

Development of Risk Assessment Procedure for Evaluating Effect of Herbicides on Primary Productivity of River Ecosystem

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 悟 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002980

農環研報 25,
1 - 92 (2008)

河川生態系の一次生産性に及ぼす除草剤の 影響評価手法開発

Development of Risk Assessment Procedure for Evaluating Effect of Herbicides on Primary Productivity of River Ecosystem

石原 悟*

(平成20年度3月24日受理)

シノプシス

河川水生生物の水稲用除草剤による暴露実態を長期のモニタリングで明らかにすると共に、河川生態系の一次生産性に及ぼす水稲用除草剤の影響評価について、より精度の高い評価手法の開発を試みた。その結果、これまで知見が少なかった藻類に対する除草剤の影響が明らかになった。また、フローサイトメトリーによる細胞計測により、細胞の形態に及ぼす影響及び回復性を考慮した簡易な評価を可能とした。さらに、これまで試験が困難であった付着性珪藻を使用した生長阻害試験手法の開発により、現実的な影響評価を可能とした。これらの知見は、農薬の生態影響評価手法の開発に有用な情報を提供するものであり、高次のリスク評価法としての貢献が大きく期待される。

目次

I 序論	2	(1) 試験生物	18
II 河川及び湖における水稲用除草剤の動態	5	(2) 試験生物の培養条件	18
1 緒言	5	(3) 試験に用いた除草剤	20
2 調査地域・調査対象農薬	5	(4) 藻類生長阻害試験	20
3 調査期間及び分析方法	5	3 結果	21
4 結果及び考察	7	(1) 試験指針への適用性の検討	21
(1) 回収率	7	(2) 各藻類の除草剤感受性について	22
(2) 排水路における農薬の消長	7	4 考察	23
(3) 桜川流域及び霞ヶ浦における農薬の消長	8	IV 回復性を考慮した影響評価手法の開発	24
(4) 霞ヶ浦における農薬の垂直分布	11	1 緒言	24
(5) 桜川中流域における農薬濃度の年次変動	12	2 材料及び方法	25
III 系統保存されている藻類を用いた水稲用除草剤の 有害性評価	18	(1) 試験生物	25
1 緒言	18	(2) 試験生物の培養条件	25
2 材料及び方法	18	(3) 試験に用いた除草剤	25
		(4) 生長阻害率及び形態変化の類型化に関する試	

* (独)農業環境技術研究所有機化学物質研究領域
(現(独)農林水産消費安全技術センター農薬検査部)

験	25	(3) 適用可能な珪藻種の検討	44
(5) 除草剤による影響からの回復性に関する試験	27	(4) 総合考察	47
3 結果	28	VII ニッチア属珪藻のトリアジン系除草剤感受性	48
(1) 除草剤の3種藻類に対する生長阻害率	28	1 緒言	48
(2) 除草剤暴露した藻類細胞の形態変化による類型化	28	2 材料及び方法	48
(3) 除草剤による影響からの藻類細胞の回復	30	(1) 調査地点	48
4 考察	30	(2) 試験生物	48
(1) 除草剤暴露した藻類細胞の形態変化による類型化	30	(3) 生長阻害試験	48
(2) 除草剤による影響からの藻類細胞の回復	32	(4) 各種有機元素含量の計測	49
V 水稻用除草剤が4種類の藻類の生長に及ぼすリスクの評価	32	3 結果	52
1 緒言	32	(1) 珪藻の単離	52
2 評価方法	32	(2) ジメタメトリン感受性	52
3 結果及び考察	33	4 考察	52
VI 珪藻を用いた生長阻害試験方法の開発	39	VIII 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性	58
1 緒言	39	1 緒言	58
2 材料及び方法	39	2 材料及び方法	59
(1) 試験生物	39	(1) 河川珪藻群集を用いた生長阻害試験方法の検討	59
(2) 生長阻害試験方法の検討	39	(2) 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性	59
(3) 試験方法の再現性の評価	41	3 結果及び考察	60
(4) 試験溶液の調製法及び濃度分析法	42	(1) 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性	60
(5) 適用可能な珪藻種の検討	42	(2) 試験終了時の珪藻群集	61
3 実験結果と考察	43	IX 結論	73
(1) 付着性珪藻を用いた生長阻害試験	43	謝辞	73
(2) 試験の再現性評価 (A. <i>minutissimum</i> NIES-71 株のジメタメトリン感受性検定)	44	引用文献	73
		Summary	78
		付表	81

I 序論

20世紀は世界の農業が大きく変貌した時代であった。品種改良、施肥技術の革新、農業機械・農薬の開発等科学技術の進歩は単位面積当たりの収穫量を飛躍的に増加させ、また、貿易の自由・円滑化により農作物の移動が容易となり貿易量は急激に増加し、莫大なものとなった。このことは、先進国を中心に安定した食糧供給を可能にした。そして、食料の安定供給による生活の安定はさらなる経済活動を促し、先進国における大量消費・大量廃棄型の経済社会システムの構築へとつながった。その結果、我々人類の活動による環境負荷は地球規模の生態系に影響を与え、最終的には我々人類の生活を脅かすまでに至っている。1992年の国連環境開発会議（リオサ

ミット）において採択された「環境と開発に関するリオデジャネイロ宣言（リオ宣言）」で示されるように、将来世代のために現在の大量消費・大量廃棄型の社会を見直し、持続可能な社会へ移行していくことは21世紀に生きる我々の使命とされている（環境庁，1992）。

持続可能な農業を取り組むにあたり、検討が必要な事項の一つとして、農薬の使用が挙げられる（農業環境技術研究所，1995）。農薬は害虫・病気・雑草などから効率的に農作物を保護できるため、現代の農業では必要不可欠な農業資材となっている。しかし、その一方で農薬は極低濃度で生理活性を有し、農地等の開放系で使用されるため、防除対象となる病虫害・雑草以外の非標的生物への影響を通じた生態系への不可逆的な影響が懸念されている。そのため、欧米諸国においては、農薬の登録

段階で生態影響を評価するシステムが検討されており、USEPA（米国環境保護庁；United States Environmental Protection Agency）、EU（欧州連合；European Union）等が中心となってOECD（経済協力開発機構；Organization for Economic Cooperation and Development）において国際的な調和への取り組みが進められている。しかし、日本においては一部の水生生物への影響を評価することが登録時の要件となっているものの、生態系全般に対する影響を評価するシステムの整備には遅れを取っており、生態系への有害な影響を回避するための仕組みを確立することが緊要な課題となっている（三菱化学安全科学研究所（以下、三菱安科研）、1999）。

農薬の生態影響評価の概念の基礎的な部分は国際的な一致が見られており（図1）、基本的には代表的試験生物を用いた毒性試験から求められる LC_{50} （50%致死濃度；50% lethal concentration）、 EC_{50} （50%影響濃度；50% effective concentration）、NOEC（無影響濃度；no observed effect concentration）、LOEC（最小影響濃度；lowest observed effect concentration）等の毒性値を影響評価指標とし、これを暴露データ、すなわち環境中において非標的生物が暴露されると考えられる農薬の濃度と比較することにより行われている。評価は一般的にはTierシステム（段階的評価方式）が取り入れられており、簡易な評価により有害性が疑われるものについては追加試験を施し、評価の精緻化（個体レベルから個体群・群集レベルの評価へ）が図られている（SETAC、1994；Campbell et al.、1999）。この高次の評価手法については、各国の裁量が認められており、文化、産業等を考慮した評価手法を取り入れる余地が残されている（三菱安科研、1999；OECD、1984）。

生態影響評価に利用される試験項目としては、米国ではUSEPAのOPPTS（汚染防止農薬有害物質局；Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances）においてOPP（農薬プログラム部；Office of Pesticide Programs）とOPPT（汚染防止有害物質部；Office of Pollution Prevention & Toxics）で調和をはかった試験指針（850シリーズ、50項目）が作成され利用されている（表1-A）。EUでは独自の試験指針を策定しておらずOECD及びSETAC（環境毒性化学会；Society of Environmental Toxicology and Chemistry）の方法を採択している。また、OECDでは化学品プログラム傘下のテストガイドラインプログラムにおいて試験指針の開発が進められており、2006年9月現在生態毒性の領域においては21項目の試験指針が公表されているところである（表1-B）。

一方、日本における農薬の非標的生物に対する影響評価は、水産動植物への被害防止の観点から1963年に導入された魚類（コイ）の急性毒性試験（48時間、致死）に端を発し、およそ40年もの長い間コイ及びミジンコの急性毒性試験（3時間、致死）のみが利用されていた。ようやく2003年の農薬取締法の改正にともない試験指針の改正が進められ、魚類（96時間、致死）・ミジンコ類（48時間、遊泳阻害）・藻類（72時間、生長阻害）を用いた試験が登録保留基準の設定に利用されることとなり、基礎的な試験指針について国際調和が図られ始めたところである（農林水産省農産園芸局、2000；農林水産省生産局2001、2002-a、2002-b）（表1-C）。

我が国の農業の特徴としては水田が耕地の約55%を占めることが挙げられる。そのため農薬の使用量のおよそ半分は水稲用であり、農薬による環境負荷を考える上では水田での農薬管理が必須となっている。また、水田は河川と水を介してつながっているため、水田で使用される農薬は河川等公共用水域に流出し非標的生物に影響を及ぼす危険性が高い。特に湛水状態で田面に直接施用される水稲用除草剤は流出率が高く、過去に使用されたPCP（ペンタクロロフェノール）のように魚毒性の高い除草剤が水産被害の要因とされていることは周知の通りである（衆議院、1962；松原ら、1963）。すなわち、畑作を農業の中心とする欧米と異なり、日本では水稲用除草剤が生態影響評価の対象物質として優占度の高い物質群であるといえる。一方、生物に注目してみると、河川生態系において農耕地から流出した除草剤により最も影響を受ける可能性が高いと考えられる生物群は、生態学的食物連鎖の中では藻類などの生産者である。微細藻類を含めた植物群生は水域生態系において一次生産、酸素生産、栄養循環、魚類等の生息・繁殖・隠れ場所等として重要な役割を担っている（Gary、1995）。しかし、前述の通り、これまでの日本における非標的生物に対する農薬の影響評価は、特に経済的有益性の高い魚類や甲殻類に注目して行われていたため、農薬の非標的生物に対する有害性（植物毒性）に関する知見は少ない（表1-C）。現行では、日本の河川生態系の生産者を代表しているとは言い難い、単細胞の緑藻を用いた毒性試験の結果のみが評価に用いられている。また、農薬の非標的生物に対する影響評価手法に関しては、国際的にも魚類や甲殻類の場合と比較して遅れを取っているのが現実である。

そこで、本研究では河川生態系の一次生産性に対する除草剤の影響評価手法の精緻化を目的とし、第II章では日本の水田、用水路、河川及び湖における水稲用除草剤

の動態調査を行い、現状における除草剤の暴露濃度水準の実態を明らかにした。第Ⅲ章では、現行の評価基準に基づいた緑藻に対する各種除草剤の影響濃度を明らかにした。さらには、より実環境への影響評価を考慮し、緑藻以外の藻類である藍藻及び珪藻に及ぼす影響について、系統保存されている藻類を用いて調査した。第Ⅳ章では農業による一時的な影響からの回復性を加味した評価手法開発を目的に、フローサイトメトリー技術を用いた藻類群集に及ぼす除草剤の影響手法の開発を試み、日本で使用履歴のある40種の除草剤を評価した。第Ⅴ章ではこれまでに得られた影響評価指標と第Ⅱ章で明らかにした暴露量を比較することにより、日本の河川生態系における水稲用除草剤の藻類の生長におよぼすリスク評価を行った。第Ⅵ章では日本の環境に適した精度の高い評価手法開発を目的に、河川を評価基準点とした場合に一次生産者として重要な役割を果たしている珪藻類に対する影響評価手法の開発を試みた。第Ⅶ章ではリスク評価

でリスクが高いと評価したトリアジン系除草剤について、野外より採取したニッチア属珪藻の感受性を第Ⅵ章で開発した手法を用いて明らかにし、暴露量と比較することによって、より現実的なリスク評価を試みた。さらには、第Ⅷ章では、珪藻群集に及ぼす除草剤の影響評価手法の開発を試みた。

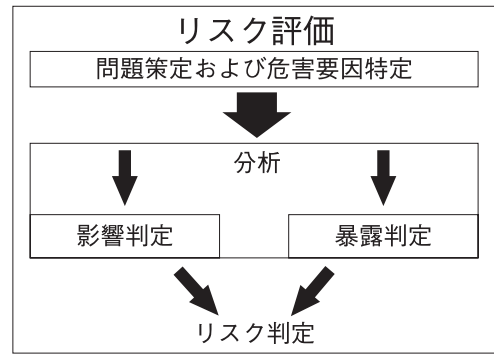


図1 農業の生態 リスク評価工程の概念図 (USEPA, 1992)

表1 米国、OECD 及び日本における生態影響評価に関する試験指針一覧
A) USEPA、B) OECD、C) MAFF-Japan (下線：植物に対する影響を評価する試験指針、2006. 9 現在)

A)		B)		C)	
OPPTS No.	試験名	OECD No.	試験名	MAFF No.	試験名
850.1000	水生生物室内試験に関する特別考察	201	藻類生長阻害試験	2-7-1-1	魚類急性毒性試験
850.1010	ミジンコ急性毒性試験	202	ミジンコ類急性遊泳阻害試験・繁殖試験	2-7-1-2	魚類(ふ化仔魚)急性毒性試験
850.1020	ヨコエビ急性毒性試験	203	魚類急性毒性試験	2-7-2-1	ミジンコ類急性遊泳阻害試験
850.1025	カキ急性毒性試験(貝殻沈着)	204	魚類延長毒性試験	2-7-2-2	ミジンコ類(成体)急性遊泳阻害試験
850.1035	アミ急性毒性試験	205	鳥類摂餌毒性試験	2-7-2-3	ミジンコ類繁殖試験
850.1045	クルマエビ急性毒性試験	206	鳥類繁殖試験	2-7-3	魚類・ミジンコ類共存有機物質影響試験
850.1055	二枚貝急性毒性試験(初期幼生)	207	ミミズ急性毒性試験	2-7-4	スマエビ・スカエビ急性毒性試験
850.1075	淡水および海水魚急性毒性試験	208	陸生植物生長試験	2-7-5	ヨコエビ急性毒性試験
850.1085	フミン酸緩和魚類急性毒性試験	209	活性汚泥呼吸阻害試験	2-7-6	ユスリカ幼虫急性毒性試験
850.1300	ミジンコ慢性毒性試験	210	魚類初期生活段階毒性試験	2-7-7	藻類生長阻害試験
850.1350	アミ慢性毒性試験	211	ミジンコ繁殖試験	2-8-1	ミツバチ影響試験
850.1400	魚類初期生活段階毒性試験	212	魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験	2-8-2	蚕影響試験
850.1500	魚類生活環境毒性試験	213	ミツバチ急性経口毒性試験	2-8-3	天敵昆虫等影響試験
850.1710	カキ濃縮性試験	214	ミツバチ急性接触毒性試験	2-8-4-1	鳥類強制経口投与試験
850.1730	魚類濃縮性試験	215	魚類稚魚生長毒性試験	2-8-4-2	鳥類混餌投与試験
850.1735	淡水性底生生物急性毒性試験	216	土壤微生物窒素無機化試験		
850.1740	海水性底生生物急性毒性試験	217	土壤微生物炭素無機化試験		
850.1790	ユスリカ毒性試験	218	ユスリカ毒性試験(底質)(草案)		
850.1800	オタマジャクシ/底生生物亜急性毒性試験	219	ユスリカ毒性試験(水質)(草案)		
850.1850	水生生物食物連鎖	220	ヒメミミズ繁殖毒性試験(草案)		
850.1900	淡水マイクログロブム室内試験	221	ウキクサ生長阻害試験(草案)		
850.1925	特定地域マイクログロブム室内試験				
850.1950	水生生物野外試験				
850.2100	鳥類急性経口毒性試験				
850.2200	鳥類混餌毒性試験				
850.2300	鳥類繁殖試験				
850.2400	野生哺乳類急性毒性試験				
850.2450	陸生マイクログロブム試験				
850.2500	陸生野生生物野外試験				
850.3020	ミツバチ急性接触試験				
850.3030	ミツバチへの葉面残留物毒性				
850.3040	受粉媒介者野外試験				
850.4000	非標的植物試験の背景				
850.4025	標的地域植物毒性				
850.4100	陸生植物毒性TierI(実生の出現)				
850.4150	陸生植物毒性TierI(生長)				
850.4200	発芽/根の伸長毒性試験				
850.4225	実生の出現TierII				
850.4230	初期生長毒性試験				
850.4250	生長TierII				
850.4300	陸生植物野外試験TierIII				
850.4400	ウキクサ毒性試験TierI-TierII				
850.4450	水生植物野外試験TierIII				
850.4600	マメ科植物毒性試験				
850.4800	植物取り込み・移動性試験				
850.5100	土壤微生物毒性試験				
850.5400	藻類毒性TierI-TierII				
850.6200	ミミズ亜急性毒性試験				
850.6800	活性汚泥呼吸阻害試験				
850.7100	個々の研究室の妥当性				

II 河川及び湖における水稲用除草剤の動態

1 緒言

農地から水系への農薬流出率は、畑地に比べ水田の方がはるかに高いことが知られている(丸, 1991)。日本では農薬の使用量のおよそ半分が水田で使用されており、水系に入る農薬の比率が畑作農業を主体とする欧米諸国と比べて高い。水田使用農薬の水系における動態は日本が世界に先駆けて行うべき農薬環境科学研究の課題であり、すでに多数の報告がある(山谷ら, 1981; 堀ら, 1982; 御厨ら, 1983; Ohyama et al., 1987; Ono et al., 1987; Shiraishi et al., 1988; 飯塚, 1989; 丸, 1991; 小竹ら, 1993; 中村, 1993; Tsuda et al., 1996; Okamoto et al., 1998)。

しかしながら、農薬の環境中濃度分布及びその変動状況の把握は、国民の生活環境保全ならびに野生生態系の保護の観点から重要であるにも関わらず、継続した調査例は少なく(水戸部ら, 1999; Sudo et al., 2002)、また、野生生物への影響を評価するために行われた例は少ない(国立環境研究所, 1995, 1999)。近年、野生生態系に与える農薬の影響(農薬の生態影響)に対する社会的関心が高まっており、環境中における農薬の動態と共に非標的生物への影響を明らかにし、評価することが求められている(環境省水環境部, 2002)。

本章では、河川及び湖における一次生産者である藻類に対する水稲用除草剤暴露実態の調査を目的に、2001年から2005年までの5年間にわたり茨城県桜川流域及び霞ヶ浦において水中残留農薬の挙動について調査した。

2 調査地域・調査対象農薬

桜川は、茨城県桜川市(旧岩瀬町)の鏡ヶ池を水源とし、霞ヶ浦に注ぐ全長63.4km・流域面積345km²の一級河川であり、流域のほぼ全域が水稲作地域である。桜川流域では霞ヶ浦に流入した水が農業用水(霞ヶ浦用水)として流域の水田に再利用されている。この地域の水稲作は、霞ヶ浦用水の通水が始まる4月下旬に一斉に始まり、田植えは5月上旬に集中する。田植えが始まる5月上旬から下旬にかけて除草剤が散布されるが、近年では主として初中期一発処理剤が使用されている。また、6月下旬から8月下旬にかけて殺虫剤及び殺菌剤が散布され、一部の地域ではヘリコプターによる空中散布が行われている。採水地点及び調査年度を図2に示した。採水はおよそ週に1回の頻度で行った。また、2002年には霞ヶ浦掛馬沖(St.8)及び大室船溜(St.10)において農薬の垂直

分布の調査を行った。調査対象農薬はJAつくば市(旧JA筑波)への聞き取り調査の結果を基に、水稲用除草剤18種類(イマズスルフロン、エスプロカルブ、オキサジクロメホン、カフェンストロール、ジメタメトリン、シメトリン、ジメピペレート、ダイムロン、チオベンカルブ、ピラゾスルフロンエチル、ピリブチカルブ、ピリミノバックメチルE体、ブタクロール、プレチラクロール、ペントキサゾン、ベンスルフロンメチル、メフェナセット、モリネート)、畑地用除草剤1種類(シマジン)、殺虫剤2種類(フェノブカルブ、フェントロチオン)の計21種類とした。ただし、オキサジクロメホンは分析用標準品が得られた2002年以降より定量を行った。また、シマジンについては2003年以降について定量を行った。本研究で測定した農薬の一覧を定量下限値及び分析方法と共に表2に示した。

3 調査期間及び分析方法

調査期間は、2001年は3月20日から9月19日、2002年は4月22日から8月19日、2003年は4月28日から7月2日、2004年は4月26日から7月18日、2005年は4月18日から6月27日である。また、2002年5月22日にはSt.8及びSt.10において霞ヶ浦における農薬の深度別水中濃度を明らかにすることを目的に、湖底を最深部として三段階の深さ別(掛馬沖:表層より0-0.5m、2m、4m 大室船溜:表層より0-0.5m、1m、2.5m)に採水を行った。採水は原則として月曜あるいは火曜の午前中とした。幹線排水路及び河川においては岸及び橋上からバケツで採水(約10L)した。湖水においては船上からステンレス製の柄杓を用い採水(約10L)した。また、霞ヶ浦における農薬の垂直分布調査には小型水中ポンプ(Daiki, DIK-660B)を用いた。採水した水はステンレス製のバケツ(15L)中でよく混合した後、一部(2L)をガラス瓶に移しクーラーボックスに入れて実験室に持ち帰り、採水当日に速やかに抽出操作を行った。

サンプル水はガラス繊維ろ紙(Whatman, GF-B及びGF-F)を用いてろ過した。液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS: Applied Biosystems, API 3000TMLC/MS/MS System)を用いた分析用として、ろ液の一部(約30ml)を50ml褐色ガラスバイアルに移し-20℃で凍結保存した。残りのろ液は、10%リン酸もしくは1N塩酸を用いてpHを6.5に調整した後、1000mlを固相カートリッジ(2001年: Waters Sep-pak, tC18, 2002-05年: Waters Sep-pak, PS-2)へ10ml/minの速度で通水した。なお、固相カートリッジは通水前にジクロロ

メタン (5 ml)、メタノール (5 ml)、純水 (10ml) の順に通液したものを使用した。通水後の固相カートリッジは、圧縮空気で水分を除去し、ジクロロメタン (約10ml) で固相に吸着した農薬を溶出した。抽出液は減圧濃縮・乾固後アセトン 2 ml で定容とし、水素炎熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC/FTD: 2001-02年 島津 GC-17A、2003-05年 島津 GC-20A) を用いた分析を行うまで 4℃ で保存した。ダイムロン、ベンスルフロンメチル、イマズスルフロン、ピラズスルフロンエチルについては、試料水に等量のアセトニトリルを加えたものを分析試料とし、LC/MS/MS を用いて定量を行った。その他17種類の農薬については、GC/FTD を用いて定量した。なお、カフェンストロールについては GC/FTD で検出可能な分解物ピークを定量に用いた。表3に GC/FTD 及び LC/MS/MS の測定条件を示した。なお、巻末に付表として、分析結果を農薬の有効成分の種類別に示した。

表2 調査対象農薬の分析方法及び定量下限

農薬一般名	区分	分析方法	定量下限 (µg l ⁻¹)		
エスプロカルブ	除草剤	GC/FTD	0.06		
オキサジクロメホン			0.02		
カフェンストロール			0.03		
シマジン			0.02		
ジメタメトリン			0.02		
シメトリン			0.04		
ジメピペレート			0.02		
チオベンカルブ			0.02		
ビリブチカルブ			0.009		
ビリミノバックメチル(E体)			0.008		
ブタクロール			0.04		
プレチラクロール			0.04		
ペントキサゾン			0.04		
メフェナセット			0.04		
モリネート			0.09		
フェニトロチオン			殺虫剤	GC/FTD	0.008
フェノブカルブ					0.02
イマズスルフロン	除草剤	LC/MS/MS	0.08		
ダイムロン			0.08		
ピラズスルフロンエチル			0.08		
ベンスルフロンメチル			0.08		

