試験法により、殺虫剤(エトフェンプロックス)で汚染された河川底質のユスリカに及ぼす試験を実施したが、底質暴露により急性致死的な影響を受けることがわかった。ヌカエビでも同様なことが観察された。底質は様々な化学物質で汚染され、底生生物へ影響が危惧されている。慢性影響試験も含めた試験法により、底質中化学物質の生態影響評価を早急を実施する必要がある。

●イボニシのインボセックスに関しては、本研究開始以前からすでに実績があったものであるが、化学物質の生態影響評価に、調査対象生物の特定の指標(インボセックス・輸卵管閉塞)が有効であることを示唆した。

バイオモニタリング手法の開発・生態影響評価のため用いた水生生物のまとめ

(一部の試験生物・試験系に関しては、口絵に示した。)

生物種	影響評価	暴露様式	試験生物・試験法、評価等のまとめ
セテナストルム <sup>a)</sup> (緑藻)	増殖	止水式	・環境水をろ過除菌、栄養塩を対照(C培地)と同レベルにして、3日間増殖試験。
ウキクサ(2種) イチョウウキゴケ	葉生長・増殖 光合成活性 同上	流水式 <sup>b)</sup> 同上	・セテナストルムの増殖試験よりも高い感度を示した。葉の生長・光合成活性を測定。 ・増水時の濁水にも試験系として安定。
ミジンコ類  ヌカエビ  ヨコエビ	死亡・産仔数  死亡 死亡・生長 行動(画像解析)	半止水 <sup>c)</sup>  止水式 <sup>d)</sup> 流水式 <sup>b)</sup> 流水式 <sup>b)</sup>	・8種ミジンコを継代飼育。環境水のバイオモニタリングには、化学物質に対する感受性の違いから、複数種の試験が有効。 ・流水式試験には不適。環境水をろ過し、クロレラを餌とした14日間繁殖試験を実施。 ・14日間試験法を確立。河川水の毒性調査に実績。広域的な河川水毒性査調にも有効。 ・河川水流水式暴露により、感受性の向上と常時監視体制を確立。 ・行動変化(画像解析装置)のモニタリングによる早期警戒システム。毒性-反応の相関等検討課題が多い。(本文参照) ・本報告書では、欧米の試験生物 <i>Hyaella azteca</i> を使用。欧米の底質試験生物による国内産ヨコエビの試験生物は未解決。 ・環境水の生物試験バイオモニタリングにはヌカエビと併用。
ドブガイ マシジミ	生長・酵素活性	流水式 <sup>e)</sup>	・水質・底質の化学物質を総合評価可能。水温・餌濃度(chl.a)、農薬濃度から生長影響総合評価。現場試験にも適す。酵素活性の変化によるバイオモニタリングも可能。 ・マシジミでは、水管の伸縮に依る長期間のバイオモニタリング手法を検討した。(両種とも、実験生物化未解決)
セスジユスリカ <sup>c)</sup> (幼虫)  ヒラタカゲロウ (幼虫)	耐性/環境汚染 死亡・生長  生長/羽化など	止水式試験 底質(流水)  流水式 <sup>f)</sup>	・耐性獲得状況で個体群の暴露履歴を推定可能(ユスリカ科全体の試験) ・感受性系統は殺虫剤全般に対して高感受性有す(特に1令幼虫)。水質試験・底質試験双方に試験法を検討、評価が可能。 ・河川一次消費者として、今回の報告では扱わなかったが実績がある。特にエルモンヒラタカゲロウは採集面、実験維持で適当。 ・現在、試験生物化が出来ていない。しかし、生態影響評価上重要な生物は野外採集してでも、生物試験が必要がある。
メダカ ゼブラフィッシュ	生長・産卵 産卵・孵化	流水式 <sup>d)</sup> 流水式 <sup>d)</sup>	・バイオモニタリング施設内で、水温・光(繁殖に影響)をコントロールし環境水に暴露。内分泌攪乱物質の評価に有効な手法。 ・対照水を地下水、河川水又は上水の活性炭ろ過水などから選択する必要がある。