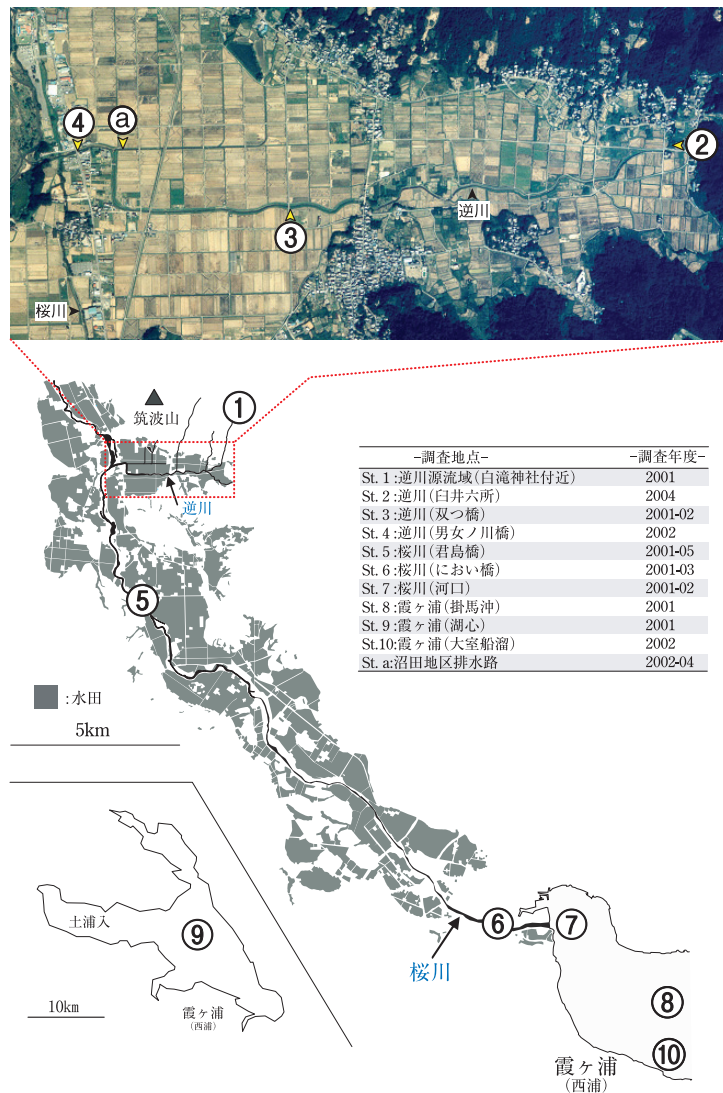


図2 採水地点及び調査年度 (丸数字は St. 番号を示す)

4 結果及び考察

(1) 回収率

GC分析を行った17種の農薬は、一部の農薬を除いてtC18カートリッジ及びPS-2カートリッジを用いた固相抽出でジクロロメタンによる液-液分配抽出と同等で良好な回収率(80~120%)が得られた(表4)。tC18カートリッジを用いた固相抽出ではトリアジン系除草剤であるシマジンは回収できなかった。なお、tC18カートリッジの出口側にPS-2カートリッジを連結させシマジンの添加回収試験を行ったところ、PS-2カートリッジへほぼ全量のシマジンの吸着が認められた。このことよりシマジンはtC18カートリッジでは保持されず通過しているものと考えられた。なお、本論文の図表で扱う農薬濃度については、いずれも回収率補正は行っていない。

(2) 排水路における農薬の消長

2002年4月22日から8月19日にかけて逆川及び排水路(図2; St.3, 4, a)において14回採水を行い排水路における水稲用除草剤の挙動を明らかにした。逆川及び排水路において検出された15種類の水稲用除草剤の最高検出濃度及び検出日を表5に示した。逆川における除草剤濃度は幹線排水の流入しても濃度変化は小さく、5月のSt.3と4間の15種類除草剤の合計濃度について見てみると、St.3の濃度に対するSt.4のその割合は、平均0.9倍であった(図3)。排水路の除草剤濃度は流入する逆川より高い濃度で推移しており、5月のSt.aの除草剤濃度に対するSt.4のその割合は平均3.5倍であった(図3)。すなわち、幹線排水路から排出された除草剤は逆川に入っ

て希釈されると考えられた。

表3 GC/FTD及びLC/MS/MSの分析条件

GC/FTD	
GC	SHIMADZU GC-17A (2001,02), GC-20A(2003-05)
Column	J&W DB-5 (30m×0.32mm i.d., 0.25µm film thickness) J&W DB-17 (for oxaziclofene and simazine) (30m×0.32mm i.d., 0.25µm film thickness)
Carrier gas pres. (He)	40kPa(2min)→3kPa/min→64kPa→1.5kPa/min→103kPa(4min)
Injection temp.	270°C
Oven temp.	60°C (2min)→10°C/min→140°C→5°C/min→270°C (4min)
Detector temp.	270°C
Injection vol.	4µl(GC-17A), 2µl(GC-20A)
Detector	FTD
LC/MS/MS	
HPLC	SHISEIDO NANOSPACE SI-2
Mass spectrometry	Applied Biosystems API 3000TM LC/MS/MS System TurboIonSpray® ionization in positive mode Optimize Technologies, OptiGuard mini C18, 15x1.0mm
Column	+ Cadenza column (Intakt, CD-C18, 30x2.0mm)
Elution	Isocratic mode (45/55 (v/v) 10mM-Acetic Acid/Acetonitrile) Liquid flow rate : 0.1ml/min
Injection vol.	5µl
Internal standard	Primisulfuron-methyl

表4 各種前処理方法による農薬の回収率

農薬一般名	区分	回収率(%)		試験に用いた 溶液中の濃度 (µg l ⁻¹)
		tC18 カートリッジ	PS-2 カートリッジ	
エスプロカルブ	除草剤	82	77	31
オキサジクロメホン		80	83	27
カフェンストール		124	116	21
シマジン		0	123	15
ジメタメトリン		91	84	15
シメトリン		69	84	17
ジメピペレート		93	87	26
チオベンカルブ		90	87	36
ピリブチカルブ		107	96	31
ピリミノバックメチル(E体)		97	89	36
ブタクロール		103	94	100
プレチラクロール		93	84	81
ペントキサゾン		86	81	120
メフェナセット		98	83	25
モリネート		88	86	18
フェニトロチオン	殺虫剤	87	81	0.95
フェノブカルブ		94	92	23

表5 逆川及び排水路における水中残留農薬の検出最高濃度、検出日及び検出頻度(2002年)

除草剤一般名	逆川 St.3			逆川 St.4			排水路 St.a			希釈倍率* St.a → 4
	最高値 (µg l ⁻¹)	検出日	検出頻度	最高値 (µg l ⁻¹)	検出日	検出頻度	最高値 (µg l ⁻¹)	検出日	検出頻度	
イマズスルフロン	0.99	8-May	4/14	1.4	8-May	4/14	3.5	14-May	8/14	7.5
エスプロカルブ	0.96	14-May	4/14	0.88	14-May	3/14	1.3	14-May	5/14	1.5
オキサジクロメホン	0.11	8-May	8/14	0.074	14-May	9/14	0.093	14-May	9/14	1.3
カフェンストール	1.2	8-May	7/14	1.0	8-May	10/14	1.9	14-May	9/14	5.8
ジメタメトリン	0.19	8-May	8/14	0.17	20-May	7/14	0.19	14-May	9/14	1.3
シメトリン	0.31	20-May	11/14	0.39	20-May	9/14	0.18	27-May	9/14	2.1
ジメピペレート	0.084	8-May	2/14	0.049	14-May	4/14	0.21	14-May	1/14	4.3
ダイムロン	9.1	8-May	12/14	14	8-May	13/14	28	14-May	13/14	7.4
ピラズスルフロンエチル	0.53	8-May	4/14	0.43	20-May	4/14	1.1	14-May	7/14	3.2
ピリブチカルブ	1.4	8-May	8/14	1.1	8-May	9/14	1.6	14-May	8/14	5.1
ピリミノバックメチル(E体)	0.37	8-May	4/14	0.19	8-May	4/14	0.073	14-May	5/14	0.7
プレチラクロール	1.1	8-May	6/14	0.86	14-May	8/14	1.7	14-May	8/14	2.0
ペンスルフロンメチル	1.2	8-May	6/14	1.1	8-May	5/14	2.7	14-May	7/14	8.8
ペントキサゾン	0.10	20-May	6/14	0.60	8-May	5/14	1.4	8-May	8/14	2.3
メフェナセット	1.2	8-May	7/14	2.0	8-May	7/14	5.4	8-May	7/14	2.7

*希釈倍率は各除草剤の排水路(St.a)における最高値検出日の値をSt.4の同日の値と比較して算出した。

(3) 桜川流域及び霞ヶ浦における農薬の消長

2001年3月20日から9月19日にかけて桜川流域及び霞ヶ浦の7地点(図2:St.1、3、5-9)において19回(3/20、4/10、4/17、4/24、5/1、5/8、5/15、5/22、5/29、6/5、6/12、6/19、6/26、7/3、7/17、7/31、8/14、8/28、9/19)採水を行い、桜川流域及び霞ヶ浦における農薬の消長を明らかにした。地域水質解析・評価システム(竹内, 1992)を利用し各調査地点より上流の水田面積を算出したところ、St.1、3、5、6でそれぞれ0、1、63、86km²であった。表6に各調査地点における調査対象農薬の最高検出濃度及びその検出日、検出頻度を示すとともに、桜川下流(St.6)での最高濃度検出日におけるSt.6から桜川河口(St.7)及び掛馬沖(St.8)にかけての希釈率を示し

た。

水稲用除草剤の桜川における濃度の消長は、各除草剤の使用時期と良好な一致を見た。すなわち、水稲移植前の使用が多い初期剤のプレチラクロール及びペントキサゾンの桜川中流(St.5)及びSt.6における検出濃度の最大値は、他の除草剤より早い時期(5月上旬)に観察され、また、主に中期剤として使用されるモリネート、シメトリン及びチオベンカルブは、St.5及びSt.6において検出濃度の最大値が他の除草剤より遅い時期(5月下旬~6月上旬)に観察された。その他の初中期一発剤として使用された水稲用除草剤についてはSt.5及びSt.6で検出濃度の最大値が5月中旬に観察された(表6)。

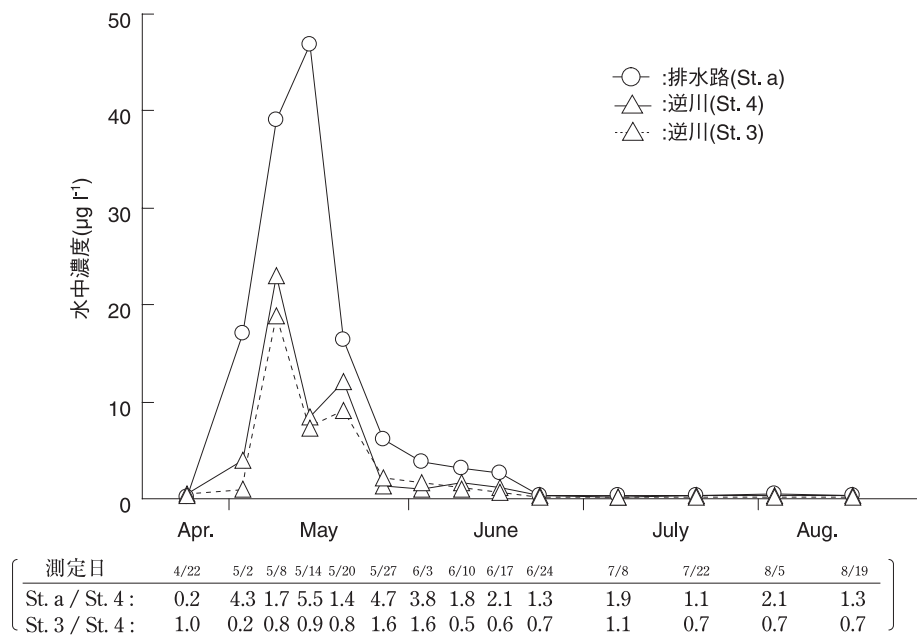


図3 逆川及び排水路における水稲用除草剤の水中濃度(15種類の合計値)の季節変動(2002年) 括弧内の数値は各測定日における希釈倍率を示す

表6 逆川、桜川及び霞ヶ浦における水中残留農薬の最高濃度、検出日及び検出頻度 (2001年度)

区分	農薬一般名	St. 3		St. 5		St. 6		St. 7		St. 8		St. 9		希釈倍率 St.6 → 7 St.6 → 8	
		最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度	最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度	最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度	最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度	最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度	最高値 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	検出 頻度		
	ベンスルフロンメチル	2.3	15-May 6/19	1.2	15-May 6/19	0.96	22-May 6/19	0.61	22-May 5/19	0.20	29-May 2/18	-	-	0/19 1.6	4.8
	イマゾスルフロン	0.54	15-May 4/19	1.5	15-May 8/19	1.2	22-May 7/19	0.60	22-May 7/19	0.24	5-June 2/18	-	-	0/19 2.0	5.0
	エスプロカルブ	0.33	15-May 3/19	0.70	15-May 6/19	0.88	22-May 4/19	0.44	22-May 4/19	0.11	29-May 1/18	-	-	0/19 2.0	8.0
	カフエントロール	1.6	15-May 5/19	1.0	15-May 8/19	0.68	22-May 8/19	0.34	22-May 7/19	0.19	29-May 2/18	-	-	0/19 2.0	3.6
	ジメタメトリン	0.17	15-May 4/19	0.15	15-May 7/19	0.14	22-May 4/19	0.074	22-May 4/19	0.046	29-May 1/18	-	-	0/19 1.9	3.0
	シメトリン	0.062	5-June 1/19	0.83	29-May 6/19	0.52	29-May 6/19	0.49	5-June 6/19	0.040	29-May 1/18	-	-	0/19 3.7	13
	ジメピベレート	0.11	15-May 2/19	0.42	15-May 7/19	0.17	22-May 6/19	0.091	22-May 2/19	-	-	0/18	-	0/19 1.9	
	ダイムロン	7.5	15-May 10/19	7.9	15-May 14/19	4.9	22-May 13/19	3.0	22-May 13/19	1.0	29-May 12/18	0.20	22-May 11/19	1.6	4.9
除草剤	チオベンカルブ	0.069	5-June 2/19	0.50	29-May 9/19	0.37	29-May 7/19	0.19	12-June 6/19	-	-	0/18	-	0/19 3.7	
	ピラゾスルフロンエチル	0.74	15-May 4/19	0.50	15-May 6/19	0.49	22-May 5/19	0.30	22-May 3/19	0.090	29-May 1/18	-	-	0/19 1.6	5.4
	ピリアチカルブ	0.26	15-May 4/19	0.23	15-May 6/19	0.12	22-May 5/19	0.060	22-May 2/19	-	-	0/18	-	0/19 2.0	
	ピリミノバクメチル (E体)	-	-	0/19	0.044	15-May 3/9	0.031	22-May 1/19	0.027	22-May 1/19	-	-	-	0/19 1.1	
	フタクロール	-	-	0/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/19	
	フレチラクロール	0.58	15-May 6/19	1.4	8-May 7/19	0.73	1-May 6/19	0.49	1-May 6/19	0.043	8-May 1/18	-	-	0/19 1.5	17
	ペンチキサゾン	0.077	15-May 1/19	0.14	1-May 5/19	0.081	1-May 4/19	0.042	1-May 3/19	-	-	0/18	-	0/19 1.9	
	メフェナセット	1.8	15-May 6/19	2.5	15-May 11/19	3.0	22-May 11/19	1.6	22-May 11/19	0.19	5-June 7/18	0.13	29-May 6/19	1.9	16
	モリネート	-	-	0/19	4.0	29-May 10/19	3.0	29-May 7/19	1.5	5-June 7/19	0.20	29-May 3/18	-	0/19 4.7	15
殺虫剤	フェニトロチオン	0.73	31-July 6/19	0.37	31-July 3/19	0.15	20-Mar 3/19	0.080	28-Aug. 3/19	-	-	0/18	-	0/19 1.9	
	フェノプロカルブ	0.44	29-May 5/19	0.45	22-May 8/19	0.15	29-May 4/19	0.10	5-June 4/19	-	-	0/18	-	0/19 1.5	

- : いずれの試料においても定量下限値以下であったことを示す

殺虫剤フェノブカルブ、フェニトロチオンの検出時期は水稲用除草剤とは大きく異なり、調査期間中常に低濃度で検出され、散発的にピークが観測され、除草剤のように一山型のピークではなかった(図4)。その要因としては、水稲作における殺虫剤の使用が空中散布を除いて除草剤ほど集中的に行われなかったこと、さらにフェノブカルブ、フェニトロチオンの水稲作以外への使用などが考えられた。丸(1991)の調査においても殺虫剤及び殺菌剤の河川中における水中最高濃度を精確に測定することは難しく、週に1回程度の測定では空中散布後に殺虫剤フェニトロチオンの明確な水中最高濃度の測定ができなかった調査例を報告している。今回の調査でも桜川流域において調査期間中にフェニトロチオンを含有する殺虫剤の空中散布(2001年7月26、27日)が行われたが、空中散布から4日後の測定(7月31日)で、St.5においてフェニトロチオンの濃度は $0.37\mu\text{g l}^{-1}$ であり、高い濃度としては検出されなかった。

一方、山谷ら(1981)は、フェニトロチオンを含む殺虫剤の空中散布当日より連日の調査を行い、散布直後に河川水中でフェニトロチオンを $27\mu\text{g l}^{-1}$ という高濃度で検出している。この検出例にあるように、空中散布など集中的な防除時における農薬の精確な動態を明らかにするためには、散布後に短期間において高頻度で集中した測定を行う必要があると考えられる。

桜川支流である逆川の源流域(St.1)からは調査対象農薬のいずれも検出されなかった。桜川支流の逆川(St.3)

は川幅2mほどの小河川であり、水田との距離は近いものの、集水域における水田率が低く、さらには、筑波山からの多量の湧き水により河川水中農薬濃度が希釈されるため、桜川と比較すると農薬の検出期間は短いものと推察された。このことは、St.3における除草剤の検出濃度水準が桜川と比べ同程度であるものの、検出頻度が総じて低いことから支持される(表6)。また、霞ヶ浦湖心(St.9)の湖水からはメフェナセット及びダイムロンの2剤のみが定量下限以上で検出された。図5にメフェナセット及びダイムロンのSt.5から霞ヶ浦湖心にいたる水中農薬濃度の月別変動を示した。桜川は流域全域に渡って水田が分布しており、中流から下流にかけては全域に渡り水田排水の流入があるため、中流(St.5)と下流(St.6)で検出される除草剤の最高濃度に大きな差はなく、調査期間中の最高濃度で比較すると0.8-2.5倍の範囲であった。霞ヶ浦掛馬沖(St.8)における最高濃度検出日は河口(St.7)における最高濃度検出日より1週間遅く、河口から掛馬沖までの水の移動には数日を要するものと推測された。霞ヶ浦の各調査地点における調査期間中の最高濃度を桜川下流(St.6)の結果と比較すると、St.7、St.8及びSt.9でそれぞれ $1/1.1\sim 1/4.7$ 、 $1/3.0\sim 1/17$ 及び $1/23\sim 1/25$ に低下した(表6)。下流(St.6)と比べ掛馬沖(St.8)及び湖心(St.9)で検出される除草剤の濃度が低いことから、桜川から流入する河川水中の残留農薬濃度が霞ヶ浦の水により急激に希釈されていることが示唆された。

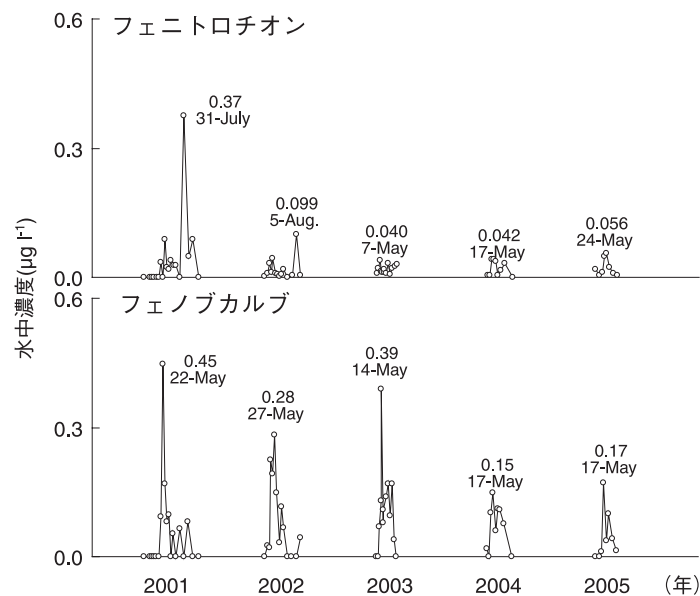


図4 桜川中流域(St.5)における殺虫剤濃度の年次別変動(2001~05年)
(定量下限値以下は0として作図)

* 図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

2002年に桜川流域の St.3付近の水田で田面水中の除草剤濃度調査を行った結果、有効成分としてイマズスルフロン (1.7%)、ダイムロン (28%) を含有するフロアブル剤を散布した水田において、散布当日にイマズスルフロン及びダイムロンがそれぞれ $110\mu\text{g l}^{-1}$ 、 $650\mu\text{g l}^{-1}$ を最高濃度として田面水より検出された (Vu et al., 2002, 2003)。田面水における最高濃度と桜川及び霞ヶ浦における最高濃度を比較すると、St.5、St.8でそれぞれ73~82倍、460~650倍の違いがあった。農薬取締法の登録保留基準では、水田水中濃度は人の健康への影響を防止する観点より公共用水域で維持すべき濃度水準の10倍以内とされているが、本試験の結果も登録保留基準の考え方の範囲内であった。

近年の水稲用除草剤の開発は目覚ましく、この20年間で有効成分の種類数は倍増している。一方、水稲作付面積は年々減少する傾向にある。有効成分の種類数の増加に伴い、使用される個々の有効成分の絶対量が低下し、さらには水系への流出量も低下しているものと考えられた。白石ら (1988) が1985年及び1986年に霞ヶ浦の湖水中のシメトリン濃度を調査した結果では、桜川河口 (St.7) 付近における検出最高濃度は $1.3\mu\text{g l}^{-1}$ (1985年)、 $2.2\mu\text{g l}^{-1}$ (1986年) であったのに対し、今回の調査では $0.49\mu\text{g l}^{-1}$ であった。茨城県におけるシメトリンの出荷量は1985年が30t (日本植物防疫協会, 1986) で2001年が4.5t (日本植物防疫協会, 2002) であり、およそ1/7に低下している。

したがって、出荷量減少に伴う使用量減少の結果が、河口におけるシメトリンの検出最高値の低下に反映しているものと推察された。

(4) 霞ヶ浦における農薬の垂直分布

図6に観測した2地点 (St.8, 10) における4種の除草剤 (エスプロカルブ、プレチラクロール、メフェナセット、カフェンストロール) の深度別濃度分布を示した。いずれの場所においてもすべての除草剤で最深部の濃度が高い傾向にあった。各除草剤の深度別測定濃度の平均値について一元配置分散分析を行ったところ、湖岸付近である大室船溜 (St.10) においてエスプロカルブ、プレチラクロール、メフェナセットの3剤でそれぞれ深度別測定濃度の平均値に危険率5%で有意差が認められた。深度別で濃度差が認められた要因としては、最深部のサンプル水により多量のSS (懸濁物質; Suspended Solid) が含まれることから、今回の分析法では分離しきれないSSに吸着している除草剤の影響が考えられた。統計上有意差が認められるものの、最深部と上部の濃度差は、平均値で比較すると St.10、St.8でそれぞれ1.1~1.7倍、1.1~1.3倍であり2倍を超えるものではなかった。高い波浪が発生した際に底泥の巻き上げが起きるほど水深が浅い霞ヶ浦では、桜川から霞ヶ浦に流入した残留農薬を含む河川水は速やかに混合され水中に分布しているものと考えられた。

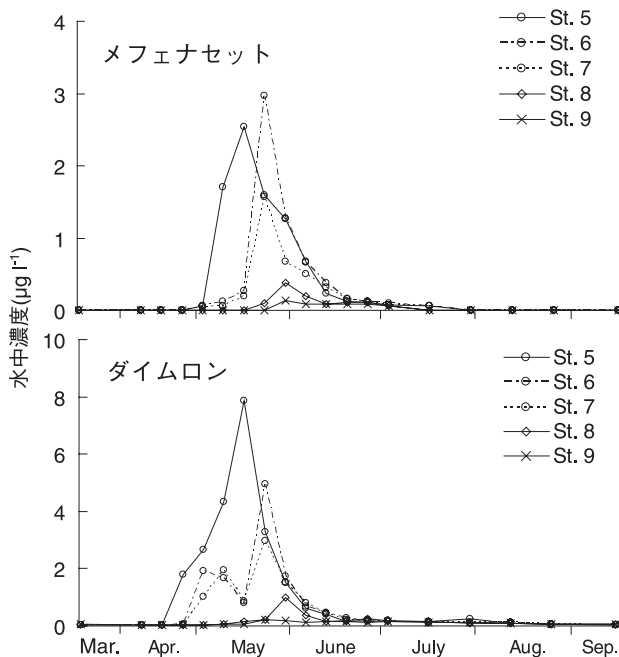


図5 桜川及び霞ヶ浦における除草剤メフェナセット及びダイムロンの水中濃度の変化 (2001年)

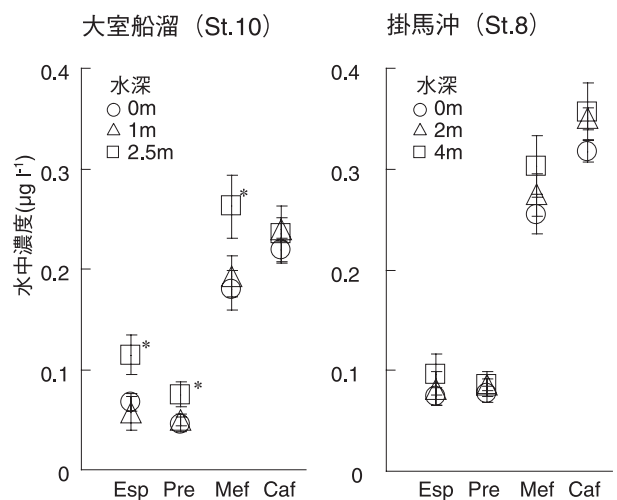


図6 霞ヶ浦における深度別の除草剤濃度の分布
左：大室船溜 (St.10)、右：掛馬沖 (St. 8)
(n=3, 2002年5月22日)

*一元配置分散分析で有意差あり ($p<0.05$)
(Esp: エスプロカルブ、Pre: プレチラクロール、Mef: メフェナセット、Caf: カフェンストロール)

(5) 桜川中流域における農薬濃度の年次変動

図7にSt.5において2001年から2005年の5年間の河川水中の除草剤(19剤)濃度を有効成分別に示した。また、同図には2001年から2004年の茨城県における除草剤の出荷量(a.i.、tonまたはkl)(日本植物防疫協会, 2002, 2003, 2004, 2005a)の年次変動も同時に示した。

St.5において水稲用除草剤が検出される時期は、最高濃度になる日から判断すると年次を問わず非常によく一致していた。これは霞ヶ浦用水の通水開始日が毎年一定であることが桜川流域の水稲作の日程を決定する要因となっており、この地域の水稲栽培作業の日程とそれに伴う農薬の使用時期が毎年ほぼ一致しているものと推論された。

各除草剤の茨城県における除草剤出荷量の2001年から2004年における変動は、オキサジクロメホン、シメトリン、ジメピペレート、モリネート、ブタクロールを除いては大きな変動は見受けられなかった。一時使用されていたブタクロールは2002年より使用が再開されており、その使用量は年々増加傾向にあった。このことはSt.5で検出されるブタクロールの濃度にも反映されていた。一方、ジメピペレートは茨城県における出荷量は年々低下しており、2004年以降St.5ではジメピペレートは検出されなくなった。オキサジクロメホンは2000年8月に新規登録された水稲用除草剤であり登録以降その使用量を増加させている。しかしながら、調査地域においても使用量が増えているものの、St.5の河川水中からはいずれの年においても定量下限以上で検出されなかった。これは、オキサジクロメホンは脂溶性が高く(logPow = 4.01)、土壌への吸着性も高い(BCPC, 2003)ため系外への流出が少ないと考えられた。モリネート及びシメトリンについては、農業要覧の集計によると、2004年度に

茨城県における出荷量が大幅に減少していたにもかかわらず、河川での検出水準が前年度と変わらなかった。流域における精確な使用量が明らかでないため推測となるが、この要因としては、モリネート及びシメトリンを含む製剤が調査地域近辺のホームセンターなどで多く取り扱われていること、及び前年度の在庫の使用といったことから、都道府県別出荷量集計に精確に反映されないホームセンターなどを通じた出荷があったことが可能性として挙げられる。

河川における水稲用除草剤濃度の年次変動の傾向と茨城県における水稲用除草剤の出荷量の年次変動の傾向はジメタメトリン、ジメピペレート、チオベンカルブ、ピラズスルフロンエチル、ブタクロール、ペントキサゾンについては概ね一致していた。一方、その他の水稲用除草剤については、必ずしも一致していなかった。主な相違点としては、2001年のイマズスルフロン、2002年のベンスルフロンメチル、カフェンストロール、メフェナセット、ピリブチカルブ及びピリミノバックメチル、2004年のモリネート及びシメトリンで、それらの検出結果と出荷量の傾向は必ずしも一致しなかった(図7)。以上の結果をまとめると、都道府県水準における水稲用除草剤の出荷量情報を基におおよその流域の流出予測が可能となるが、詳細な予測のためには流域における出荷量情報が必要であることを示唆するものである。現在農薬の県別出荷量情報の利用は、化学物質把握管理促進法(PRTR法)で指定されたものを除き、使用されてから1年後に出版される農業要覧の情報を引用する以外の方法がない。事前に流域水準の農薬流出予測を行うためには、より詳細で時宜を得た出荷量情報が閲覧できる体制の構築が待たれる。

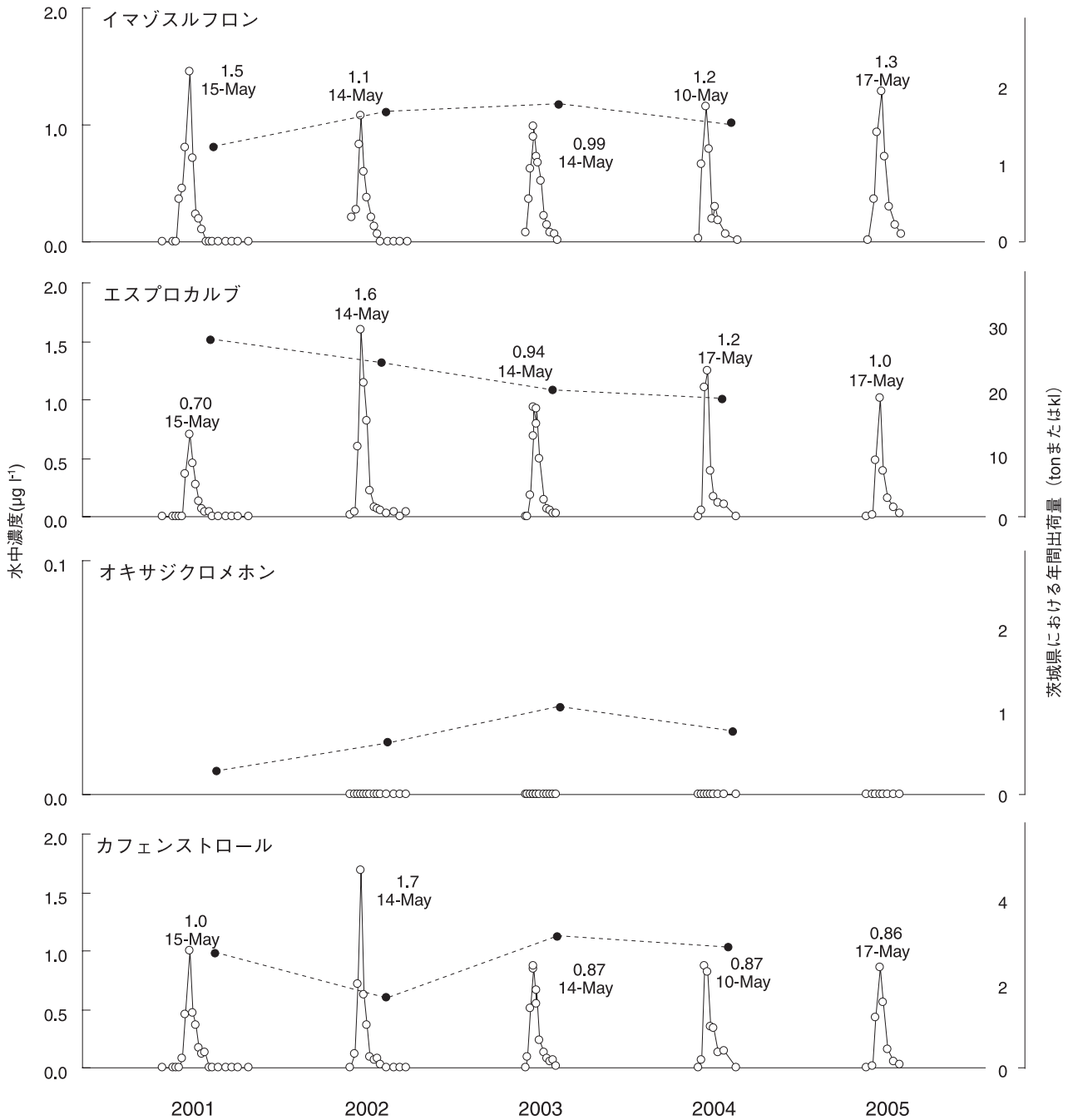


図7-1 桜川中流域 (St. 5) における除草剤濃度の年次別変動及び茨城県における出荷量の年次変動 (2001~05年)
 (定量下限値以下は0として作図) ○—○: 水中濃度、●-----●: 年間出荷量
 *図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

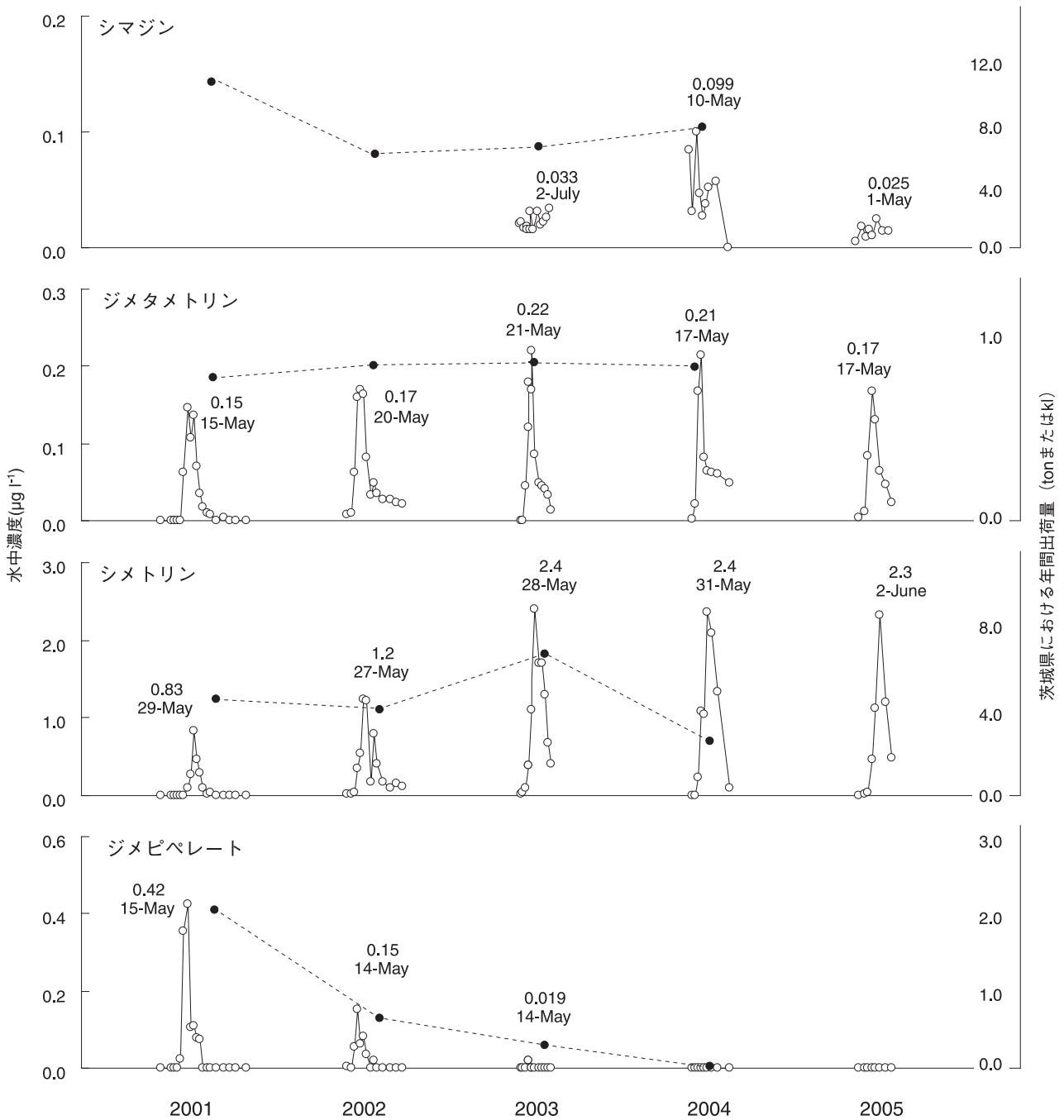


図7-2 桜川中流域 (St. 5) における除草剤濃度の年次別変動及び茨城県における出荷量の年次変動 (2001~05年)
 (定量下限値以下は0として作図) ○——○: 水中濃度、●-----●: 年間出荷量
 * 図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

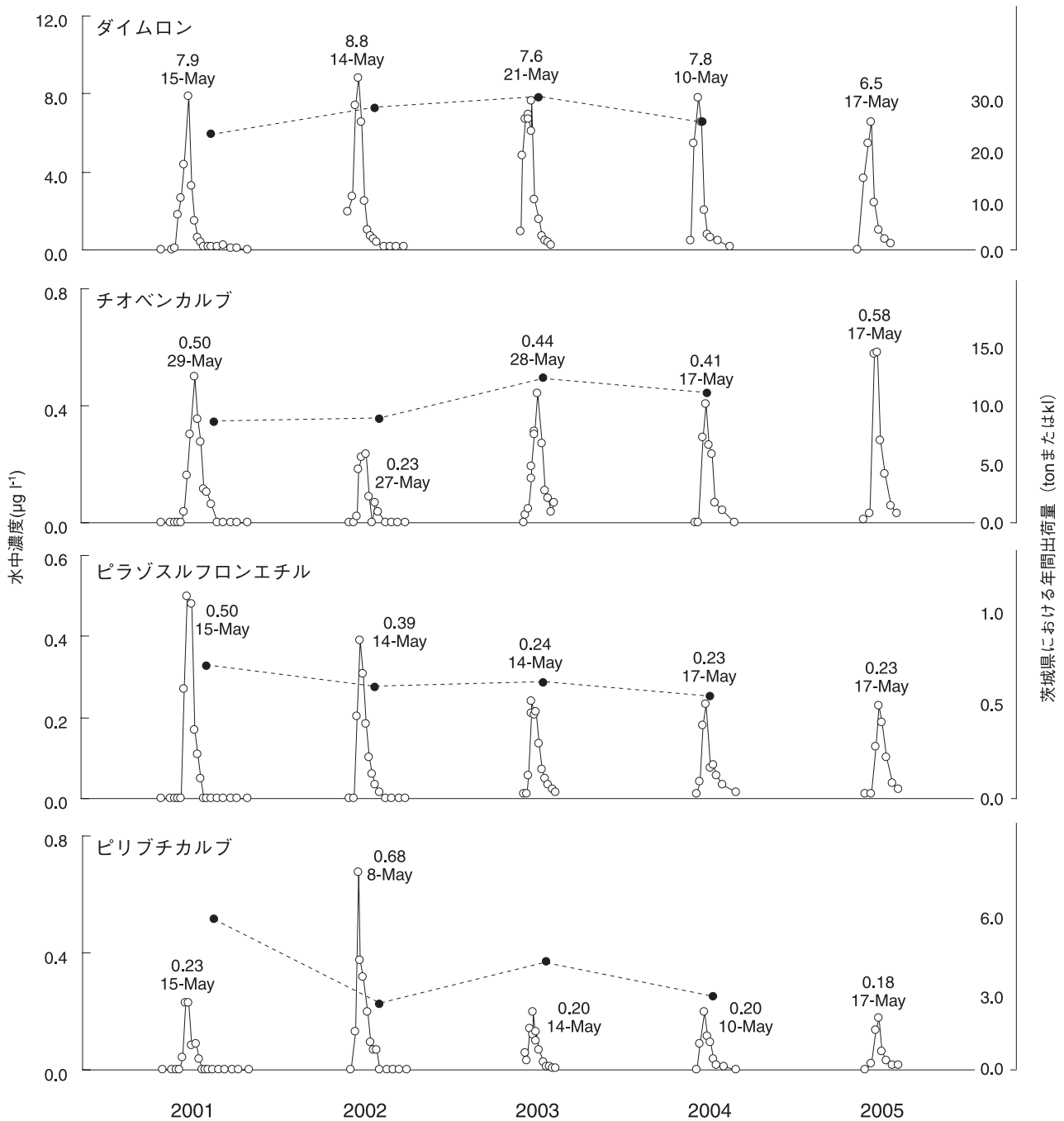


図7-3 桜川中流域 (St. 5) における除草剤濃度の年次別変動及び茨城県における出荷量の年次変動 (2001~05年)
 (定量下限値以下は0として作図) ○—○: 水中濃度、●—●: 年間出荷量
 *図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

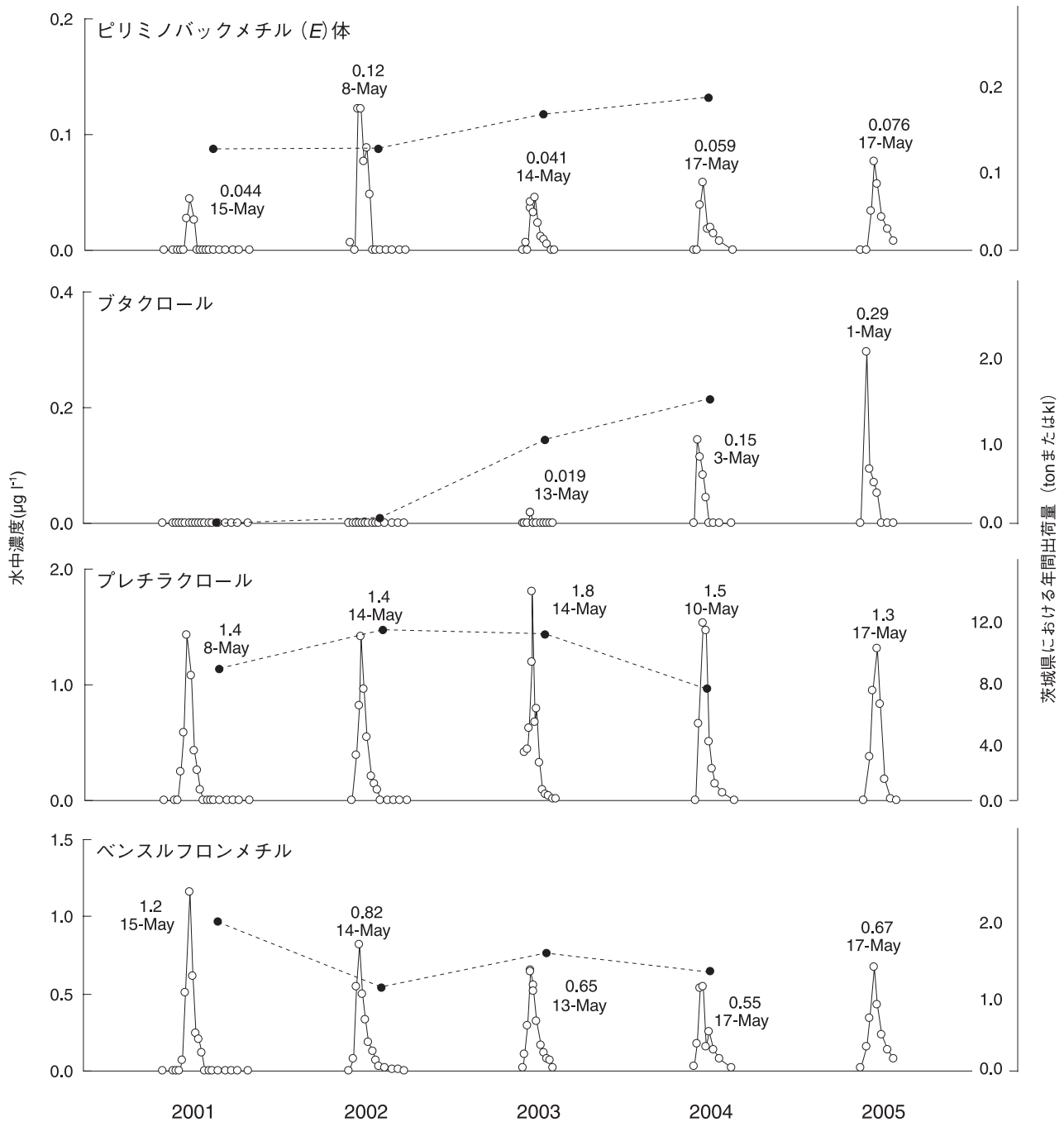


図7-4 桜川中流域 (St. 5) における除草剤濃度の年次別変動及び茨城県における出荷量の年次変動 (2001~05年)
 (定量下限値以下は0として作図) ○—○: 水中濃度、●- - -●: 年間出荷量
 * 図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

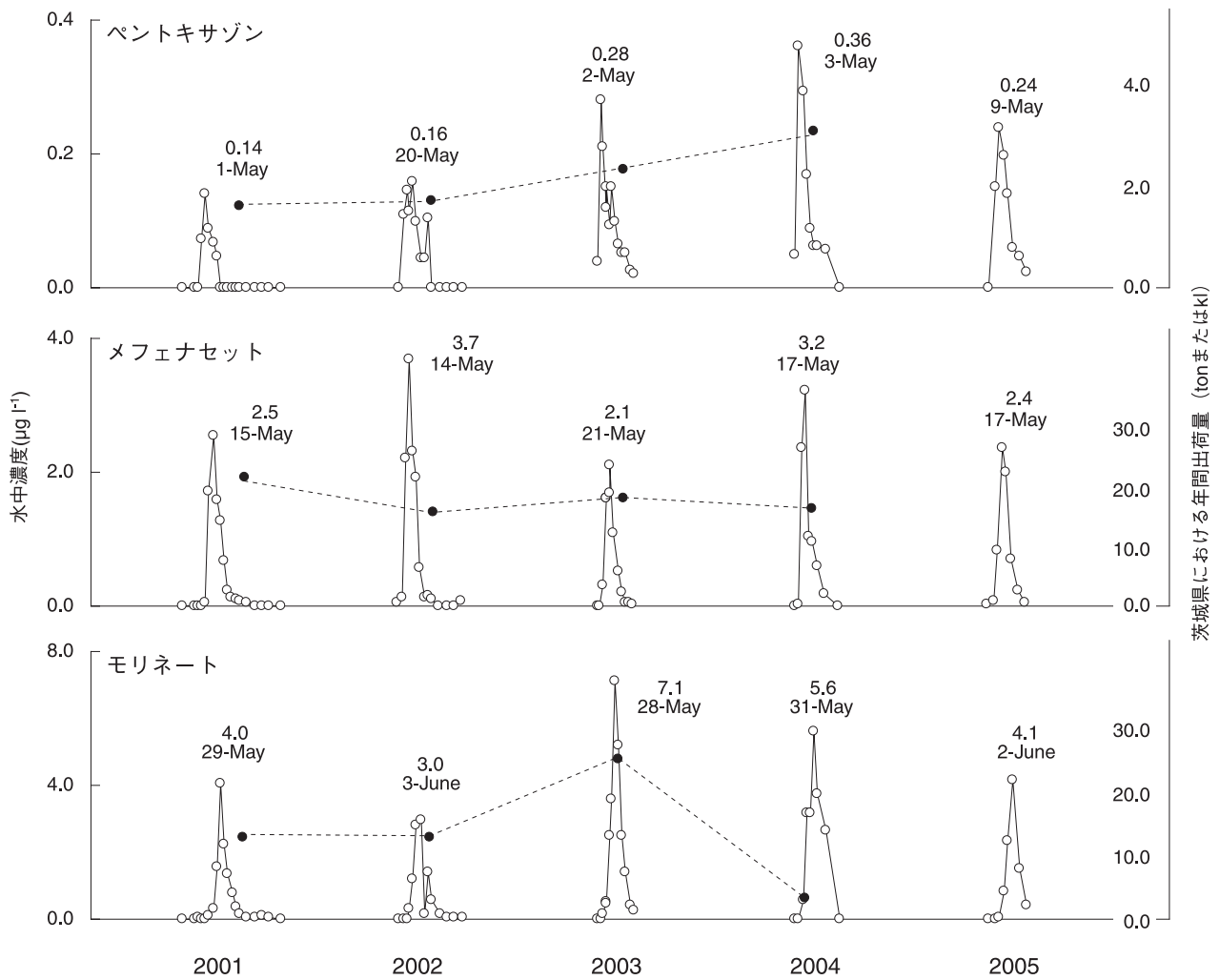


図7-5 桜川中流域 (St. 5) における除草剤濃度の年次別変動及び茨城県における出荷量の年次変動 (2001~05年)
 (定量下限値以下は0として作図) ○—○: 水中濃度、●- - -●: 年間出荷量
 * 図中の数値及び日付は、検出最高濃度及び検出日を示す