注) ;上記の種名・学名等は本文参照、a) NIES株、b) 施設内で河川水に連続暴露、c) 試験中に河川水を交換、d) 河川水を交換しないで試験、e) 河川水導入水路(底質)実験、f) 河川水導入水路で附着藻を餌とし実験一藻類群集から単離培養し、除草剤耐性試験に用いた藻類は多種類のため本文参照一

[資 料]

## I 研究の組織と研究課題の構成

### 1 研究の組織（当時）

#### [A 研究担当者]

##### 地域環境研究グループ

統括研究官	森田昌敏
上席研究官	兜 眞徳
化学物質生態影響評価研究チーム	島山成久・笠井文絵・花里孝幸・菅谷芳雄・五箇公一
化学物質健康リスク評価研究チーム	高木博夫
有害廃棄物対策研究チーム	白石寛明・堀口敏宏

##### 地球環境研究グループ

統括研究官	安野正之
野生生物保全研究チーム	高村健二

##### 水圏環境部

水環境工学研究室	井上隆信
----------	------

##### 生物圏環境部

部長	岩熊敏夫
生態機構研究室	多田 満

#### [B 客員研究員]

藤田 正一	北海道大学	(平成7～9年度)
若林 明子	東京都環境科学研究所	(平成7～9年度)
福嶋 悟	横浜市環境研究所	(平成7～9年度)
市村 輝宜	北海道大学	(平成7～9年度)
中野 武登	広島大学	(平成7～9年度)
安野 正之	滋賀県立大学	(平成8～9年度)
花里 孝幸	信州大学	(平成8～9年度)
菅原 淳	近畿大学	(平成8～9年度)
昆野 安彦	農業環境技術研究所	(平成8年度)
藤井 宏一	筑波大学	(平成8年度)

### 2 研究課題と担当者（\*客員研究員）

#### 2.1 水生生物によるバイオモニタリング手法の開発に関する研究

島山成久・菅谷芳雄・笠井文絵・五箇公一・多田 満・高木博夫・井上隆信 藤田正一\*  
菅原 淳\*・福嶋 悟\*・花里孝幸\*

#### 2.2 生物試験に基づいた生態影響評価に関する研究

島山成久・笠井文絵・菅谷芳雄・五箇公一・多田 満・堀口敏宏・高村健二 安野正之\*  
花里孝幸\*・市村輝宜\*・中野武登\*・昆野安彦\*・藤井宏一\*・若林明子\*

## II 研究成果発表一覧

### 1 誌上発表

発表者	題 目	掲 載 誌	巻	ページ	刊行年
T. Hanazato F. Kasai	Effects of the organophosphorus insecticide fenthion on phyto-Band zooplankton communities in experimental ponds	Environ. Pollut.	<b>88</b>	293-298	1995
S. I. Dodson T. Hanazato	Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of <i>Daphnia</i> , a key member of aquatic ecosystems	Environ. Health Perspect.	<b>103</b> Sup p.4	7-11	1995
T. Hanazato, S. I. Dodson	Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the caldoceran <i>Daphnia pulex</i>	Lomnol. Oceanogr.	<b>40</b>	700-709	1995
S. Hatakeyama, N. Yokoyama	Correlation between overall pesticide effects monitored by shrimp mortality test and change in macrobenthic fauna in a river	Ecotoxicol. Environ. Saf.	<b>36</b>	148-161	1997
S. Hatakeyama, S. Fukushima, F. Kasai, H. Shiraishi, S. Ueno	Joint effects of herbicide on algal production in rivers	Ecological Chem. (Russia)	<b>6(1)</b>	45-52	1997
S. Hatakeyama, H. Shiraishi, S. Uno	Overall pesticide effects on growth and emergence of two species of Ephemeroptera in a model stream carrying pesticide-polluted river water	Ecotoxicology	<b>6</b>	67-180	1997
畠山成久	水生生物を使った環境監視	いんだすと	<b>2(9)</b>	27-29	1997
畠山成久	生態系の機能に基づいた試験生物とその試験法に関して	環境毒性学会誌	<b>1(1)</b>	51-64	1998
S. Hatakeyama, H. Shiraishi	Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity	Environ. Toxicol. Chem.	<b>17</b>	687-694	1998
S. Hatakeyama	Assessment of overall pesticide effects on river ecosystems	Reviews in Toxicology	<b>2</b>	315-332	1998
T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita	Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey	Appl. Organomet Chem	<b>11</b>	451-455	1997
T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita	Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, <i>Thais clavigera</i>	Environ. Pollut.	<b>95(1)</b>	85-91	1997