Ⅲ 系統保存されている藻類を用いた 水稲用除草剤の有害性評価

1 緒言

農薬等化学物質の藻類に対する有害性評価を目的とした試験指針の基礎は、藻類生産の潜在能力 (AGP; Algal Growth Potential) を測定する研究にある。AGP を測定する試験は、「生物の増殖は制限栄養物質に支配される」というリービッヒの最少律を基礎にした生物検定であり、藻類培養試験 (AAP; Algal Assay Procedure) と呼ばれ、主に湖沼等における富栄養化の評価に用いられていた。AGP に関する研究は、1956年 Bringmann らによって *Scenedesmus* を用いた研究が最初である (Bringmann et al., 1956)。続いて1964年ノルウェーの Skulberg (1964) によって *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名: *Selenastrum capricornutum*) を用いた実験が広範囲に実施され、その基礎が築かれた後、Maloney らにより詳細な検討が続けられた。そして、USEPA (Environmental Protection Agency) において1971年に淡水試験法 (USEPA, 1971)、続いて1974年に海水試験法の標準法 (USEPA, 1974) が制定された。しかし、これらの試験法は藻類生産の潜在能力及び環境水における藻類の生産能力の評価を目的としており、農薬等化学物質の有害性評価を目的として作られてはいなかった。有害性評価を目的とした試験指針については1978年に Miller らが前述の USEPA の試験法を毒性試験として使用できるよう修正したのを皮切りに ASTM (米国材料試験協会; American Society for Testing and Materials)、OECD 等においても検討が始まり現在に至っている。

2000年に我が国における農薬登録時の試験指針が見直された (農林水産省農産園芸局, 2000)。農薬生態影響評価と関連の深い「水産動植物への影響に関する試験成績」についても新規試験の追加及び現行ガイドラインの改訂が行われ、水産動植物への影響に関する試験成績に前述の浮遊性単細胞緑藻を試験生物とした藻類生長阻害試験が追加された。水界生態系において除草剤による影響を最も受けると考えられる生物は、生態学的食物連鎖の中では藻類などの生産者である。プランクトンを含めた植物群生は水界生態系においては一次生産、酸素発生、栄養循環、魚類等の生息・繁殖場・隠れ場等として重要な役割を担っている。しかし、これまで日本において非標的生物に対する農薬の影響評価は、経済的価値のある魚類や甲殻類に注目して行っていたため、農薬の非標的植

物に対する有害性 (植物毒性) の知見は乏しいのが現実である。

本章では、現行の OECD における浮遊性単細胞緑藻類の生長阻害試験指針に準拠し、試験推奨種である *P. subcapitata* 及び *Chlorella vulgaris* (共に浮遊性単細胞緑藻) の生長阻害試験を14種類の水稲用除草剤について行った。また、本試験指針に適応する緑藻以外の藻類種 (藍藻及び珪藻) の中から藍藻 *Merismopedia tenuissima* 及び珪藻 *Achnanthes minutissimum* を試験生物種として選定すると共に、上記14種類の水稲用除草剤について生長阻害試験を行った。

2 材料及び方法

(1) 試験生物

生長阻害試験には、綱の異なる4種の淡水産単細胞藻類 *C. vulgaris* NIES-227 (緑藻綱)、*P. subcapitata* ATCC22662 (緑藻綱)、*M. tenuissima* NIES-230 (藍藻綱) 及び *A. minutissimum* NIES-71 (珪藻綱) を用いた。試験指針への適応性の検討は、上記の *M. tenuissima* 及び *A. minutissimum* に加え、6種の藍藻 *Anabaena flos-aquae* NIES-73、*Aphanizomenon flos-aquae* NIES-81、*Microcystis aeruginosa* NIES-44、*Oscillatoria agardhii* NIES-204、*Oscillatoria raciborskii* NIES-207 及び *Spirulina subsalsa* NIES-27 について行った。*P. subcapitata* は ATCC (American Type Culture Collection) より、その他藻類については財団法人地球・環境フォーラム (現 独立行政法人国立環境研究所・環境研究基盤技術ラボラトリー) より分与された株を使用した。生長阻害試験に使用した藻類の顕微鏡像を写真1に示す。

(2) 試験生物の培養条件

C. vulgaris、*P. subcapitata* 及び *M. tenuissima* については、前培養及び試験に C 培地 (GEF, 1997) を使用した。*A. minutissimum* については Csi 培地 (GEF, 1997) の緩衝剤を HEPES から Tris-HCl、pH を 7.0 から 7.5 に改変した改良 Csi 培地を使用した。継代培養には両培地の寒天培地 (1.5%) を用いた。培養条件は白色蛍光灯による上部照明で照度約 4,000lux、連続照明、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。その他の藍藻の継代培養には CB 培地 (GEF, 1997) を使用し、培養条件は白色蛍光灯による上部照明で、照度約 4,000lux、連続照明、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。各培地の組成及び pH を表7に示す。

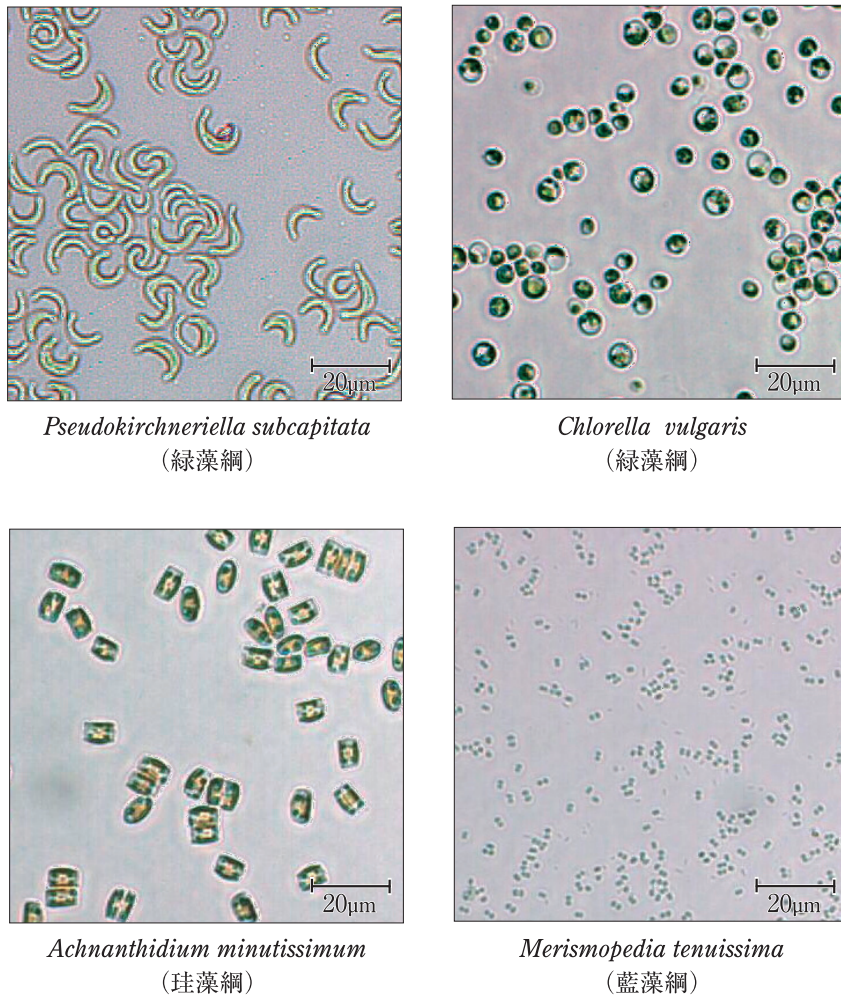


写真1 生長阻害試験に用いた藻類の明視野顕微鏡像

表7 各培地の組成及び pH 条件

成分	mg l ⁻¹		
	C培地	改良 Csi 培地	CB 培地
MgSO ₄ · 7H ₂ O	40	40	40
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	150	150	150
KNO ₃	100	100	100
Na ₂ · glycerophosphate · 5H ₂ O	50	50	50
VitaminB ₁₂	0.0001	0.0001	0.0001
Biotin	0.0001	0.0001	0.0001
Thiamine HCl	0.01	0.01	0.01
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	500	500	—
Bicine	—	—	500
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	—	100	100
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.59	0.59	0.59
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3	3	3
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.11	0.11	0.11
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.012	0.012	0.012
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.075	0.075	0.075
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.066	0.066	0.066
	pH7.5	pH7.5	pH9.0

表8 藻類に対する有害性評価を行った除草剤の一覧

除草剤の系	一般名	純度	水溶解度* (mg l ⁻¹)	Log Pow*	農薬登録年	有効成分の 標準施用量 (g ha ⁻¹)	有効成分の 出荷量 (t or kl) 2000年度	分析方法
カーバメート	エスプロカルブ	>99.0	4.9	4.6	1988	1500	312	GC/FTD
	ジメピペレート	>98.0	20	4.02	1986	3000	75	GC/FTD
	チオベンカルブ	>99.0	30	3.42	1969	1500	470	GC/FTD
	モリネート	>98.0	900	2.88	1971	2400	258	GC/FTD
酸アミド	カフェンストロール	>99.0	2.5	3.21	1996	700	111	LC/UV
	プレチラクロール	>99.0	50	4.08	1984	400	276	GC/FTD
	メフェナセット	>98.0	4	3.23	1986	1050	471	GC/FTD
トリアジン	ジメタメトリン	>99.0	50	3.8	1975	60	22	GC/FTD
	シメトリン	>99.0	400	2.6	1969	450	77	GC/FTD
スルホニルウレア	イマゾスルフロン	>99.0	308	0.049	1993	90	14	LC/UV
	bensulfuron methyl	>99.0	120	0.62	1987	170	63	LC/UV
キノン	キノクラミン	>99.0	22**	1.5	1968	2700	86	GC/FTD
尿素	ダイムロン	>99.0	1.2	2.7	1974	1500	551	LC/UV
ダイアジン	ベンタゾン	>99.0	570	-0.46	1975	3300	225	LC/UV

GC/FTD:ガスクロマトグラフィー (アルカリ熱イオン型検出器) ; LC/UV: 高速液体クロマトグラフィー (UV検出器)

* The twelfth Edition of The Pesticide Manual. (2001)、** Weed Research. Japan 38, 44-45 (1993)

(3) 試験に用いた除草剤

14種類の水稲用除草剤 (イマゾスルフロン、エスプロカルブ、カフェンストロール、キノクラミン、ジメタメトリン、シメトリン、ジメピペレート、ダイムロン、チオベンカルブ、プレチラクロール、bensulfuron methyl、ベンタゾン、メフェナセット、モリネート) について、藻類に対する有害性評価を行った。除草剤の選定は、第II章で分析対象とした除草剤を中心に、日本における使用量が多いもの及び藻類に対する有害性の報告があるものから選択した。試験にはすべて残留農薬試験用の分析用標準品 (和光純薬工業) を使用した。試験における各除草剤の最高暴露濃度は10,000µg l⁻¹とした。

水溶解度が10mg l⁻¹以下の除草剤については、水溶解度を最高濃度区とした。各除草剤の純度、水溶解度、オクタノール/水分配係数 (LogPow)、日本における農薬登録年、ヘクタール当たりの標準施用量、2000年度の日本における年間出荷量及び分析手法を表8に示す。

(4) 藻類生長阻害試験

OECDの試験指針 (OECD, 1984) に準じて試験条件を設定した。除草剤の溶解補助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO、≤0.1%) を使用した。容量300mlの三角フラスコに各濃度に調製した培地100mlを入れた。公比は、影響範囲の確認試験 (1連、3~4濃度区)、及びEC₅₀ (半数生長阻害濃度; 50% Effective Concentration) の算出試験 (3連、5濃度区) でそれぞれ5.0~10、1.6~2.5とした。このフラスコに前培養を3~4日間行い、対

数増殖期にある細胞を接種し、シリコン製の通気性栓をして試験を開始した。試験開始時の細胞数は *C. vulgaris*、*P. subcapitata*、*M. tenuissima* 及び *A. minutissimum* でそれぞれ1×10⁴、1×10⁴、3×10⁵、5×10³ cells ml⁻¹とした。各フラスコは、振とう機 (RS-200、Sibata) で72時間振とう (100rpm) 培養した。細胞数はフローサイトメーター (PAS flow cytometer、partec GmbH) により計測した。細胞数の計測は試験開始時及び24時間毎に72時間まで行った。

試験溶液中の除草剤濃度はHPLC/UV (High Performance Liquid Chromatography/UV Detection: 高速液体クロマトグラフィー/UV検出器、HITACHI 7000シリーズ) 及びGC/FTD (SHIMADZU GC-17A Gas Chromatography/Flame Thermionic Detection: ガスクロマトグラフィー/アルカリ熱イオン型検出器) を用いて試験開始時に測定を行った。エンドポイントはEC₅₀ 0-72hの増殖阻害率とし、以下の2つの方法により算出した。

1) 生長速度の比較 (速度法) による生長阻害率 (Im)

指数増殖をしている培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度 (μ) を(1)の式より算出した。

$$\mu = (\ln N_n - \ln N_1) / (t_n - t_1) \dots \dots \dots (1)$$

N₁: t₁時の細胞濃度 (cells ml⁻¹)

N_n: t_n時の細胞濃度 (cells ml⁻¹)

表9 藻類生長阻害試験方法の概要

供試生物	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Merismopedia tenuissima</i> , <i>Achnanthydium minutissimum</i>
培地	C培地： <i>C. vulgaris</i> , <i>P. subcapitata</i> 及び <i>M. tenuissima</i> , 改良Csi培地： <i>A. minutissimum</i>
温度	23 ± 2°C
照度	約 4,000 lux
試験容器	300ml三角フラスコ、シリコン製の通気栓、培地量は100ml
培養方法	約100rpmの旋回振とう機による振とう培養
試験区数と公比	5濃度区+対照区+溶解剤対照区の計7区、公比=1.6-2.5、各区3連
細胞の計測	試験開始時及び24時間毎に72時間まで計測
試験開始時の細胞数	<i>C. vulgaris</i> 及び <i>P. subcapitata</i> = 1×10^4 cells ml ⁻¹ <i>M. tenuissima</i> = 3×10^5 cells ml ⁻¹ <i>A. minutissimum</i> = 5×10^3 cells ml ⁻¹
エンドポイント	EbC ₅₀ 及びErC ₅₀

t₁ : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度 (μ) から各濃度区における平均生長速度の低下百分率を(2)の式により算出した。

$$I_m = ((\mu_c - \mu_t) / \mu_c) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

μ_c : 溶解補助剤対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区の平均生長速度

2) 生長曲線下の面積の比較 (面積法) による生長阻害率 (I_A)

生長曲線下の面積は(3)の式により算出した。

$$A = (N_1 - N_0/2) \times t_1 + (N_1 + N_2 - 2N_0/2) \times (t_2 - t_1) + (N_{n-1} + N_n - 2N_0/2) \times (t_n - t_{n-1}) \dots \dots \dots (3)$$

A : 成長曲線下の面積

N₀ : 暴露開始時の細胞濃度 (cells ml⁻¹)

N₁ : t₁時の細胞濃度 (cells ml⁻¹)

N_n : t_n時の細胞濃度 (cells ml⁻¹)

t₁ : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率 (I_A) を(4)の式により算出した。

$$I_A = ((A_c - A_t) / A_c) \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

A_c : 溶解補助剤対照区の生長曲線下の面積

各濃度区の生長阻害率を上記面積法及び速度法により求め、濃度-生長阻害曲線を作図し、最小二乗法により ErC₅₀ 0-72h を算出した。すべての試験で試験開始時における除草剤濃度の分析値を EC₅₀ 0-72h の算出に使用した。なお、以降、EC₅₀を速度法により求めた場合は ErC₅₀、面積法により求めた場合は EbC₅₀と記載する。

本研究で行った藻類生長阻害試験方法の概要を表9に示す。

3 結果

(1) 試験指針への適用性の検討

水系には様々な藻類が生息しているが、人工培地中で安定して培養できる試験生物に適した種類は限られている。培養の容易さ、増殖力等を考慮し OECD の試験指針に適應できる珪藻及び藍藻の検討を行った。その結果、藍藻 *M. tenuissima* は、試験開始時の細胞数を変更することで、緑藻の生長阻害試験の試験指針に適用可能であり、珪藻 *A. minutissimum* は、試験開始時の細胞数を変更し、緑藻の培地にメタケイ酸ナトリウム・九水和物を添加することで、適應可能であった。さらに、これら2種の藻類は寒天培地 (1.5%) 上でも培養が可能であった。このことは、液体培地による継代培養と比べ、試験生物の維持が容易になることを意味し、本2種が試験生物として有用であると判断した。一方、その他の藍藻については、緑藻の培地中での生長能は低く、また、寒天培地 (1.5%) 上での安定した継代培養も不可能であった。そのため、現行の試験指針への適用性は低いと評価した。

(2) 各藻類の除草剤感受性について

OECDの藻類生長阻害試験の試験指針については、現在改訂の作業が進められている。改訂版の試験指針では、「科学的に正しいエンドポイントは、試験期間中に指数増殖期が維持されている限りでは、ErC₅₀である」とされている (OECD, 2002)。しかし、現行の試験指針では、ErC₅₀及びEbC₅₀の両方を算出することが求められているため、これまでの藻類の薬剤感受性に関する報告、論文等ではEbC₅₀がエンドポイントとして示されていることが少なくない。そこで、本論文では、過去のデータとの比較を考慮し、ErC₅₀及びEbC₅₀の両方の値を示した。

各藻類の除草剤感受性について、除草剤の系別に EC₅₀ 0-72h 値を比較することにより結果の考察を行った。4

種藻類の14種水稲用除草剤感受性 (EC₅₀ 0-72h) を表10に示す。

1) カーバメート系除草剤

4種類のカーバメート系除草剤に対する4種藻類の感受性は *P. subcapitata*、*A. minutissimum*、*C. vulgaris*、*M. tenuissima* の順に高かった。4種藻類間における感受性差(最も大きいErC₅₀ 0-72h値と最も小さいErC₅₀ 0-72h値との差)は、エスプロカルブ、ジメピペレート、チオベンカルブ及びモリネートでそれぞれ、>41、>9.1、>130及び>24倍であった。緑藻 *P. subcapitata* のチオベンカルブ感受性が最も低いErC₅₀ 0-72h値 (78µg l⁻¹) を示した。

表10 4種藻類の除草剤に対する感受性

速度法で算出したErC₅₀

除草剤の系統	一般名	72-h ErC ₅₀ , µg l ⁻¹ (95% confidence limits)							
		<i>P. subcapitata</i>		<i>C. vulgaris</i>		<i>A. minutissimum</i>		<i>M. tenuissima</i>	
カーバメート	エスプロカルブ	150	(130-180)	>2000	-	860	(580-1300)	>6100	-
	ジメピペレート	1100	(900-1300)	>10000	-	2300	(2000-2700)	>10000	-
	チオベンカルブ	78	(52-120)	>7600	-	1200	(1200-1300)	>10000	-
	モリネート	410	(300-580)	5000	(4200-6100)	5100	(4000-6500)	>10000	-
酸アミド	カフェンストール	4.6	(3.1-6.9)	>100	-	>1000	-	>1000	-
	プレチラクロール	3.7	(3.1-4.5)	>44	-	340	(160-910)	>10000	-
	メフェナセット	61	(52-72)	>2400	-	2800	(2600-3000)	>4000	-
トリアジン	ジメタメトリン	6.0	(4.9-7.5)	6.9	(6.0-8.0)	3.8	(3.0-5.0)	1.3	(1.0-1.7)
	シメトリン	37	(30-46)	140	(110-190)	51	(43-60)	16	(13-20)
スルホニルウレア	イマゾスルフロン	1000	(620-2000)	>10000	-	>10000	-	37	(33-42)
	ベンスルフロンメチル	62	(46-85)	>10000	-	>10000	-	1.5	(1.3-1.7)
その他	キノクラミン	113	(90-140)	180	(150-210)	17	(10-29)	21	(20-22)
	ダイムロン	>1000		>1000	-	>1000	-	>1000	-
	ベンタゾン	>10000		>10000	-	>10000	-	>10000	-

面積法で算出したEbC₅₀

除草剤の系統	一般名	72-h EbC ₅₀ , µg l ⁻¹ (95% confidence limits)							
		<i>P. subcapitata</i>		<i>C. vulgaris</i>		<i>A. minutissimum</i>		<i>M. tenuissima</i>	
カーバメート	エスプロカルブ	110	(47-250)	>2000	-	320	(120-600)	4700	(3300-6700)
	ジメピペレート	530	(360-790)	>10000	-	1700	(480-6600)	>10000	-
	チオベンカルブ	54	(39-76)	3600	(2600-4900)	650	(440-940)	5800	(1100-3200)
	モリネート	290	(230-360)	3500	(1600-7300)	4100	(3000-5634)	4500	(3900-5300)
酸アミド	カフェンストール	4.3	(3.8-4.9)	>100	-	>1000	-	>1000	-
	プレチラクロール	1.7	(0.72-3.8)	17	(9.2-36)	86	(29-280)	2300	(1300-4600)
	メフェナセット	41	(24-71)	1400	(220-6200)	1400	(610-3200)	>4000	-
トリアジン	ジメタメトリン	3.2	(2.6-4.1)	3.3	(2.6-4.1)	1.5	(0.71-3.2)	0.30	(0.26-0.35)
	シメトリン	12	(6.7-20)	18	(2.2-59)	25	(14-43)	5.2	(2.7-9.7)
スルホニルウレア	イマゾスルフロン	200	(120-330)	>10000	-	>10000	-	10	(7.6-13)
	ベンスルフロンメチル	16	(8.5-29)	1900	(1000-3500)	>10000	-	0.70	(0.48-1.0)
その他	キノクラミン	200	(170-230)	87	(21-270)	7.8	(4.6-13)	13	(8.6-20)
	ダイムロン	>1000		>1000	-	>1000	-	>1000	-
	ベンタゾン	>10000		>10000	-	>10000	-	1100	(620-2000)

2) 酸アミド系除草剤

3種類の酸アミド系除草剤に対する感受性もカーバメート系除草剤と同様に *P. subcapitata*、*A. minutissimum*、*C. vulgaris*、*M. tenuissima* の順に高かった。4種藻類間における感受性差は、カフェンストロール、プレチラクロール及びメフェナセットでそれぞれ、>220、>2700及び >66倍と大きな値を示した。

3) トリアジン系除草剤

ジメタメトリン及びシメトリンは、すべての試験で ErC_{50} 0-72h の算出が可能であった。ジメタメトリン及びシメトリンに対する感受性は、藍藻 *M. tenuissima* で一番高く、 ErC_{50} 0-72h 値はそれぞれ $1.3\mu\text{g l}^{-1}$ 及び $16\mu\text{g l}^{-1}$ であった。4種藻類間における感受性差は、ジメタメトリン及びシメトリンでそれぞれ、5.3及び8.8倍であり、藻類間における感受性差は小さかった。

4) スルホニルウレア系除草剤

2種類のスルホニルウレア系除草剤に対する感受性は *P. subcapitata* 及び *M. tenuissima* で高く、*C. vulgaris*、*A. minutissimum* で低かった。イマゾスルフロン及びベンスルフロンメチルに対する感受性は、藍藻 *M. tenuissima* で一番高く、 ErC_{50} 0-72h 値はそれぞれ $37\mu\text{g l}^{-1}$ 及び $1.5\mu\text{g l}^{-1}$ であった。4種藻類間における感受性差は、イマゾスルフロン及びベンスルフロンメチルでそれぞれ、>270及び >6,700倍であり、藻類間における感受性差は大きかった。

5) キノクラミン

本剤もトリアジン系除草剤と同様にすべての試験で ErC_{50} 0-72h の算出が可能であった。キノクラミンに対する感受性は、珪藻 *A. minutissimum* で一番高く、その ErC_{50} 0-72h 値は $17\mu\text{g l}^{-1}$ であった。4種藻類間における感受性差は、11倍でありトリアジン系除草剤と同様に小さかった。

6) ダイムロン

本剤はすべての試験で ErC_{50} 0-72h の算出が不可能であった。本剤の試験結果は水溶解度付近 ($1,000\mu\text{g l}^{-1}$) の濃度で暴露試験を行ったものであるが、いずれの藻類も $1,000\mu\text{g l}^{-1}$ の濃度での暴露では生長に影響は見られなかった。

7) ベンタゾン

本剤はすべての試験で ErC_{50} 0-72h の算出が不可能であった。本剤の試験結果は $10,000\mu\text{g l}^{-1}$ を最高濃度として暴露試験を行ったものである。藍藻 *M. tenuissima* を除く3種の藻類は影響 $10,000\mu\text{g l}^{-1}$ の濃度での暴露で生長に影響は見られなかった。藍藻 *M. tenuissima* は $10,000\mu\text{g l}^{-1}$ の濃度での暴露で若干の生長阻害が見られたものの、 ErC_{50} 0-72h の算出はできなかった。藍藻 *M. tenuissima* については、面積法による EbC_{50} 0-72h は可能であった (EbC_{50} 0-72h = $1,100\mu\text{g l}^{-1}$)。

4 考察

2種類の緑藻 *C. vulgaris* 及び *P. subcapitata* は、いずれも OECD の藻類生長阻害試験の試験指針で試験推奨種とされている。しかし、これまでの報告 (Shigeoka et al., 1988; Kasai et al., 1993) で、*C. vulgaris* の化学物質に対する感受性が *P. subcapitata* と比べて低いことが指摘されている。本研究においても、14種類すべての除草剤で、*C. vulgaris* の感受性が *P. subcapitata* と比べて低かった。その差は最大で160倍以上 (ベンスルフロンメチル) であった。このことより、OECD の試験推奨種であるとしても、薬剤感受性が大きく異なる2種の試験結果をリスク評価で同等に扱うべきではないと考えられた。*C. vulgaris* と *P. subcapitata* の薬剤感受性差については、膜透過性の違いやクロレラが細胞の外側に鞘を有することなどが要因として考えられている (Torres et al., 1976; Kasai et al., 1993)。しかし、本研究結果では、*C. vulgaris* と *P. subcapitata* のトリアジン系除草剤であるジメタメトリンとシメトリン及びキノクラミンに対する感受性差は、それぞれ、1.2、3.8及び1.6と小さく、感受性の違いが、膜透過性の違いや鞘の有無だけでは説明できないことが示唆された。

P. subcapitata は薬剤感受性が高く、その試験結果は生態リスク評価の初期段階で世界的に使用されている。日本においても、藻類の生長阻害試験では *P. subcapitata* の使用が推奨されており、生態リスク評価にも利用されている。本種は藻類の中でも感受性が高いという理由から、農薬の登録保留基準の判定では不確実計数を掛けることなく *P. subcapitata* の毒性値 (EC_{50}) がそのまま利用されている。しかし、必ずしも *P. subcapitata* の感受性がすべての農薬に対して最も高いものではないことが、本研究のトリアジン系除草剤、スルホニルウレア系除草剤及びキノクラミンの試験結果から明らかになった。トリアジン系及びスルホニルウレア系除草剤に最も感受性が高

かったのは、4種藻類のうち、藍藻 *M. tenuissima* であった。*M. tenuissima* のトリアジン系及びスルホニルウレア系除草剤に対する EC_{50} 0-72h 値は、*P. subcapitata* と比較して、平均でそれぞれ1/4及び1/30と低い値であった。一方、キノクラミンに最も感受性が高かったのは、珪藻 *A. minutissimum* であり *A. minutissimum* のキノクラミン感受性は、*P. subcapitata* と比べ1/5低かった。これらの結果から、精度の高い生態リスク評価を行うには藻類の除草剤に対する感受性差を考慮し、緑藻だけでなく複数種の藻類を供試対象として影響を見ることが重要であることが示された。

IV 回復性を考慮した影響評価手法の開発

1 緒言

現在、農業等化学物質の生態リスク評価には、限られた生物種における実験室レベルの試験結果が利用されている。水生の一次生産者に対する影響評価に関しては、初期段階の評価で淡水産浮遊性単細胞緑藻に対する生長阻害試験の結果が利用されている。影響評価指標には、 EC_{50} 、NOEC、LOEC 等の毒性値が用いられる (OECD, 1984; ISO, 1989; USEPA, 1996)。藻類生長阻害試験に関する各種指針では、試験終了時における細胞形態の観察結果を毒性値と共に報告することを求めている。しかし、微細藻類の大きさは、直径10~20 μ m 程度であり、形態の変化を光学顕微鏡による観察で評価することは難しい。そのため、生長阻害下の藻類細胞の形態については詳細を検討されないことが多い。また、化学物質による影響からの回復性は個体群へ及ぼす影響を推測する上で重要な情報であるにもかかわらず、的確に評価がされていないのが現状である。化学物質の急性的な生長阻害のみで有害性を評価する現行の方法では、農業の生物に対する可逆的な影響を評価できない。実際の環境に近いシナリオを反映するためには、一時的な影響だけでなく、農業による影響からの回復性について明らかにすることが重要であると考えられる。

細胞の形態変化を解析する手法としてフローサイトメトリーがある。フローサイトメーターを用いた細胞の計測手法では、試料中に含まれる細胞一つずつの大きさ、形状、内部構造等を散乱光や蛍光強度の数値で測定し、ヒストグラムを作成することにより細胞群集の形態を比較することが可能である。そのためフローサイトメトリーは、生命工学や臨床検査などの分野で重要な役割を担う技術となっている (中内, 2004)。また近年では、微細

藻類が発する赤色自家蛍光を測定する技術を応用した、ピコプランクトン等海産植物プランクトンの生態に関する研究 (Chisholm et al., 1988) や、化学物質の藻類に対する影響評価への利用も進められている (Berglund et al., 1988; Troussellier et al., 1993; Franqueira et al., 2000; Stauber et al., 2002; Franklin et al., 2004)。

有害物質による微細藻類細胞の形態変化についての報告は非常に少ない。すなわち、トリアジン系及びフェニルウレア系除草剤の暴露による緑藻 *Chlorella vulgaris* 細胞の肥大化 (Rioboo et al., 2002)、殺虫剤メチルパラチオンの暴露による緑藻 *Chlorella protothecoides* 細胞の肥大化 (Saroja et al., 1982)、銅の暴露による珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* 細胞の肥大化及び自家蛍光強度の増加 (Reiriz et al., 1994; Cid et al., 1995) 等の報告があるものの、細胞形態の変化と作用機構との関連を比較・考察した研究は少ない。

本章では、まず、40種類の除草剤を用い、生長阻害下の *P. subcapitata* 細胞について、フローサイトメーターで側方散乱光強度 (Side Scatter 強度; 以下、SSC 強度という) 及びクロロフィル a の自家蛍光強度 (Autonomous Fluorescence, 610nm; 以下、 AF_{610} 強度という) を測定し、ドットプロットを作図した。各薬剤でのドットプロット分布の特徴から、除草剤が藻類細胞の形態に及ぼす影響を類型化した。さらに、7種類の除草剤について、生長阻害下の *P. subcapitata* 細胞を、除草剤を含まない培地で再度培養し、生長速度、ドットプロット分布及び細胞形態を対照区と比較して、*P. subcapitata* 細胞の除草剤による影響からの回復性を形態及び生長速度の面から評価した。

なお、SSC は光軸に対して90度の位置で検出する光であり、細胞の顆粒や細胞内構造の状態に散乱光強度が関連しているとされている。SSC 強度の値が相対的に大きいことは細胞の内部構造が複雑であることを示し、SSC 強度の値が小さければ細胞の内部構造は単純であると考えられている。*P. subcapitata* 細胞の場合、SSC 強度は細胞の大きさとよく対応する。一方、 AF_{610} 強度は一般に細胞内のクロロフィル a 含量と比例すると考えられており、相対的に AF_{610} 強度の値が小さければ細胞のクロロフィル a 含量が少ない傾向にあると考えられる。但し、 AF_{610} 強度については、高温条件下で植物細胞の自家蛍光強度が上昇するとの報告もあり (園池, 2005)、ストレス条件下においては単純にクロロフィル a 含量と比例するものではない。

2 材料及び方法

(1) 試験生物

除草剤の影響による形態変化の類型化には、網の異なる3種の淡水産単細胞藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* ATCC22662 (緑藻綱)、*Merismopedia tenuissima* NIES-230 (藍藻綱) 及び *Achnantheidium minutissimum* NIES-71 (珪藻綱) を用いた。除草剤による影響からの回復性の検討は、*P. subcapitata* を使用した (写真1)。

(2) 試験生物の培養条件

前培養及び試験には、*P. subcapitata* 及び *M. tenuissima* についてはC培地 (GEF, 1997) を使用し、*A. minutissimum* については改良 Csi 培地 (GEF, 1997) を使用した (表7)。培養条件は白色蛍光灯による上部照明で照度約4,000lux、連続照明、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。

(3) 試験に用いた除草剤

試験に用いた40種類の除草剤を HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) による作用機構の分類に基づいて水溶解度と共に表11に示した。使用した除草剤は日本において農薬の登録があるもの、もしくは過去に登録されていたものから水稲用除草剤を中心に選択した。試験にはすべて分析用標準品を使用した。

(4) 生長阻害率及び形態変化の類型化に関する試験

各除草剤1.0mgを秤量し、100 μl のアセトンに溶解した。このアセトン溶液30 μl を50ml三角フラスコ中の液体培地30mlに懸濁し、試験溶液 (10mg l⁻¹溶液) を調整した。ここに試験生物を接種し、試験開始とした。水溶解度が10mg l⁻¹以下である除草剤については、培養液中に被検物質の沈殿を生じたが、沈殿物がある状態 (飽和状態) で暴露を行った。いずれの試験も前培養を72時間行い対数増殖期にある細胞を接種した。初期細胞密度は *P. subcapitata*、*M. tenuissima* 及び *A. minutissimum* のそれぞれについて 5×10^4 、 3×10^4 、 1×10^4 cells ml⁻¹ とし、暴露を72時間行った。暴露終了後にフローサイトメーター (PAS flow cytometer, partec GmbH) を用いて細胞数を計測し、対照区 (溶媒対照区; アセトン1,000 mg l⁻¹) の細胞数と比較した。生長阻害率は面積法により算出した。形態変化の類型化には、フローサイトメーターを用いて SSC 強度及び AF₆₁₀ 強度を測定し、ドットプロット及びヒストグラム (図8) を作図すると共に、試験溶液を一部取り出し正立顕微鏡により明視野及び蛍光観察 (共に400倍で観察) を行い、観察試料中の藻類細胞の肥大及び白化を観察した。SSC 及び AF₆₁₀ 強度のヒストグラムについては、それぞれの平均値をフローサイトメーター付属のソフト (partec, FloMax ver.2.0) を用いて求め、対照区の平均値と比較した。

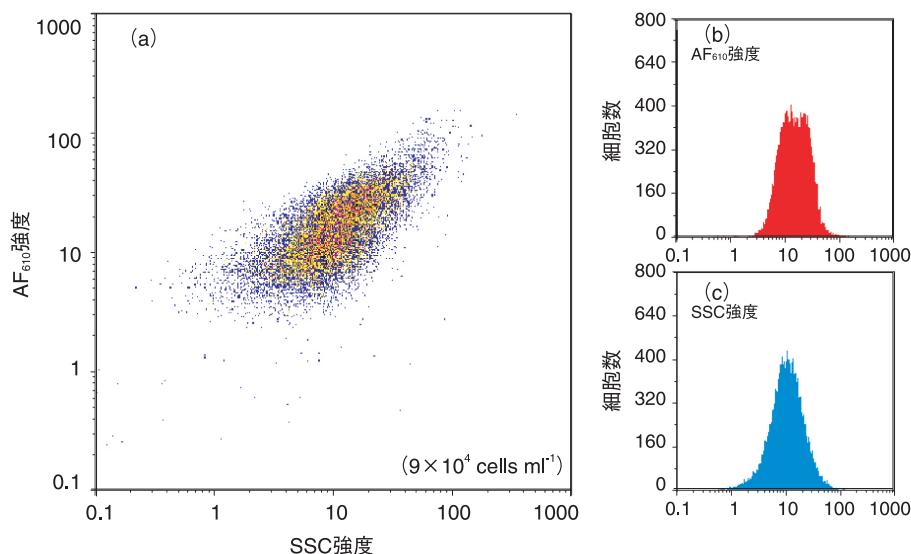


図8 対照区における *P. subcapitata* 細胞群の AF₆₁₀ 及び SSC 強度のドットプロットとヒストグラム
(a) : ドットプロット図、(b) : AF₆₁₀ (クロロフィル a 自家蛍光) 強度のヒストグラム
(c) : SSC (側方散乱光) 強度のヒストグラム

表11 供試した除草剤の作用点と水溶解度及び10mg l⁻¹もしくは飽和濃度で72時間暴露した3種藻類の生長阻害率

HRAC Group	作用点	除草剤名	水溶解度 [#] (mg l ⁻¹)	生長阻害率*		
				<i>P. subcapitata</i>	<i>M. tenuissima</i>	<i>A. minutissimum</i>
A	ACC ¹⁾	シハロホップブチル	0.4	-	++	++
		アジムスルフロ	1100	++++	++++	++
B	ALS ²⁾	イマズスルフロ	310	++++	++++	-
		ピラズスルフロエチル	10	++++	++++	-
		ベンスルフロメチル	120	++++	++++	-
		アトラジン	33	++++	++++	++++
C1	PS II ³⁾	シアナジン	170	++++	++++	++++
		シマジン	6.2	++++	++++	++++
		ジメタメトリン	50	++++	++++	++++
		シメトリン	400	++++	++++	++++
		プロメトリン	33	++++	++++	++++
		ジウロン	36	++++	++++	++++
C2		プロパニル	130	++++	++++	++++
		リニューロン	64	++++	++++	++++
C3		ベンタゾン	570	-	++++	-
D	PS I ⁴⁾	ジクワット	700000	++++	++++	++++
E	PPO ⁵⁾	オキサジアゾ	1	++++	++++	++++
		ピフェノックス	0.35	++++	++++	++++
		ベントキサゾ	0.22	++++	++++	++++
F2	HPPD ⁶⁾	ピラゾキシフェン	0.80 [#]	++++	++++	++++
		ピラゾレート	0.056	++++	++++	++++
K1	Microtubule ⁷⁾	アミプロホスメチル	20 ^{##}	++++	++++	++++
		トリフルラリン	0.22	++++	++++	+
		ベンディメタリン	0.3	++++	++++	++++
K3	VLCFAs ⁸⁾	アラクロール	170	++++	+	++++
		カフェンストロール	2.5	++++	++	++++
		ピペロホス	25	++++	+	++++
		プレチラクロール	50	++++	++++	++++
		メトラクロール	490	++++	-	+++
		メフェナセット	4	++++	+	++++
N	Lipid ⁹⁾	エスプロカルブ	4.9	++++	++++	++++
		ジメピベレート	20	++++	+++	++++
		ベンスリド	25	++++	++++	++++
		チオベンカルブ	30	++++	++++	++
		モリネート	900	++++	++++	++++
O	Auxins ¹⁰⁾	ジカンバ	6100	-	+	-
Z	Unknown	ダイムロン	1.2	+	-	-
		ピリプチカルブ	0.32	++++	++++	+
-	PS II or PPO ^{###} OP ^{11)####}	キノクラミン	22 [*]	++++	++++	++++
		ベンタクロロフェノール	80	++++	++++	++++

1) アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害

2) アセト乳酸合成酵素阻害

3) 光化学系II阻害

4) 光化学系I阻害

5) プロトボルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害

6) ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシゲナーゼ阻害

7) 微小管重合阻害

8) 超長鎖脂肪酸合成阻害

9) 脂質合成阻害

10) オーキシン作用攪乱・阻害

11) 酸化のリン酸化阻害

(* : 生長阻害率、- : <19%、+ : 20-39%、++ : 40-59%、+++ : 60-79%、++++ : 80%<)

(# : 引用文献3による。## : 引用文献57による。### : 引用文献52による。#### : 引用文献58による)

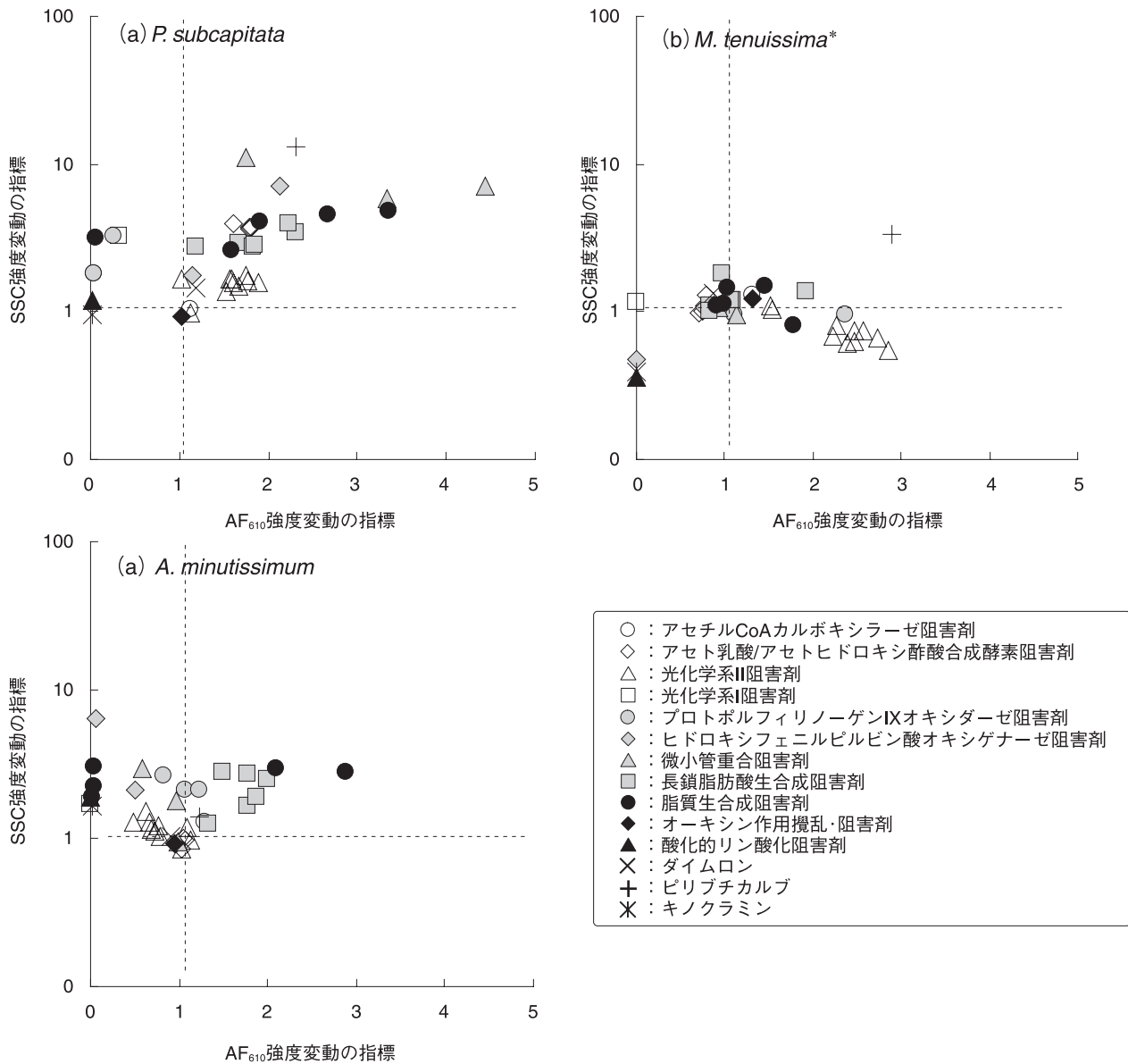


図9 除草剤暴露による藻類のAF₆₁₀及びSSC強度の変化（対照区を1として作図）
**M. tenuissima*；ペンディメタリンの試験結果は計測不能によりデータ欠損

(5) 除草剤による影響からの回復性に関する試験

除草剤の暴露により一時的に生長が阻害され、形態が変化した*P. subcapitata*細胞の除草剤による影響からの回復性を、7種類の除草剤（エスプロカルブ、キノクラミン、シメトリン、チオベンカルブ、プレチラクロール、ベンスルフロンメチル、メフェナセット）について調べた。試験は3連で行い、試験容器として300mlの三角フラスコを用い、培地量は100mlとした。暴露濃度は各除草剤における面積法により算出したEbC₅₀ 0-72hの6-12倍の濃度とした。初期細胞濃度は 1×10^5 cells ml⁻¹とし、72時間前培養して対数増殖期にある細胞を接種し、72時間の暴露を行った。

暴露終了後に*P. subcapitata*細胞を遠心分離（約

3,000rpm、30min）により回収した。この操作を新しい培地を用いて3回繰り返して細胞を洗浄した後、細胞濃度が 1×10^4 cells ml⁻¹となるよう調製し、再び同じ培養条件で培養を続けた。再培養は13日間行い、1日毎にフローサイトメーターで細胞数を計測すると共に、SSC強度及びAF₆₁₀強度を測定した。また、光学顕微鏡で細胞の形態を観察し、対照区の観察結果と比較することにより、*P. subcapitata*細胞の除草剤による影響からの回復性を、形態及び生長速度の面から評価した。なお、ここでは暴露区の個体群が対照区と同等の生長速度を示し、フローサイトメーターを用いた測定結果及び光学顕微鏡による細胞の形態観察結果が対照区と同じ傾向を示すことを回復と定義した。

3 結果

(1) 除草剤の3種類に対する生長阻害率

40種類の除草剤 (10mg l⁻¹溶液もしくは飽和溶液) の72時間暴露による藻類3種の生長阻害率を表11に示した。各藻類の対照区における培養72時間後の増殖率は、*P. subcapitata*、*M. tenuissima* 及び *A. minutissimum* でそれぞれ21、130、19倍であった。3種いずれの藻類に対しても阻害率が低かったのは、ジカンバ (<39%)、ダイムロン (<39%) 及びシハロホップブチル (<59%) であった。緑藻 *P. subcapitata* の生長に対しては、これら3剤とベンタゾン (<19%) を除く全ての除草剤による阻害率が80%を上回った。藍藻 *M. tenuissima* の生長に対する阻害率は、上記3剤とプレチラクロールを除く VLCFAs (超長鎖脂肪酸生合成) 阻害剤5剤 (<59%) で低い傾向にあった。一方、珪藻 *A. minutissimum* の生長に対する阻害率は、上記3剤に加えベンタゾン (<19%)、トリフルラリン (<39%)、ピリブチカルブ (<39%)、チオベンカルブ (<59%) 及び ALS (アセト乳酸合成酵素) 阻害剤4剤 (<59%) で低い傾向にあった。

(2) 除草剤暴露した藻類細胞の形態変化による類型化
生長阻害下の藻類細胞の SSC 及び AF₆₁₀強度の平均値について、暴露区と対照区の比を除草剤毎にプロットすることにより、除草剤暴露による藻類細胞の形態変化の程度を評価した (図9)。

藻類3種の内、緑藻 *P. subcapitata* 細胞を用いた試験で、暴露した除草剤により SSC 及び AF₆₁₀強度に大きな差が検出された (図9-a)。その差は SSC、AF₆₁₀強度でそれぞれ、最大12、4倍を超えるものであった。藍藻 *M. tenuissima* 細胞を用いた試験では、除草剤の種類により AF₆₁₀強度に最大で3倍程度の差が検出されたが、SSC強度に対する影響はほとんど見られなかった (図9-b)。珪藻 *A. minutissimum* 細胞を用いた試験では SSC、AF₆₁₀強度に差が検出されたが、ほとんどの暴露区で3倍以内の差であった (図9-c)。光学顕微鏡による細胞形態の観察では、SSC強度が増大している緑藻 *P. subcapitata* の細胞群中に、正常細胞より明らかに肥大している細胞が観察された。一方、藍藻 *M. tenuissima* 及び珪藻 *A. minutissimum* については、光学顕微鏡による観察から暴露区における細胞の形態変化を判断することはできなかった。

以上の結果から、除草剤の影響による細胞の形態変化は、緑藻の *P. subcapitata* で最も容易に観察できることが明らかになった。従って、以降の試験には *P. subcapitata*