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻	ページ	刊行年
堀口敏宏	インボセックス-有機スズが巻貝の種の存続を脅かす-	水情報	18(1)	3-10	1998
F. Kasai, T. Hanazato	Effects of the triazine herbicide simetryn on freshwater plankton communities in experimental ponds	Environ. Pollut.		292-296	1995
F. Kasai, S. Hatakeyama	Changes in herbicide susceptibility of algae in a river running through an agricultural region	Chem. Ecol. (Russia)	31	261-272	1996
F. Kasai, M. T. Arts	The interactive effects of UV-B radiation and a herbicide on uptake and allocation of carbon in two strains of the green alga <i>Scenedesmus</i>	Aquat. Ecol.		in press	1998
F. Kasai, Y. Miyamoto, T. Hanazato	Herbicide effects on pond phyto-plankton communities under different grazing pressures	Verh. Internat. Verein. Limnol		in press	
F. Kasai	Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application	Chemosphere	48(3)	in press	
菅谷芳雄	セスジユスリカ ( <i>Chironomus yoshimatsui</i> ) における殺虫剤感受性の種内変異	衛生動物	48(4)	345-350	1997
菅谷芳雄	フェニトロチオン暴露によるヌカエビの行動変化	環境毒性学会誌	1(1)	36-42	1998
多田 満	化学物質の生態影響	日本生態学会誌	48	299-304	1998
多田 満	室内実験用水路を用いたフェノブカルブ (殺虫剤) の河川底生動物に対する急性影響	日本環境毒性学会誌	1(2)	印刷中	1998
K. Takamura	Life cycle of the damselfly <i>Calopteryx atrata</i> in relation to pesticide contamination	Ecotoxicology	5	1-8	1996
S. Uno, H. Shiraishi, S. Hatakeyama, A. Otsuki	Uptake and depuration kinetics and BCFs of several pesticides in three species of shellfish ( <i>Corbicula leana</i> , <i>Corbicula japonica</i> , and <i>Cipangopludina chinensis</i> ). Comparison between field and laboratory experiment	Aquatic Toxicol.	39	23-43	1997



2 口頭発表

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
T. Hanazato	Effects of pesticides on lake ecosystems: experimental analysis	Americal Water Resour. Assoc. Annual Summer Symp.	Honolulu	7. 6
T. Hanazato	Predator kairomones reduce tolerance of zooplankton to environmental stress and control their population dynamics; an indirect effect of predators	26th Congr. Int. Ass Theor. Appl. Limnol.	Sao Paulo	7. 6
花里孝幸 笠井文絵	実験水槽での除草剤投与に対する動物プランクトン群集の反応	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9
花里孝幸	ミジンコに及ぼす殺虫剤とその他の環境ストレスの相乗影響	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9
花里孝幸	捕食者カイロモンは環境ストレスに対するミジンコの耐性を低下させる：捕食者の間接影響	日本陸水学会第60回大会	名古屋	7. 10
T. Hanazato	Influence of temperature on the effect of an insecticide on recovery patterns of a zooplankton community in experimental ponds	6th Int. Conf. Conserv. Manage. Lakes Kasumigaura '95	Tsukuba	7. 10
T. Hanazato	Combined effects of an insecticide and a predator kairomone on the cladoceran Daphnia	2nd. SETAC World Cong	Vancouver	7. 11
畠山成久	OECD生態影響試験における新たな試験生物に関して	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9
畠山成久	農薬汚染河川に優占する水生生物の生物学的特性に関して	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9
畠山成久 小神野豊	イトトンボ ( <i>Ischnura senegalensis</i> ) の実験生物化とカドミウムの影響試験	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9
畠山成久	農薬汚染河川におけるコガタシマトビケラの個体群動態に関して	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	7. 9

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
S. Hatakeyama	Assessment of insecticide toxicity to macrobenthic community based on shrimp mortality in river water samples	2nd. SETAC World Cong.	Vancouver	7. 11
畠山成久	バイオモニタリングによる化学物質の河川生態系への影響評価	第28回日本水環境学会セミナー	東 京	8. 2
畠山成久 菅谷芳雄 小神野豊	食物連鎖モデルによる殺虫剤の捕食者に対する影響	第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	8. 9
小神野豊 畠山成久	底質汚染の試験生物としてのヨコエビとヌカエビの比較	第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	8. 9
畠山成久	化学物質の底生生物への影響評価に関する調査研究	工業技術会「水生生物による河川・水辺の水質調査と環境評価手法」講習会	東 京	8. 10
上村久子 小椋和子 鈴木一隆 畠山成久	ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) とトリクロサンの生物実験	第31回日本水環境学会年会	札 幌	9. 3
S. Hatakeyama	Assessment of overall pesticide effects on river ecosystems	'97 US-Jpn. Jt. Semin. Pestic. Future	Kisarazu	9. 5
畠山成久 井上隆信 小神野豊 鈴木一隆	ヌカエビ・ヨコエビを用いた最近の河川水の毒性評価に関して	第3回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	9. 8
畠山成久 菅谷芳雄 井上隆信	ウキクサを用いた除草剤総合毒性のバイオモニタリング	第3回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	9. 8
小神野豊 石塚房枝 畠山成久	ミジンコの殺虫剤に対する感受性の種間差について	第3回エコトキシコロジー発表会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	9. 8
鈴木一隆 井上隆信 畠山成久	ヌカエビ試験による鬼怒川・小貝川水系における河川水毒性の季節変動	第3回エコトキシコロジー発表会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東 京	9. 8
F. Kasai, S. Hatakeyama	Changes in herbicide susceptibility of algae in a river running through agricultural region	8th Int. Bioindicators Symp.	Ceske Budejovice	7. 5

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
F. Kasai, Y. Miyamoto, T. Hanazato	Herbicide effects on pond phytoplankton communities under different zooplankton grazing pressure	XXVI Cong. Int. Assoc. Theore. & applied Limnol	Sao Paulo	7. 7
笠井文絵, 花里孝幸	摂食圧の異なった条件下の植物プランクトンに対する除草剤の影響	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東京	7. 9
F. Kasai	Growth characteristics of two strains of the green alga <i>Scenedesmus</i> sp. isolated from herbicide-treated and untreated ponds	6th Int. Conf. Conserv. & Manage. Lakes Kasumigaura '95	Tsukuba	7. 10
F. Kasai, T. Inoue	Shift in herbicide tolerance in paddy periphyton after herbicide application	17th SETAC Annual meeting	Washington	8. 11
F. Kasai, M. T. Arts	Combined effects of a herbicide and UV-B on photosynthesis of the green alga <i>Scenedesmus</i>	17th SETAC Annual meeting.	Washington	8. 11
F. Kasai	Characteristics of tolerance to two herbicides, simetryn and pretilachlor, in paddy periphyton	9th Int. Symp. Bioindicators Symp	Sedang	9. 11
菅谷芳雄	ユスリカ科昆虫の薬剤感受性と生物試験法の検討	第1回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東京	7. 9
菅谷芳雄	底質に吸着した殺虫剤の底生生物への影響	第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東京	8. 9
菅谷芳雄	水生生物の行動画像解析による有害化学物質モニタリング法の検討	第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会	東京	8. 9
菅谷芳雄	河川導入水路におけるドブガイの生長速度	日本陸水学会第61回大会	札幌	8. 9
Y. Sugaya	Behaviour analysis of a shrimp, <i>Paratya compressa improvisa</i> , for monitoring chemicals in river water	9th Int. Symp. Bioindicators	Serdang	9. 11
M. Yasuno, Y. Sugaya	Feeding behaviour of <i>Daphnia magna</i> and <i>Moina macrocopa</i> on toxic and non-toxic <i>Microcystis</i> spp.	9th Int. Symp. Bioindicators	Serdang	9. 11

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM  
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR-29-'99

---

平成11年3月31日発行

編集 国立環境研究所 編集委員会

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305-0053 茨城県つくば市小野川16番2

電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

---

印刷 朝日印刷株式会社

住所 〒309-1117 茨城県真壁郡協和町向川澄82-1

Published by National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053 Japan

March 1999

本報告書は再生紙を使用しています。