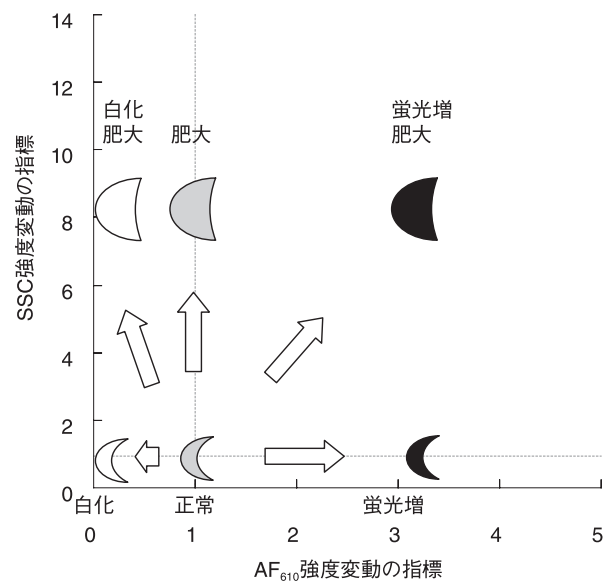
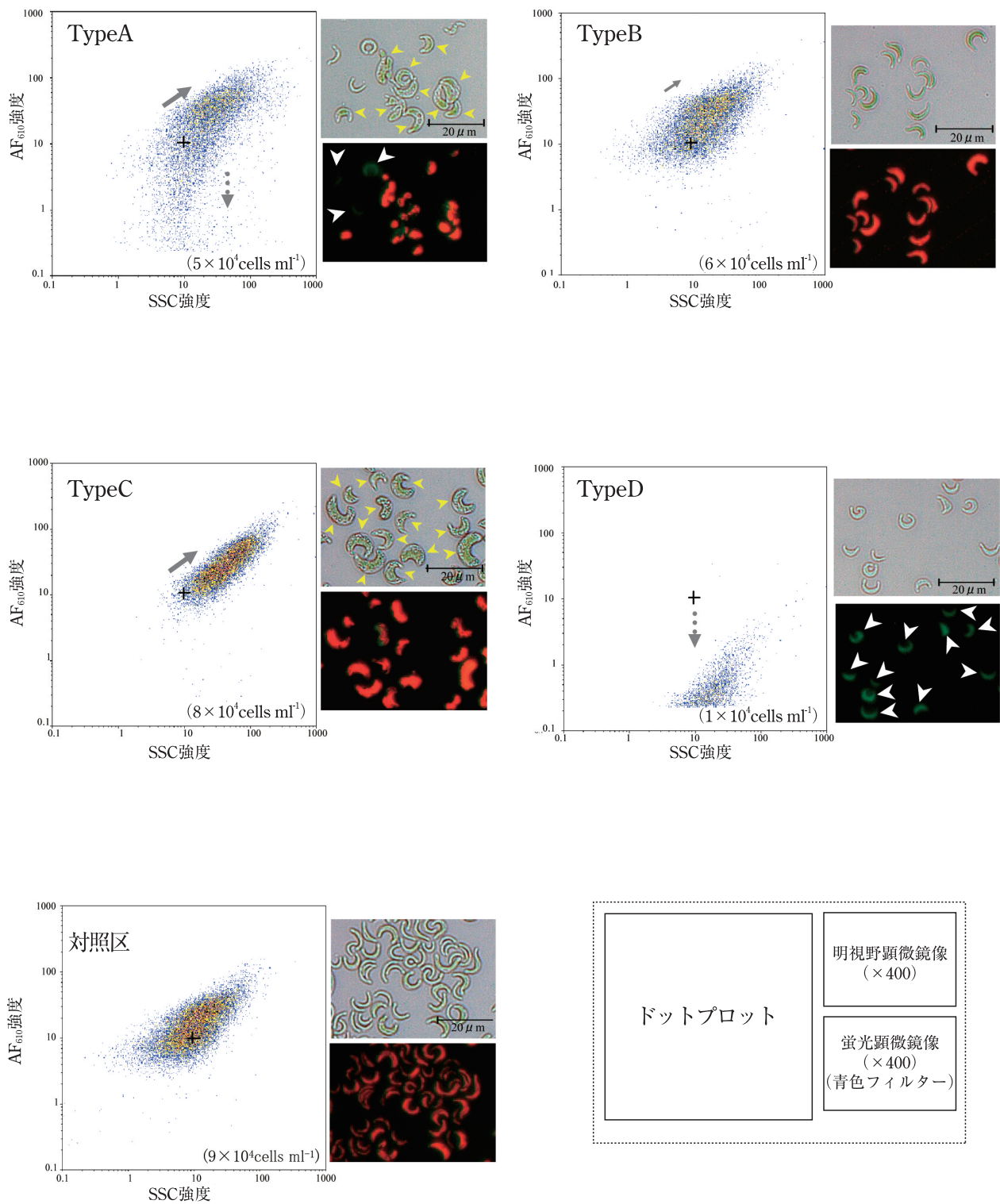


図10 *P. subcapitata* を試験生物とした場合の AF₆₁₀及び SSC 強度の変動と顕微鏡観察による形態変化との関連

を用いた。SSC 及び AF₆₁₀強度の相対的な変化と光学顕微鏡により観察される *P. subcapitata* 細胞の形態との関係を図10に模式図で示した。

除草剤暴露による緑藻 *P. subcapitata* 細胞の形態変化について、暴露区のドットプロットの特徴から4型 (TypeA、B、C、D) に類型化した (図11)。また、試験に使用した除草剤の緑藻 *P. subcapitata* 細胞の形態変化パターンによる分類を表12にまとめた。TypeAの特徴は、SSC及びAF₆₁₀強度が増加する細胞とAF₆₁₀強度が低下する細胞が同時に検出される、すなわち、光学顕微鏡による観察で肥大した細胞と白化した細胞の混在が認められることである。TypeAとして15種類の除草剤があり、これらには HPPD (ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ) 阻害型の2剤、微小管重合阻害型の3剤、脂質生合成阻害型の5剤及びカフェンストロール、ジウロン、ジクワット、ピペロホス、ピリブチカルブが該当した。TypeBの特徴は、SSC及びAF₆₁₀強度の両者が若干増加する細胞が検出されることである。これらの細胞は光学顕微鏡による観察では対照区との形態の相違を見分けることができなかった。TypeBとして8種類の除草剤があり、これらにはジウロン及びベンタゾンを除く光化学系II阻害型の除草剤が該当した。TypeCの特徴は、SSC及びAF₆₁₀強度がともに増加する細胞が検出されることである。光学顕微鏡による観察では肥大した細胞がみられた。TypeCとして、8種類の除草剤があり、これ



▲ : 白化し、赤色蛍光を發しない細胞を示す。 ▲ : 肥大した細胞を示す。

図11 除草剤暴露による *P. subcapitata* 細胞の形態変化の類型化

Type A ; チオベンカルブ暴露区、 Type B ; シメトリン暴露区、

Type C ; ベンスルフロンメチル暴露区、 Type D ; キノクラミン暴露区

暴露72時間後の細胞を計測・観察、暴露濃度は10mg l⁻¹もしくは飽和濃度

光学顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真は同サンプルを観察したものであり対応している

らには ALS 阻害型の 4 剤、カフェンストロール及びピペロホスを除く VLCFAs 阻害型の 4 剤が該当した。TypeD の特徴は、AF₆₁₀強度の低下した細胞が検出されることである。光学顕微鏡による観察では、白化した細胞が多くみられた。TypeD として、5 種類の除草剤があり、これらの除草剤には PPO (プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ) 阻害型の 3 剤に加えてキノクラミン及びペンタクロフェノールが該当した。なお、本類型化に当てはまらなかった除草剤はジカンバ、シハロホップブチル、ダイムロン及びベンタゾンの 4 剤であり、暴露終了時の細胞のドットプロットは、対照区と同じ傾向を示した。

(3) 除草剤による影響からの藻類細胞の回復

除草剤暴露期間及び回復性確認期間における *P. subcapitata* の生長曲線を図12に示す。除草剤の暴露濃度は面積法で算出した EbC₅₀ 0-72h の 6~12 倍に設定したが、ベンスルフロンメチル以外の除草剤については、この濃度における暴露でほぼ完全に生長が阻害された。緑藻 *P. subcapitata* 細胞の除草剤による影響からの回復性は、光化学系 II 阻害剤であるシメトリン (TypeB) 及び ALS 阻害剤であるベンスルフロンメチル (TypeC) で高く、除草剤を含まない再培養開始直後から対照区と変わらない生長速度を示した。VLCFAs 阻害型のプレチラクロール及びメフェナセット (TypeC) と脂質生合成阻害型のエスプロカルブ及びチオベンカルブ (TypeA) は再培養 6~7 日後に対照区と変わらない生長速度を示した。キノクラミン (TypeD) を暴露した区では回復が遅く、対照区と変わらない生長速度を示したのは 11 日後であった。

いずれの試験区においても、回復性試験終了時の細胞のドットプロットは対照区と同じ傾向を示した。また、光学顕微鏡による観察においても、細胞の形態は対照区と同様であることを確認した。

4 考察

(1) 除草剤暴露した藻類細胞の形態変化による類型化

本研究では藻類 3 種について除草剤暴露による細胞の形態変化を調査したが、藍藻 *M. tenuissima* 及び珪藻 *A. minutissimum* については、光学顕微鏡による観察から細胞の形態変化を判断することが困難であった。その要因として、藍藻 *M. tenuissima* については、細胞直径が 1.3~2.0µm と非常に小型なため (廣瀬ら, 1977)、光学顕微

鏡による観察では形態変化を認識できなかったものと考えられる。また、珪藻 *A. minutissimum* については細胞膜の外側に硬い珪酸質の被殻を有するため、硬い細胞壁を有しない緑藻よりも形態変化が起こりにくいと推察された。

P. subcapitata 細胞の観察には、光学顕微鏡に加え蛍光顕微鏡を使用した。正常な細胞からは青色光による励起で赤色の自家蛍光が観察される一方、白化した細胞からは赤色の自家蛍光はほとんど観察されなかった (図 11)。この結果より、AF₆₁₀強度の低下した細胞は白化した細胞に相当すると考えられた。また、*P. subcapitata* 細胞の場合、SSC 強度は細胞の大きさと対応しており、SSC 強度の増加した細胞は肥大した細胞に相当すると考えられた。

除草剤暴露による緑藻 *P. subcapitata* 細胞の形態変化の傾向を、ドットプロットの特徴から類型化し、作用機構との関連を検討したところ、ジウロン、カフェンストロール及びピペロホスについて作用機構と形態変化の傾向が一致しなかった。ジウロンは光化学系 II 阻害型の除草剤とされているが、その他の光化学系 II 阻害型の除草剤が示す形態変化の傾向と異なり、AF₆₁₀強度の低下する細胞が検出された。このことから、ジウロンは光化学系 II 阻害以外の作用を有する可能性が示された。また、カフェンストロール及びピペロホスは VLCFAs 阻害型除草剤とされているが、その他の VLCFAs 阻害型除草剤が示す形態変化の傾向と異なり、AF₆₁₀強度の低下する細胞が検出された。

この結果は、カフェンストロール及びピペロホスが VLCFAs 阻害以外の作用を有する可能性を示すものである。しかしながら、本研究では全ての供試除草剤について、10mg l⁻¹または飽和濃度で暴露を行っているため、供試除草剤によっては暴露濃度が高く、一次作用点以外の作用点にも影響している可能性は否定できない。形態変化の傾向を精緻に類型化するには、各除草剤の影響濃度を明らかにし、一次作用点のみが反応する濃度で暴露して形態変化の傾向を比較する必要があると考えられた。

類型間における形態変化については、肥大した細胞が観察された TypeA 及び C における発生頻度を比較すると TypeC > TypeA となり、同様に、白化した細胞の発生頻度は TypeD > TypeA となった (図 11)。本結果は、藻類細胞の形態変化から除草剤の作用機構を類推できる可能性を示している。一方、形態変化の傾向のみから毒性の強弱を評価することは困難であるため、本評価は藻類の個体群に及ぼす定性的な変化の評価に限られる。

表12 緑藻 *P. subcapitata* 細胞の形態変化に与える影響による供試除草剤の分類 (10mg l⁻¹もしくは飽和濃度で暴露)

形態変化パターン	除草剤
Type A	アミプロホスメチル、エスプロカルブ、カフェンストール、ジウロン、ジクワット、ジメピペレート、チオベンカルブ、トリフルラリン、ピペロホス、ピラゾキシフェン、ピラゾレート、ピリプチカルブ、ベンスリド、ペンディメタリン、モリネート
Type B	アトラジン、シアナジン、シマジン、ジメタメトリン、シメトリン、プロパニル、プロメトリン、リニュロン
Type C	アジムスルフロン、アラクロール、イマゾスルフロン、ピラゾスルフロンエチル、プレチラクロール、 bensulfuronメチル、メトラクロール、メフェナセット
Type D	オキサジアゾン、キノクラミン、ピフェノックス、ペンタクロロフェノール、ペントキサゾン
変化なし	ジカンバ、シハロホップブチル、ダイムロン、ペンタゾン

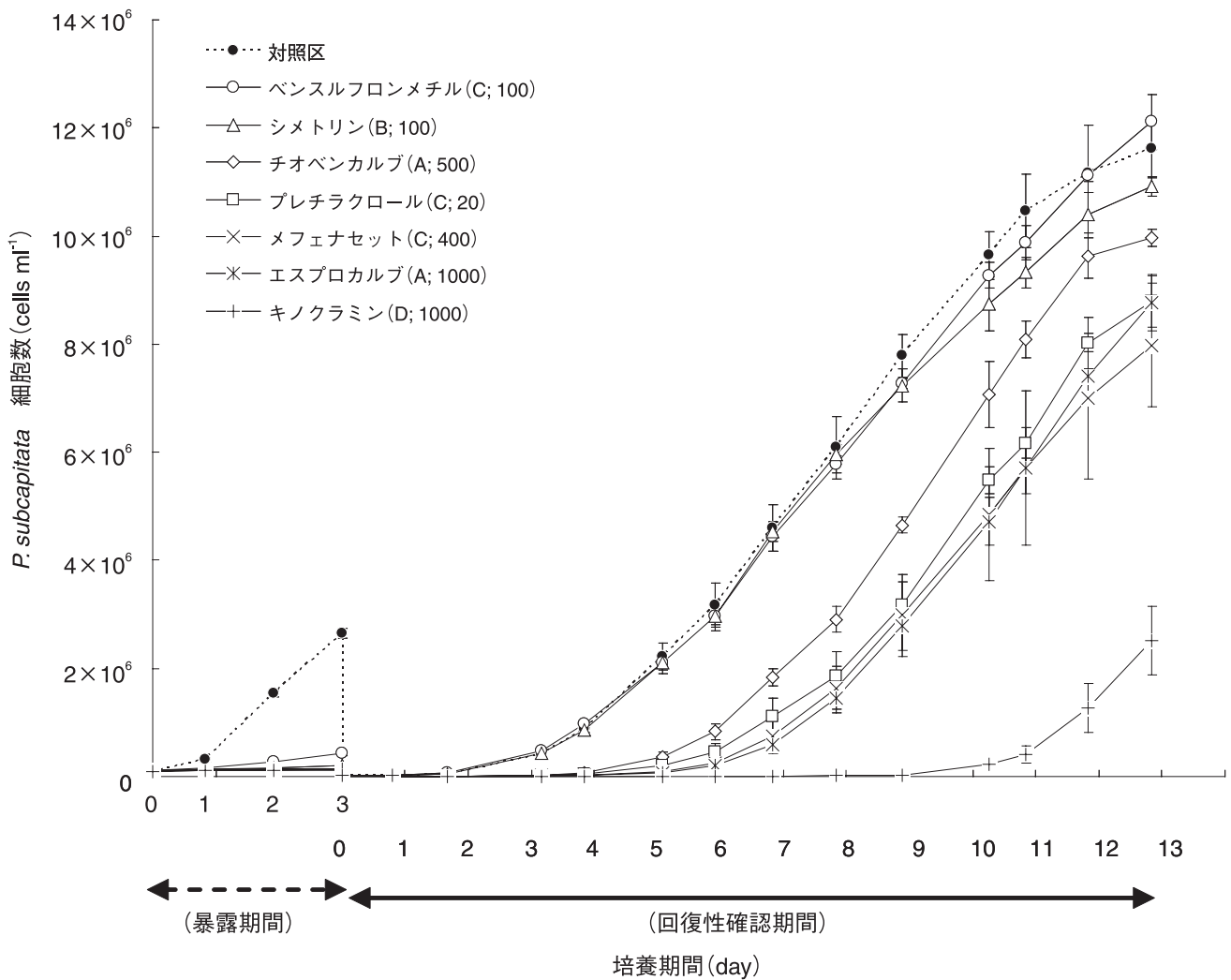


図12 除草剤暴露期間及び回復性確認期間における *P. subcapitata* の生長曲線
 除草剤名の後の括弧内は各除草剤の類型化した Type と暴露濃度 (μg l⁻¹) を示す
 エラーバーは標準誤差を示す

(2) 除草剤による影響からの藻類細胞の回復

P. subcapitata 細胞に7種類の除草剤を72時間暴露し、その後除草剤を含まない条件で再培養を行った場合、すべての暴露区で、除草剤による影響からの回復性が確認された。この結果から、これらの除草剤が10mg l⁻¹もしくは飽和濃度での短期間の暴露によって緑藻 *P. subcapitata* 細胞に対し影響を与えたとしても、影響は可逆的で、個体群に対して長期的な影響を及ぼす危険性は低いと考えられた。

除草剤暴露による形態変化と回復性との関係を考察すると、白化した細胞が多く観察されたキノクラミン (TypeD) 暴露区で回復までの期間が長く、一部白化した細胞が観察された脂質合成阻害剤 (エスプロカルブ及びチオベンカルブ; TypeA) 及び肥大した細胞が多く観察された VLCFAs 阻害剤 (プレチラクロール、及びメフェナセット; TypeC) の暴露区では対照区と比べると3~4日遅れて回復がみられた。一方、細胞の肥大が観察された ALS 阻害剤であるベンスルフロンメチル (TypeC) 暴露区及び形態にほとんど変化を生じなかった光化学系 II 阻害剤のシメトリン (TypeB) 暴露区では回復までの期間が短く、これらの剤による生長阻害下の細胞は、対照区と同等の増殖力を有していた (図12)。この結果は、作用機構に関する情報とフローサイトメトリー解析の結果を基に、除草剤の影響からの回復性の程度を推測できることを示唆している。

従来の藻類生長阻害試験では、藻類細胞数の計測に主として粒子計測計や血球計算計等が用いられている。しかし、これらの機器を用いた細胞の計測は、生死の判別ができない、非生物的粒子を同時に計測してしまう、毒性の作用機構に関する情報が得られない等の欠点が指摘されている (Stauber et al., 2002)。フローサイトメトリーを利用して細胞を計測する方法は、これらの欠点を克服しうる手法として期待されている。また、土壌等無機粒子と共存した試験 (Adams et al., 2004) や複数種の藻類を混合した試験 (Franklin et al., 2004) 等、新たな試験手法開発に活用されている。

本章では、SSC 及び AF₆₁₀強度を測定項目として、フローサイトメトリー解析により、除草剤が藻類細胞に及ぼす影響の評価を行った。本測定項目に加え FDA (Fluorescein Diacetate) による生細胞染色や前方散乱光による細胞の大きさ測定等の測定項目を追加することにより、より詳細な評価が行えるものと期待される。また、高次の影響評価では、影響 (生長阻害や細胞の肥大等) からの回復性や個体群に対する影響の可逆性に関

する評価が必要となる。本章で示したフローサイトメトリー解析による除草剤の微細藻類細胞に対する影響評価法は、これらの研究・開発に利用できるものと考えられる。

V 水稲用除草剤が4種の藻類の生長に及ぼすリスクの評価

1 緒言

EUにおける生態リスク評価は、毒性指標 (LC₅₀、EC₅₀及び NOEC) と PEC (環境中予測濃度; Predicted Environmental Concentration) を比較することにより行われている。毒性指標を PEC で除して算出した TER (毒性指標 / 暴露比; Toxicity/Exposure Ratio) 及び散布量を毒性指標で除して算出した HQ (有害性指数; Hazard Quotient) が評価に利用されている (三菱安科研, 1999; EU, 1997)。米国での生態リスク評価も毒性指標と環境中予測濃度を比較するという観点で EU の方法と本質的な差はない。しかし、米国では EEC (環境中予測濃度; Estimated Environmental Concentration) を毒性指標で除して算出した RQ (リスク指数; Risk Quotient) が評価に利用されている (SETAC, 1994; 三菱安科研, 1999)。

日本における生態リスク評価手法は EU と類似しており、TER を評価に利用するスキーム (図13) が取り入れられている。農薬の登録段階では、TER が1を超える場合、登録が保留されるか、適用作物の見直し等更なるリスク削減策を講じることが求められている (環境省水環境部, 2002)。

本章では、第II章で明らかにした環境水中の除草剤濃度と第III章で明らかにした各藻類に対する毒性指標との比較することにより、12種類の水稲用除草剤のリスク評価を行った。

2 評価方法

現在の日本における水産動植物に対する影響評価のスキームでは (図13)、藻類の AEC (急性影響濃度; Acute Effect Concentration、日本における毒性指標値) は EC₅₀ 0-72h 値 (不確実係数なし) である。本研究におけるリスク評価では、第III章で算出した ErC₅₀ 0-72h 値 (µg l⁻¹) を AEC として用い、PEC は、最悪の事態を考慮し、各年度における最高検出濃度 (µg l⁻¹) とした。ここでは、PEC を ErC₅₀ 0-72h 値で除した値 (TER) が1を超える場合をリスク有りとした。

上記の評価手法に従い、ErC₅₀ 0-72h と分析値が明らかになっている12種類の水稲用除草剤（イマゾスルフロ
ン、エスプロカルブ、カフェンストロール、ジメタメト
リン、シメトリン、ジメピペレート、ダイムロン、チオ
ベンカルブ、プレチラクロール、ベンスルフロロンメチ
ル、メフェナセット、モリネート）についてリスク評価
を行った。

3 結果及び考察

各調査地点における TER を除草剤別に表13（1～
6）に示す。河川において TER が1 以上値を示した事
例は、2001年の逆川（St.3）におけるベンスルフロロンメ
チルの藍藻 *M. tenuissima* に対する影響を評価した結果
（TER=1.5）の1 例だけであった（表13-5）。排水路で
は、2003年のプレチラクロールの緑藻 *P. subcapitata* に対
する影響（TER=1.1）及び2002-04年ベンスルフロロンメ
チルの藍藻 *M. tenuissima* に対する影響を評価した結果
（TER=1.3~1.8）の4 例であった（表13-3、13-5）。
TER が0.1以上を示す事例が、酸アミド系除草剤の緑藻 *P.
subcapitata* に対する影響（TER=0.1~0.92）、トリアジン
系除草剤の4 種藻類に対する影響（TER=0.10~0.72）及
びスルホニルウレア系除草剤の藍藻 *M. tenuissima* に対

する影響を評価した結果（TER=0.13~0.80）で見受けら
れた（表13-3~5）。

一方、カーバメート系除草剤及びダイムロンは、いず
れの水域でも、TER は1を大きく下まわっていた（表13
-1、13-2、13-6）。このことは、これらの除草剤の
4 種藻類の生長に対するリスクが非常に小さいことを示
していると考えられた。

現行の評価手法において「リスク有り」と評価される
事例は、ベンスルフロロンメチルの藍藻 *M. tenuissima* に対
する影響を評価した結果の1 例のみであり、河川及び湖
では、これら12種類の水稲用除草剤の4種藻類の生長に
対する急性的なリスクは総じて低いと考えられた。しかし
ながら、TER が0.1以上の事例は、酸アミド系除草剤（カ
フェンストロール、プレチラクロール及びメフェナセッ
ト）、トリアジン系除草剤（ジメタメトリン及びシメトリン）
及びスルホニルウレア系除草剤（イマゾスルフロ
ン及びベンスルフロロンメチル）で広範囲の水域で確認され
ることから、急性的なリスクが比較的大きい（影響濃度
と公共用水域における濃度の差が小さい）これらの水稲
用除草剤については、試験種の追加、長期間暴露による
影響評価等、河川生態系の一次生産者に対する高次の影
響評価を行う必要があると考えられた。

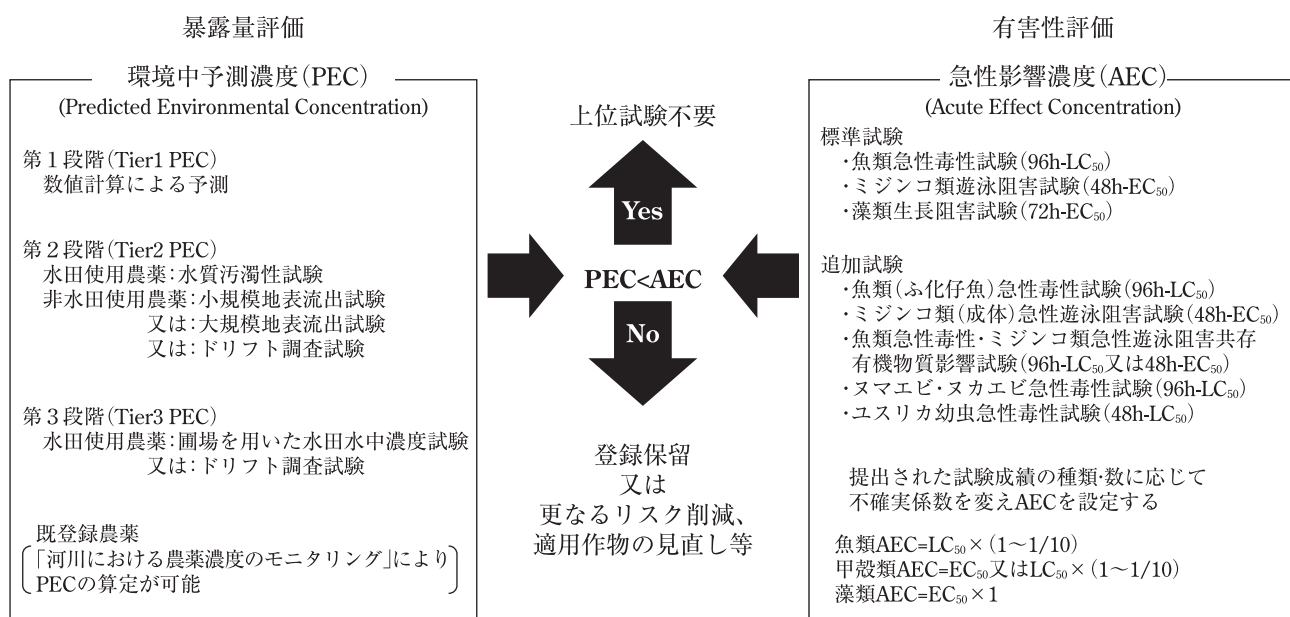


図13 水産動植物に対する影響評価スキーム（日本）

表13-1 河川、湖及び排水路における TER* (エスプロカルブ及びジメピペレート)

カーバメート系除剤
エスプロカルブ

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.0022	-	0.0047	0.0059	0.0029	0.00073	0	-
	2002年	-	-	0.0064	0.0059	<0.011	0.0087	-	-	-	0.0087
	2003年	-	-	-	-	0.0063	0.0059	-	-	-	0.036
	2004年	-	0	-	-	0.0087	-	-	-	-	0.021
	2005年	-	-	-	-	0.0067	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.00017	-	<0.00035	<0.00044	<0.00022	<0.00055	0	-
	2002年	-	-	<0.00048	<0.00044	<0.0008	<0.00065	-	-	-	<0.00065
	2003年	-	-	-	-	<0.00047	<0.00045	-	-	-	<0.0027
	2004年	-	0	-	-	<0.00065	-	-	-	-	<0.0016
	2005年	-	-	-	-	<0.0005	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0.00038	-	0.00081	0.001	0.00051	0.00013	0	-
	2002年	-	-	0.0011	0.0010	0.0019	0.0015	-	-	-	0.0015
	2003年	-	-	-	-	0.0011	0.0010	-	-	-	0.0063
	2004年	-	0	-	-	0.0015	-	-	-	-	0.0037
	2005年	-	-	-	-	0.0012	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	<0.000054	-	<0.00012	<0.00014	<0.000072	<0.000018	0	-
	2002年	-	-	<0.00016	<0.00014	<0.00026	<0.00021	-	-	-	<0.00021
	2003年	-	-	-	-	<0.00015	<0.00015	-	-	-	<0.00089
	2004年	-	0	-	-	<0.00021	-	-	-	-	<0.00052
	2005年	-	-	-	-	<0.00016	-	-	-	-	-

カーバメート系除剤
ジメピペレート

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.00010	-	0.00038	0.00015	0.000083	0	0	-
	2002年	-	-	0.000076	0.000045	0.00014	0.00014	-	-	-	0.00019
	2003年	-	-	-	-	0.00017	0	-	-	-	0
	2004年	-	0	-	-	0	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.000011	-	<0.000042	<0.000017	<0.000091	0	0	-
	2002年	-	-	<0.000084	<0.000049	<0.000015	<0.000015	-	-	-	<0.000021
	2003年	-	-	-	-	<0.000019	0	-	-	-	0
	2004年	-	0	-	-	0	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0.000048	-	0.00018	0.000074	0.000040	0	0	-
	2002年	-	-	0.000037	0.000021	0.000065	0.000065	-	-	-	0.000091
	2003年	-	-	-	-	0.000083	0	-	-	-	0
	2004年	-	0	-	-	0	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	<0.000011	-	<0.000042	<0.000017	<0.000091	0	0	-
	2002年	-	-	<0.000084	<0.000049	<0.000015	<0.000015	-	-	-	<0.000021
	2003年	-	-	-	-	<0.000019	0	-	-	-	0
	2004年	-	0	-	-	0	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-

* TER : 検出最高濃度 (μg l⁻¹) / 各藻類の ErC₅₀ (μg l⁻¹) ■ : TER>1.0、■ : TER>0.1

表13-2 河川、湖及び排水路における TER* (チオベンカルブ及びモリネート)

カーバメート系除草剤
チオベンカルブ

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.00088	-	0.0064	0.0047	0.0024	0	0	-
	2002年	-	-	0	0	0.0029	0.0068	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	0.0056	0.0071	-	-	-	0.0012
	2004年	-	0	-	-	0.0053	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0.0074	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.000091	-	<0.000066	<0.000049	<0.000025	0	0	-
	2002年	-	-	0	0	<0.000030	<0.000070	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	<0.000058	<0.000072	-	-	-	<0.000012
	2004年	-	0	-	-	<0.000054	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	<0.000076	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0.000058	-	0.00042	0.00031	0.00016	0	0	-
	2002年	-	-	0	0	0.00019	0.00044	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	0.00037	0.00046	-	-	-	0.000076
	2004年	-	0	-	-	0.00034	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	0.00048	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	<0.000069	-	<0.000050	<0.000037	<0.000019	0	0	-
	2002年	-	-	0	0	<0.000023	<0.000053	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	<0.000044	<0.000055	-	-	-	<0.000091
	2004年	-	0	-	-	<0.000041	-	-	-	-	0
	2005年	-	-	-	-	<0.000058	-	-	-	-	-

カーバメート系除草剤
モリネート

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0	-	0.0098	0.0073	0.0037	0.00051	0	-
	2002年	-	-	0	0	0.0073	0.0090	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	0.017	0.010	-	-	-	0.000046
	2004年	-	0.000061	-	-	0.015	-	-	-	-	0.000051
	2005年	-	-	-	-	0.010	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	0	-	0.00080	0.00060	0.00030	0.000042	0	-
	2002年	-	-	0	0	0.00060	0.00074	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	0.0014	0.00082	-	-	-	0.000038
	2004年	-	0.0000050	-	-	0.0012	-	-	-	-	0.000042
	2005年	-	-	-	-	0.00082	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0	-	0.00078	0.00059	0.00029	0.000041	0	-
	2002年	-	-	0	0	0.00059	0.00073	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	0.0014	0.00080	-	-	-	0.000037
	2004年	-	0.0000049	-	-	0.0012	-	-	-	-	0.000041
	2005年	-	-	-	-	0.00080	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	0	-	<0.00040	<0.00030	<0.00015	<0.000021	0	-
	2002年	-	-	0	0	<0.00030	<0.00037	-	-	-	0
	2003年	-	-	-	-	<0.00071	<0.00041	-	-	-	<0.000019
	2004年	-	<0.0000025	-	-	<0.00060	-	-	-	-	<0.000021
	2005年	-	-	-	-	<0.00041	-	-	-	-	-

* TER：検出最高濃度 (µg l⁻¹) / 各藻類の ErC₅₀ (µg l⁻¹) ■：TER>1.0、■：TER>0.1

表13-3 河川、湖及び排水路における TER* (カフェンストロール、プレチラクロール及びメフェナセット)

酸アミド系除剤

カフェンストロール

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻	0	-	0.35	-	0.22	0.15	0.074	0.041	0	-
<i>P. subcapitata</i>	-	-	0.26	0.22	0.37	0.28	-	-	-	0.41
2002年	-	-	-	-	0.19	0.18	-	-	-	0.30
2003年	-	0.19	-	-	0.19	-	-	-	-	0.33
2004年	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-
緑藻	0	-	<0.016	-	<0.010	<0.0068	<0.0034	<0.0019	0	-
<i>C. vulgaris</i>	-	-	<0.012	<0.010	<0.017	<0.013	-	-	-	<0.019
2002年	-	-	-	-	<0.0087	<0.0081	-	-	-	<0.014
2003年	-	<0.0086	-	-	<0.0087	-	-	-	-	<0.015
2004年	-	-	-	-	<0.0086	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.0086	-	-	-	-	-
珪藻	0	-	<0.0016	-	<0.0010	<0.00068	<0.00034	<0.00019	0	-
<i>A. minutissimum</i>	-	-	<0.0012	<0.0010	<0.0017	<0.0013	-	-	-	<0.0019
2002年	-	-	-	-	<0.00087	<0.00081	-	-	-	<0.0014
2003年	-	<0.00086	-	-	<0.00087	-	-	-	-	<0.0015
2004年	-	-	-	-	<0.00086	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.00086	-	-	-	-	-
藍藻	0	-	<0.0016	-	<0.0010	<0.00068	<0.00034	<0.00019	0	-
<i>M. tenuissima</i>	-	-	<0.0012	<0.0010	<0.0017	<0.0013	-	-	-	<0.0019
2002年	-	-	-	-	<0.00087	<0.00081	-	-	-	<0.0014
2003年	-	<0.00086	-	-	<0.00087	-	-	-	-	<0.0015
2004年	-	-	-	-	<0.00086	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.00086	-	-	-	-	-

酸アミド系除剤

プレチラクロール

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻	0	-	0.16	-	0.38	0.20	0.13	0.012	0.0078	-
<i>P. subcapitata</i>	-	-	0.30	0.23	0.38	0.38	-	-	-	0.46
2002年	-	-	-	-	0.49	0.35	-	-	-	0.11
2003年	-	0	-	-	0.41	-	-	-	-	0.52
2004年	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-
緑藻	0	-	<0.013	-	<0.032	<0.017	<0.011	<0.00098	<0.00066	-
<i>C. vulgaris</i>	-	-	<0.025	<0.020	<0.032	<0.032	-	-	-	<0.039
2002年	-	-	-	-	<0.041	<0.030	-	-	-	<0.091
2003年	-	0	-	-	<0.034	-	-	-	-	<0.077
2004年	-	-	-	-	<0.030	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.030	-	-	-	-	-
珪藻	0	-	0.0017	-	0.0041	0.0021	0.0014	0.00013	0.000085	-
<i>A. minutissimum</i>	-	-	0.0032	0.0025	0.0041	0.0041	-	-	-	0.0050
2002年	-	-	-	-	0.0053	0.0038	-	-	-	0.012
2003年	-	0	-	-	0.0044	-	-	-	-	0.010
2004年	-	-	-	-	0.0038	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	0.0038	-	-	-	-	-
藍藻	0	-	<0.00058	-	<0.00014	<0.00073	<0.00049	<0.000043	<0.000029	-
<i>M. tenuissima</i>	-	-	<0.00011	<0.00086	<0.00014	<0.00014	-	-	-	<0.00017
2002年	-	-	-	-	<0.00018	<0.00013	-	-	-	<0.00040
2003年	-	0	-	-	<0.00015	-	-	-	-	<0.00034
2004年	-	-	-	-	<0.00013	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.00013	-	-	-	-	-

酸アミド系除剤

メフェナセット

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻	0	-	0.030	-	0.041	0.049	0.026	0.0062	0.0021	-
<i>P. subcapitata</i>	-	-	0.020	0.033	0.061	0.044	-	-	-	0.089
2002年	-	-	-	-	0.034	0.038	-	-	-	0.10
2003年	-	0.0016	-	-	0.052	-	-	-	-	0.062
2004年	-	-	-	-	0.039	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	0.039	-	-	-	-	-
緑藻	0	-	<0.00075	-	<0.0010	<0.0013	<0.00067	<0.00016	<0.000054	-
<i>C. vulgaris</i>	-	-	<0.00005	<0.00083	<0.0015	<0.0011	-	-	-	<0.0023
2002年	-	-	-	-	<0.00088	<0.00096	-	-	-	<0.0027
2003年	-	<0.000042	-	-	<0.0013	-	-	-	-	<0.0016
2004年	-	-	-	-	<0.0010	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.0010	-	-	-	-	-
珪藻	0	-	0.00064	-	0.00089	0.0011	0.00057	0.00014	0.000046	-
<i>A. minutissimum</i>	-	-	0.00043	0.00071	0.0013	0.00096	-	-	-	0.0019
2002年	-	-	-	-	0.00075	0.00082	-	-	-	0.0023
2003年	-	0.000036	-	-	0.0011	-	-	-	-	0.0014
2004年	-	-	-	-	0.00086	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	0.00086	-	-	-	-	-
藍藻	0	-	<0.00045	-	<0.00063	<0.00075	<0.00040	<0.000095	<0.000033	-
<i>M. tenuissima</i>	-	-	<0.00030	<0.00050	<0.00093	<0.00068	-	-	-	<0.0014
2002年	-	-	-	-	<0.00053	<0.00058	-	-	-	<0.0016
2003年	-	<0.00025	-	-	<0.00080	-	-	-	-	<0.00095
2004年	-	-	-	-	<0.00060	-	-	-	-	-
2005年	-	-	-	-	<0.00060	-	-	-	-	-

* TER: 検出最高濃度 (μg l⁻¹) / 各藻類の ErC₅₀ (μg l⁻¹) □: TER>1.0, ■: TER>0.1

表13-4 河川、湖及び排水路における TER* (ジメタメトリン及びシメトリン)

トリアジン系除草剤
ジメタメトリン

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.028	-	0.025	0.023	0.012	0.0077	0	-
	2002年	-	-	0.032	0.028	0.028	0.030	-	-	-	0.032
	2003年	-	-	-	-	0.037	0.035	-	-	-	0.16
	2004年	-	0	-	-	0.035	-	-	-	-	0.087
	2005年	-	-	-	-	0.028	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	0.025	-	0.022	0.020	0.011	0.0067	0	-
	2002年	-	-	0.028	0.025	0.025	0.026	-	-	-	0.028
	2003年	-	-	-	-	0.032	0.030	-	-	-	0.14
	2004年	-	0	-	-	0.030	-	-	-	-	0.075
	2005年	-	-	-	-	0.025	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0.045	-	0.039	0.037	0.019	0.012	0	-
	2002年	-	-	0.050	0.045	0.045	0.047	-	-	-	0.050
	2003年	-	-	-	-	0.058	0.055	-	-	-	0.25
	2004年	-	0	-	-	0.055	-	-	-	-	0.14
	2005年	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	0.13	-	0.12	0.11	0.057	0.035	0	-
	2002年	-	-	0.15	0.13	0.13	0.14	-	-	-	0.15
	2003年	-	-	-	-	0.17	0.16	-	-	-	0.72
	2004年	-	0	-	-	0.16	-	-	-	-	0.40
	2005年	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-

トリアジン系除草剤
シメトリン

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.0017	-	0.022	0.014	0.013	0.0011	0	-
	2002年	-	-	0.0084	0.011	0.032	0.043	-	-	-	0.0049
	2003年	-	-	-	-	0.065	0.043	-	-	-	0.032
	2004年	-	0	-	-	0.065	-	-	-	-	0.14
	2005年	-	-	-	-	0.062	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	0.00044	-	0.0059	0.0037	0.0035	0.00029	0	-
	2002年	-	-	0.0022	0.0028	0.0086	0.011	-	-	-	0.0013
	2003年	-	-	-	-	0.017	0.011	-	-	-	0.0086
	2004年	-	0	-	-	0.017	-	-	-	-	0.038
	2005年	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	0.0012	-	0.016	0.010	0.0096	0.00078	0	-
	2002年	-	-	0.0061	0.0076	0.024	0.031	-	-	-	0.0035
	2003年	-	-	-	-	0.047	0.031	-	-	-	0.024
	2004年	-	0	-	-	0.047	-	-	-	-	0.10
	2005年	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	0.0039	-	0.052	0.033	0.031	0.0025	0	-
	2002年	-	-	0.019	0.024	0.075	0.10	-	-	-	0.011
	2003年	-	-	-	-	0.15	0.10	-	-	-	0.075
	2004年	-	0	-	-	0.15	-	-	-	-	0.33
	2005年	-	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-

* TER : 検出最高濃度 (µg l⁻¹) / 各藻類の ErC₅₀ (µg l⁻¹) □ : TER>1.0、■ : TER>0.1

表13-5 河川、湖及び排水路における TER* (イマゾスルフロン及びベンスルフロンメチル)

スルホニルウレア系除剤
イマゾスルフロン

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.00054	-	0.0015	0.0012	0.00060	0.00024	0	-
	2002年	-	-	0.00099	0.0014	0.0011	0.0012	-	-	-	0.0035
	2003年	-	-	-	-	0.00099	0.0011	-	-	-	0.0070
	2004年	-	0.000040	-	-	0.0012	-	-	-	-	0.0036
	2005年	-	-	-	-	0.0013	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.000054	-	<0.00015	<0.00012	<0.000060	<0.000024	0	-
	2002年	-	-	<0.000099	<0.00014	<0.00011	<0.00012	-	-	-	<0.00035
	2003年	-	-	-	-	<0.000099	<0.00011	-	-	-	<0.00070
	2004年	-	<0.000004	-	-	<0.00012	-	-	-	-	<0.00036
	2005年	-	-	-	-	<0.00013	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	<0.000054	-	<0.00015	<0.00012	<0.000060	<0.000024	0	-
	2002年	-	-	<0.000099	<0.00014	<0.00011	<0.00012	-	-	-	<0.00035
	2003年	-	-	-	-	<0.000099	<0.00011	-	-	-	<0.00070
	2004年	-	<0.000004	-	-	<0.00012	-	-	-	-	<0.00036
	2005年	-	-	-	-	<0.00013	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	0.015	-	0.041	0.032	0.016	0.0065	0	-
	2002年	-	-	0.027	0.038	0.030	0.032	-	-	-	0.095
	2003年	-	-	-	-	0.027	0.030	-	-	-	0.19
	2004年	-	0.0011	-	-	0.032	0.032	-	-	-	0.097
	2005年	-	-	-	-	0.035	-	-	-	-	-

スルホニルウレア系除剤
ベンスルフロンメチル

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	0.037	-	0.019	0.015	0.0098	0.0032	0	-
	2002年	-	-	0.019	0.018	0.013	0.013	-	-	-	0.044
	2003年	-	-	-	-	0.010	0.012	-	-	-	0.032
	2004年	-	0.00082	-	-	0.0089	-	-	-	-	0.031
	2005年	-	-	-	-	0.011	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.00023	-	<0.00012	<0.000096	<0.000061	<0.000020	0	-
	2002年	-	-	<0.00012	<0.00011	<0.00082	<0.00078	-	-	-	<0.00027
	2003年	-	-	-	-	<0.00065	<0.00076	-	-	-	<0.00020
	2004年	-	<0.0000051	-	-	<0.00055	-	-	-	-	<0.00019
	2005年	-	-	-	-	<0.00067	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	<0.00023	-	<0.00012	<0.000096	<0.000061	<0.000020	0	-
	2002年	-	-	<0.00012	<0.00011	<0.00082	<0.00078	-	-	-	<0.00027
	2003年	-	-	-	-	<0.00065	<0.00076	-	-	-	<0.00020
	2004年	-	<0.0000051	-	-	<0.00055	-	-	-	-	<0.00019
	2005年	-	-	-	-	<0.00067	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	1.5	-	0.80	0.64	0.41	0.13	0	-
	2002年	-	-	0.80	0.73	0.55	0.52	-	-	-	1.8
	2003年	-	-	-	-	0.43	0.51	-	-	-	1.3
	2004年	-	0.034	-	-	0.37	-	-	-	-	1.3
	2005年	-	-	-	-	0.45	-	-	-	-	-

* TER: 検出最高濃度 ($\mu\text{g l}^{-1}$) / 各藻類の ErC_{30} ($\mu\text{g l}^{-1}$) ■: TER>1.0, ■: TER>0.1

表13-6 河川、湖及び排水路における TER* (ダイムロン)

尿素系除剤
ダイムロン

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. a
緑藻 <i>P. subcapitata</i>	2001年	0	-	<0.0075	-	<0.0079	<0.0049	<0.0030	<0.0010	<0.00020	-
	2002年	-	-	<0.0091	<0.014	<0.0088	0	-	-	-	<0.028
	2003年	-	-	-	-	<0.0076	<0.0086	-	-	-	<0.050
	2004年	-	<0.00045	-	-	<0.0078	-	-	-	-	<0.026
	2005年	-	-	-	-	<0.0065	-	-	-	-	-
緑藻 <i>C. vulgaris</i>	2001年	0	-	<0.0075	-	<0.0079	<0.0049	<0.0030	<0.0010	<0.00020	-
	2002年	-	-	<0.0091	<0.014	<0.0088	0	-	-	-	<0.028
	2003年	-	-	-	-	<0.0076	<0.0086	-	-	-	<0.050
	2004年	-	<0.00045	-	-	<0.0078	-	-	-	-	<0.026
	2005年	-	-	-	-	<0.0065	-	-	-	-	-
珪藻 <i>A. minutissimum</i>	2001年	0	-	<0.0075	-	<0.0079	<0.0049	<0.0030	<0.0010	<0.00020	-
	2002年	-	-	<0.0091	<0.014	<0.0088	0	-	-	-	<0.028
	2003年	-	-	-	-	<0.0076	<0.0086	-	-	-	<0.050
	2004年	-	<0.00045	-	-	<0.0078	-	-	-	-	<0.026
	2005年	-	-	-	-	<0.0065	-	-	-	-	-
藍藻 <i>M. tenuissima</i>	2001年	0	-	<0.0075	-	<0.0079	<0.0049	<0.0030	<0.0010	<0.00020	-
	2002年	-	-	<0.0091	<0.014	<0.0088	0	-	-	-	<0.028
	2003年	-	-	-	-	<0.0076	<0.0086	-	-	-	<0.050
	2004年	-	<0.00045	-	-	<0.0078	-	-	-	-	<0.026
	2005年	-	-	-	-	<0.0065	-	-	-	-	-

* TER: 検出最高濃度 ($\mu\text{g l}^{-1}$) / 各藻類の ErC_{30} ($\mu\text{g l}^{-1}$) ■: TER>1.0, ■: TER>0.1

VI 珪藻を用いた生長阻害試験方法の開発

1 緒言

農薬等化学物質の生態影響評価の初期段階では、河川生態系の一次生産者に対する影響評価を目的に、単細胞の藻類を用いた生長阻害試験の結果が利用されている。現在、藻類の生長阻害試験に最もよく使用されている種は、淡水産浮遊性緑藻の *P. subcapitata* である。本種は OECD、USEPA 等の試験指針 (OECD, 1984, 2002; ISO, 1989; USEPA, 1996) で推奨試験生物に指定されている。

淡水産付着性珪藻は流れのある水域で優位に生息が可能であり (Wehr et al., 2003)、概して流れの速い日本の河川では他の付着性藻類と共に優占種として一次生産を支えている (秋山ら, 1986)。河川の一次生産性に対する化学物質の影響評価をより現実の環境に即して行うには、浮遊性緑藻のみでなく淡水産付着性珪藻に及ぼす影響を明らかにすることが重要である (国立環境研究所, 1999)。淡水産付着性珪藻の生態については、水質汚濁との関係についての研究が進んでおり、我が国においても河川の有機汚濁度の指標生物として利用されている (渡辺, 1962, 2005; Kobayashi et al., 1982, 1989; Watanabe et al., 1986)。しかし、ここで言う有機汚濁は河川の腐水性体系を示しており、農薬等有機合成化学物質による汚染は含まれていない。そのため、農薬等有機合成化学物質による汚染と淡水産付着性珪藻の生態に関する研究報告は、除草剤抵抗性に関する研究を除き限られている (Hamala et al., 1985; Jurgensen et al., 1990; Kasai et al., 1995a, 1995b; Tang et al., 1997; Kasai, 1998; Nelson et al., 1999; Seguin et al., 2001; Rimet et al., 2004; Jansen et al., 2005)。

珪藻を用いた生長阻害試験については、USEPA (1996) 及び ISO (国際標準化機構; International Standards Organization) (1995) 等で試験指針が定められている海産浮遊性珪藻 *Skeletonema costatum* を用いた報告が最も多い。淡水産付着性珪藻については、USEPA の試験指針で *Fistulifera pelliculosa* が推奨種として示されている。また近年、OECD では藻類生長阻害試験の試験指針の改定が進められており、*F. pelliculosa* は OECD (2002) の試験指針においても推奨種として検討されている。このように一部の種類については試験法が示されているものの、現行の藻類生長阻害試験は、液体培養で安定した継代培養が可能な浮遊性の藻類及び付着性の低い藻類に適用が限られている。これは、多くの付着性珪藻は液体培

養条件下では培養容器壁面への付着性が高いため液体培養での安定した培養が難しく、現行の試験指針への適用が難しいことが要因となっている。

そこで、本章では付着性の高い淡水産付着性珪藻の薬剤感受性を簡易に検定できる生長阻害試験の方法を検討すると共に、本試験方法に適用可能な珪藻の種類について検討を行った。

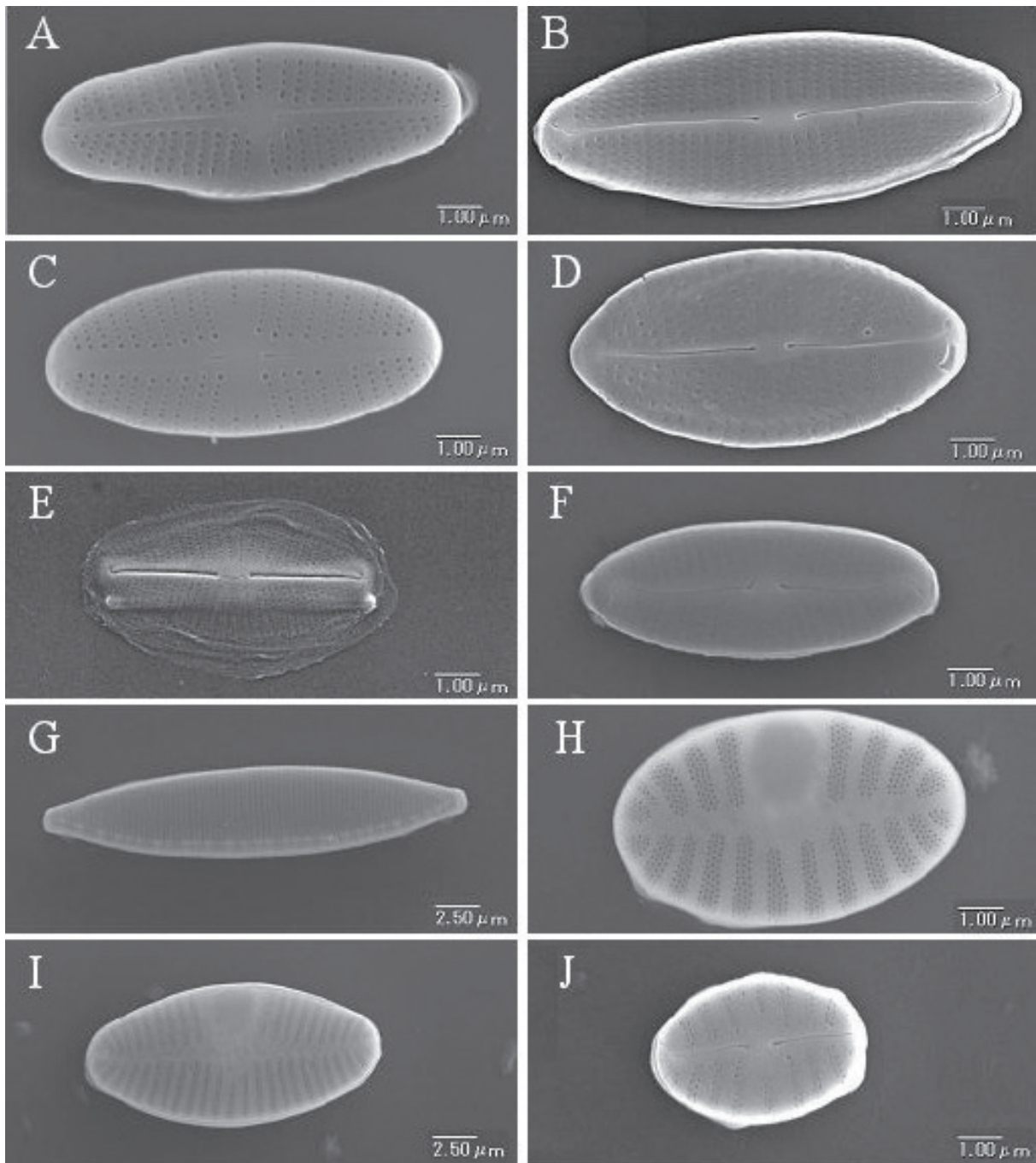
2 材料及び方法

(1) 試験生物

試験法の検討及び試験法への適用性評価には、10種の淡水産付着性藻類を使用した。河川付着性珪藻を用いた生長阻害試験方法の検討は無菌の *A. minutissimum* を用いて行った。開発した試験法へ適用可能な珪藻種の検討には、9種類の非無菌淡水産付着性藻類 (*Craticula molestiformis*, *Eolimna minima*, *Eolimna subminuscula*, *Fistulifera saprophila*, *Mayamaea atomus*, *Nitzschia palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Planothidium lanceolatum* 及び *Sellaphora seminulum*) を用いて最適培養条件を検討した。写真2に走査型電子顕微鏡 (KEYENCE、VE-8800) で撮影した各珪藻の被殻像及び採集地点を示す。珪藻の同定は、走査型電子顕微鏡による被殻像を基に行った。*A. minutissimum* は、財団法人地球・環境フォーラム (現 独立行政法人国立環境研究所・環境研究基盤技術ラボラトリー) より分与された NIES-71株を使用した。その他の種については、2005年6月27日に茨城県つくば市を流下する逆川の臼井 (St.2) 及び桜川の君島 (St.5) の河床石表面から分離し、継代培養しているものを使用した。なお、St.5は周囲に水田が分布する水田排水の流入のある地点であり、St.2は上流に水田がない水田排水の影響を受けない地点である (図2)。両地点において石表面より採集した珪藻群集試料 ($n=30$ 、各地点それぞれ30個の石より採集) から同形同種の珪藻を重複して分離しないよう注意し、寒天平板法で付着性珪藻の分離を試み、付着性珪藻種の分離の容易さを評価した。いずれの種においても、継代培養及び生長阻害試験には Csi 培地 (GEF, 1997) を改変した培地を用いた (表7)。継代培養には1.5%の寒天培地を用い、培養条件は白色蛍光灯による上部照明で照度約 2,000lux、連続照明、温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。

(2) 生長阻害試験方法の検討

河川付着性珪藻を用いた生長阻害試験方法の検討は、カナダ環境省が公定法として示している96穴のマイクロ



A : *Achnantheidium minutissimum* (NIES-71)

C : *Eolimna minima* (君島)

E : *Fistulifera saprophila* (君島)

G : *Nitzschia palea* (白井)

I : *Planothidium lanceolatum* (君島)

B : *Craticula molestiformis* (君島)

D : *Eolimna subminuscula* (君島)

F : *Mayamaea atomus* (君島)

H : *Planothidium frequentissimum* (君島)

J : *Sellaphora seminulum* (白井)

(括弧内：系統名及び採集地点を示す)

写真2 各種珪藻の走査型電子顕微鏡像

プレートを利用した緑藻 *P. subcapitata* の生長阻害試験の試験指針 (Env. Canada, 1992) を参考に行った。

1) 細胞数計測手法の定量性

試験方法の開発に先立ち、試験の定量性の評価を目的に、以下の3点(①~③)について検討を行った。

① 培地の蒸発量：マイクロプレートの各ウェルにおける試験期間中の培地の蒸発量を明らかにした。培地の蒸発量は精密秤 (Mettler, AC100) で試験開始前及び72時間後に各ウェル中の培地の重さを測定し比較した。試験培地量は200 μ l well⁻¹とした。培養器内の湿度は、湿度計 (testo, test400) で測定した。なお、本試験では、珪藻の接種は行わなかった。

② 生物量の定量性：マイクロプレートリーダー (BIO-RAD, Model550 Microplate Reader) を用いた OD₆₈₀ (Optical Density 680 nm; クロロフィル a の吸収帯のピーク波長) 測定による細胞数計測の定量性を評価した。評価は OD₆₈₀ 測定による測定値とトーマ血球計算盤 (Kayagaki irikakogyo co. Ltd., Haemacytometer) を用いた細胞数の計測結果を比較して行った。試験開始時及び24時間毎の72時間まで OD₆₈₀ 及び細胞数を計測した。試験は6連で行った。

③ 各ウェルにおける生長の変動：培養72時間後の OD₆₈₀ を測定し、1プレート中におけるウェル間の *A. minutissimum* の生長速度の変動を評価した。静置培養と1日に2回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌する培養方法での変動を比較すると共に、2種類のマイクロプレート (U底及び平底) 間での変動を比較した。試験は60連 (1プレート96ウェル中における周縁の36ウェルを除いた60ウェル) で行った。試験終了時にウェル底面への細胞の付着を倒立顕微鏡 (Leica, DM IRB) で観察し、付着の均一性を観察した。いずれの試験もその他の試験条件は後述の生長阻害試験方法に準じて行った。

2) *A. minutissimum* の最適培養条件の検討

試験法の開発に使用した *A. minutissimum* の最適培養条件を検討した。異なる温度 (10, 15, 20, 25 及び 30°C)、及び照度条件 (2,000 及び 5,000 lux) で培養し、最適培養条件を検討した。試験は3連で行った。その他の試験条件は後述の生長阻害試験方法に準じて行った。試験開始直後及び24時間毎に72時間後まで OD₆₈₀ を測定し、試験開始時から72時間後における生長速度 (μ 0-72h) を算出した。 μ 0-72h から倍加時間 (D_t) を求め、最適な培養

条件の検討を行った。以下に μ 0-72h 及び D_t の算出方法を示す。

$$\mu_0-72h = \ln(72h-OD_{680} / 0h-OD_{680}) / 72 \dots \dots (5)$$

$$D_t = \ln 2 / \mu_0-72h \dots \dots \dots (6)$$

72h-OD₆₈₀ : 培養72時間後における680nmの吸光度
0h-OD₆₈₀ : 試験開始時における680nmの吸光度

3) 生長阻害試験方法の検討

試験生物調製の簡易化を目的に、珪藻の前培養は寒天培地を用い静置培養で行った。前培養を3~5日間行い対数増殖期にある珪藻コロニーを滅菌した爪楊枝を用い回収し、予め1mlの液体培地を分注した1.5mlの遠心チューブに懸濁した。ボルテックス及び卓上簡易遠心機を用い、上澄み液が透明になるまで洗浄を繰り返し、これを試験生物とした。試験開始時の *A. minutissimum* の細胞数は約 5×10^4 cells ml⁻¹ (OD₆₈₀ \approx 0.007 well⁻¹に相当) とした。試験容器には低蒸発タイプの蓋付き・平底の96穴マイクロプレート (FALCON® 35 1172 MICROTTESTTM Flat Bottom) を用いた。試験培地量は200 μ l well⁻¹とし、195 μ lの培地に5 μ lの試験生物を含む培地を加えることにより試験開始とした。珪藻の生長速度は OD₆₈₀ を計測して算出した。培養条件は温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照度約2,000 lux (白色蛍光灯による上部連続照明) とし、1日に2回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌した。なお、試験期間中に培地の蒸発を低減するため、水を入れた腰高シャーレを培養器 (SANYO, MIR-153) 内に2つ置き、培養器内を高湿度に維持した。

(3) 試験方法の再現性の評価

試験の再現性は、被検物質としてトリアジン系除草剤の一つであるジメタメトリン (Wako 分析用標準品 純度 >99%) を用いて生長阻害試験を行うことにより評価した。試験は6連9濃度区 (公比: 2.0、設定最高濃度区: 240 μ g l⁻¹) で行い、試験開始直後及び24時間毎に72時間後まで OD₆₈₀ を計測した。試験溶液中のジメタメトリン濃度は HPLC/UV (High Performance Liquid Chromatography; 高速液体クロマトグラフィー、HITACHI 7000 シリーズ、UV 検出器) を用いて試験開始時に測定を行った。溶解補助剤対照区における生長速度 (OD₆₈₀ 値の増加速度) との比較により各濃度区の生長阻害率を求め、濃度-生長阻害曲線を作図し、最小二乗

表14 ジメタメトリンの分析条件

HPLC	Hitachi 7000 Series
Column	Wako Wakosil-II 5C18AR (4.6×250mm)
Guard Column	GL Sciences Cartridge Guard Column E (4.0×20mm)
Elution	Gradient elution, methanol/water =65/35→100/0(0-12min) 100/0 (12-15min)
Flow rate	1ml/min
Injection	10μl
Detection	UV at 230nm

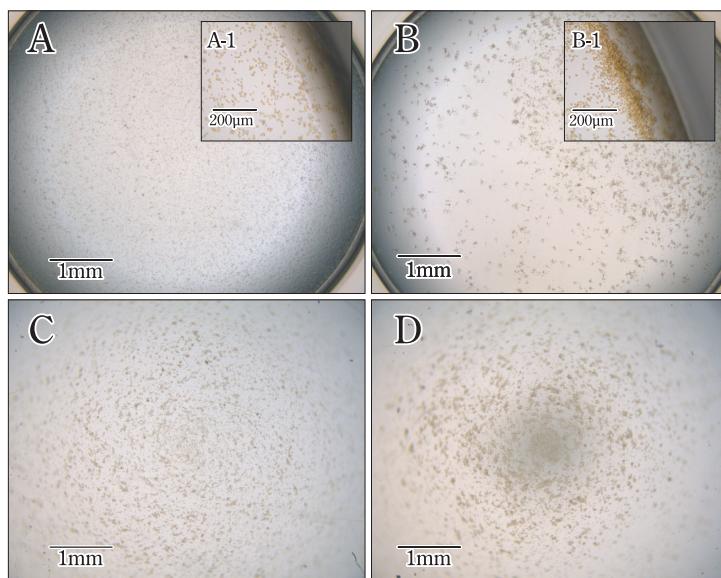


写真3 A. *minutissimum*をマイクロプレートで72時間培養した後のウェル底面の状態
 A：平底，1日に2回容器を攪拌
 B：平底，攪拌なし
 A-1：写真Aの縁部分の拡大図
 B-1：写真Bの縁部分の拡大図
 C：U底，1日に2回容器を攪拌
 D：U底，攪拌なし

法により半数生長阻害濃度 (ErC₅₀ 0-72h) を算出した。なお、ErC₅₀ 0-72h の算出には、試験開始時におけるジメタメトリン濃度の分析値を使用した。本試験を繰り返し7回行い、本試験方法の再現性を評価した。以下に生長阻害率 ($I\mu$) の算出方法を示す。

$$I\mu = 100 - ((\mu_0 - 72\text{hn} / \mu_0 - 72\text{hc}) \times 100) \dots (7)$$

$\mu_0 - 72\text{hn}$ ：試験区における生長速度

$\mu_0 - 72\text{hc}$ ：対照区における生長速度

(4) 試験溶液の調製法及び濃度分析法

ジメタメトリン分析用標準品2.0mgを200μlのDMSO (Dimethyl Sulfoxide) に溶解した。このDMSO溶液をスターラーで攪拌している液体培地200ml中に滴下し、試験溶液一次原液 (10mg l⁻¹溶液) を調製した。一次原液を10倍に希釈した溶液を試験溶液二次原液 (1,000μg l⁻¹溶液) とし、これを段階的に希釈し各試験濃度区の溶液を調

製した。溶解補助剤対照区はジメタメトリン最高濃度区におけるDMSO濃度と等しくなるよう培地にDMSOを添加し調製した。濃度分析は試験開始時の二次原液についてのみ行った。二次原液1mlにメタノール1mlを加え攪拌したものを分析試料 (500μg l⁻¹溶液) とし、HPLCを用いてジメタメトリンの濃度分析を行った。HPLCの分析条件は表14に示した。

(5) 適用可能な珪藻種の検討

9種の淡水産付着性珪藻 (*C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus*, *N. palea*, *P. frequentissimum*, *P. lanceolatum* 及び *S. seminulum*) について最適培養条件を検討した。試験は前述の *A. minutissimum* の最適培養条件の検討方法に準じて行い、(5)、(6) 式を用い、 D_t を求め、最適な培養条件の検討を行った。また、最適条件下における D_t 及び試験終了時のOD₆₈₀値を比較し、各付着珪藻の試験法への適用性を評価した。

3 実験結果と考察

(1) 附着性珪藻を用いた生長阻害試験

1) 細胞数測定手法の定量性

試験期間中、培養器内に水を入れた腰高シャーレを置いたところ、培養器内の湿度は送風機の作動中に若干の変動は認められるものの、80%以上に維持された。本試験条件において96穴マイクロプレートの各ウェル中の培地は、試験条件下における72時間のインキュベートで平均3.8%蒸発した ($n=96$ 、平均蒸発量: $7.1\mu\text{l well}^{-1}$ 、変動係数:3.0%)。しかし、蒸発量が多い縁のウェルを除くと平均蒸発率は1.7%と低かった ($n=60$ 、平均蒸発量: $3.3\mu\text{l well}^{-1}$ 、変動係数:0.4%)。内側のウェルを試験に使う限りでは変動係数は0.4%と小さく、各ウェル間での差は小さいものと考えられた。なお、周縁のウェルの平均蒸発率は6.9%であった ($n=36$ 、平均蒸発量: $13.5\mu\text{l well}^{-1}$ 、変動係数:2.5%)。通常96穴マイクロプレートを用いた浮遊性緑藻の生長阻害試験では、丸底もしくはU底のマイクロプレートの使用が推奨されている (Env. Canada, 1992)。しかし、附着性珪藻を96穴マイクロプレートで培養する場合、丸底やU底では珪藻が各ウェル底の中心に偏って附着し生長するため (写真3、C及びD)、吸光度の計測による正確な細胞数の計測ができない。一方、平底の96穴マイクロプレートでは、各ウェル底面に珪藻が均一に附着し生長するため、再現性のある安定した珪藻細胞数の測定が可能となった。また、試験期間中に1日に2回マイクロプレートミキサーにて攪拌することに

より平底プレートの静置培養で発生するウェル内周縁部分への細胞の集積 (写真3、B-1) を防止すると共に細胞をより均一にウェル底面に分散することができ (写真3、A-1)、各ウェル間での生長の変動をさらに抑制できた。4種の培養方法 (平底・攪拌あり、平底・静置、U底・攪拌あり、U底・静置) による培養72時間後の OD_{680} の平均値 ($n=60$) 及び標準誤差は、それぞれ0.035 (SE=0.003)、0.027 (SE=0.008)、0.041 (SE=0.007)、0.072 (SE=0.014) であった。

OD_{680} と *A. minutissimum* NIES-71株の細胞数との相関性を図14に示す。 OD_{680} 測定による測定値と細胞数には高い相関 (決定係数: $R^2=0.9991$) が認められた。このことより、マイクロプレートリーダーを用いた OD_{680} 測定により定量的な *A. minutissimum* の細胞数の計測が可能であることが明らかになった。

2) *A. minutissimum* の最適培養条件

各培養条件における D_1 を比較したところ、培養温度20~30℃で *A. minutissimum* の生長速度が速い傾向にあった (図15)。最適温度での培養時に、低照度区 (約2,000lux) と高照度区 (約5,000lux) との間で生長速度に差は認められなかった。被検物質の光分解を低減するために試験は低照度で行うことが望ましいことから、生長阻害試験時における *A. minutissimum* の最適培養条件は、温度20℃、照度約2,000lux とした。

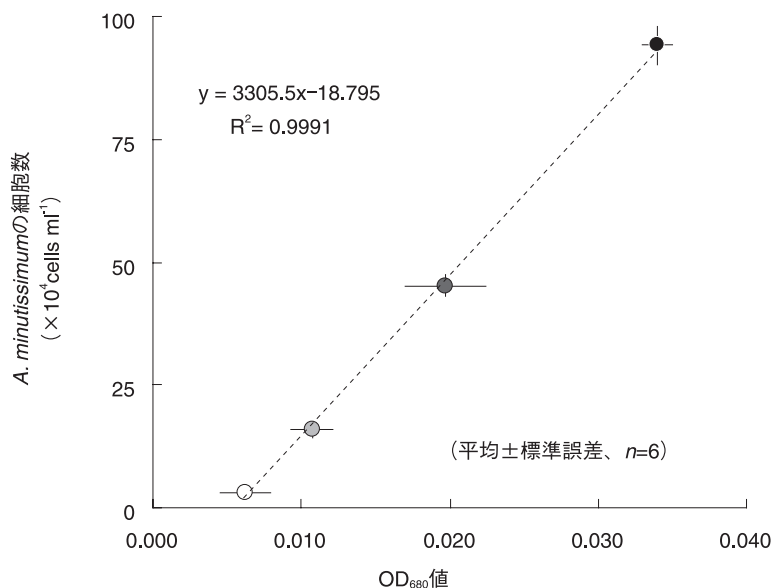


図14 OD_{680} 値と *A. minutissimum* NIES-71株の細胞数との相関性
 培養時間: ○:0時間、●:24時間、●:48時間、●:72時間

3) 試験生物の準備

試験に用いる珪藻の前培養を寒天固形培地上で行うことにより、液体培養では困難を要する試験生物の調製が容易に可能となった。しかし、すべての工程を液体培養で行う浮遊性藻類を対象とする現行の試験法とは異なり、固形培地を用いた培養から試験用の液体培地に珪藻を移植する方法では、液体培地移行時に珪藻細胞への物理的な傷害を完全に防ぐことは難しく、一部の細胞が試験生物調製時に破壊されてしまう。そのため、破壊された細胞から流出したクロロフィル及びクロロフィル分解物によって、試験溶液のバックグランド (OD_{680}) が上昇し、精度の高い細胞数の計測が行えなくなる。そこで、試験生物を試験溶液に接種する前に洗浄を行うことにより、珪藻回収時のバックグランドの上昇防止を可能にした。

(2) 試験の再現性評価 (*A. minutissimum* NIES-71株のジメタメトリン感受性検定)

7回の試験における対照区の *A. minutissimum* の生長曲線を図16に示した。96穴マイクロプレートのウェルで対照区の *A. minutissimum* は試験期間中に指数増殖した。

反復して行った生長阻害試験では、試験溶液原液 ($1,000\mu\text{g l}^{-1}$ 溶液) 中のジメタメトリンは、設定濃度の82~124% (平均94%, SE=15) の範囲であった。設定濃度と実測濃度との間にばらつきが生じる要因としては、ジメタメトリンの水溶解度が低い (20mg l^{-1}) (日本植物防疫協会, 2005b) が考えられた。

濃度-生長阻害率曲線を図17に示す。ErC₅₀ 0-72hの平均値は、 $7.0\sim 11.5\mu\text{g l}^{-1}$ (平均 $9.4\mu\text{g l}^{-1}$, SE=1.7) の範囲であり、再現性の高い結果が得られた。試験開始時の対象区における OD_{680} の平均値は0.007 (SE=0.003) であり、図14の回帰式を利用し、細胞数に換算すると、 $5.6\times 10^4\text{cells ml}^{-1}$ であった。試験終了時における対象区の OD_{680} の平均値は0.050 (SE=0.010) であり細胞数に換算すると、 $15\times 10^5\text{cells ml}^{-1}$ (SE= 34×10^4) となり、試験終了時には試験開始時の細胞数と比べ22~42倍 (平均32倍, SE=6.2) にまで増殖した。なお、第三章の結果では、ジメタメトリン感受性は、緑藻の *P. subcapitata* で ErC₅₀ 0-72h = $6.0\mu\text{g l}^{-1}$ 、同じく緑藻の *C. vulgaris* で ErC₅₀ 0-72h = $6.9\mu\text{g l}^{-1}$ 、そして藍藻の *M. tenuissima* で ErC₅₀ 0-72h = $1.3\mu\text{g l}^{-1}$ であったことから、本種のジメタメトリンに対する感受性はその他の微細藻類と同程度であると考えられた。

本章で検討した *A. minutissimum* を用いた生長阻害試験の概要を表15に示した。

(3) 適用可能な珪藻種の検討

1) 試験生物の採集

両地点それぞれ30の珪藻群集試料から臼井及び君島でそれぞれ69株 (4属)、92株 (8属) の付着性珪藻を分離し培養することができた (表16)。いずれの場所においても *N. palea* を主とした、*Nitzschia* 属が分離されやすい傾向にあった。*Achnanthydium* 属及び、*C. molestiformis*、*E. subminuscula*、*F. saprophila*、*P. frequentissimum*、*P. lanceolatum* は君島のサンプルからのみ分離できた (表16)。

A. minutissimum、*E. minima* は有機汚濁に対する広適応性種とされており (Kobayashi et al., 1989) 河川生態系の広範囲での生息が確認されている種である。これらの種は、平板培養法による珪藻の分離では、広範囲の水域から分離できる傾向にあったが、中でも有機汚濁の進んだ周囲が水田に囲まれた農村域の河川中流域から分離しやすい傾向にあった。渡辺 (2005) によると *E. subminuscula*、*F. saprophila* 及び *S. seminulum* は有機汚濁に対する好汚濁性種とされており、Mayama (1999) は前2者を中汚濁耐性種群、後者を強汚濁耐性種群に分類される種としている。*E. subminuscula* 及び *F. saprophila* は主として河川中流域から分離しやすい傾向にあったが、*S. seminulum* は河川上流域から分離しやすい傾向にあった。*M. atomus* 及び *N. palea* も β 中腐水性から α 中腐水性の水域でしばしば優占種として出現する種であり、有機汚濁に対する好汚濁性種とされているが (渡辺, 2005)、平板培養法による珪藻の分離では有機汚濁の進んだ場所のみでなく、河川上流域から下流域まで幅広い範囲の環境から容易に分離が可能な種であった。*M. atomus* は水環境から出現するだけでなく、土壤藻として気生的な環境からも出現する範囲の広い出現環境をもつ種類であるとの報告もあり (Mayama et al., 1988)、この適応性の高さが *M. atomus* が幅広い範囲の環境から容易に分離できる要因であると考えられた。*P. frequentissimum* 及び *P. lanceolatum* は好清水性種であるが (渡辺, 2005)、主として河川中流域から分離しやすい傾向にあった。好清水性種は化学物質に対して高感受性が期待できると共に、指標試験生物種として期待できる。*C. molestiformis* は中汚濁耐性種群の珪藻とされていると共に (Mayama, 1999)、電解質の豊富な水質や強腐水性の汚濁水域に達した下水処理場に出現するとの報告もあり (Lange-Bertalot, 2001)、有機汚濁に対する適応性は高いと考えられている。平板培養法による珪藻の分離では、河川中流域から分離された。

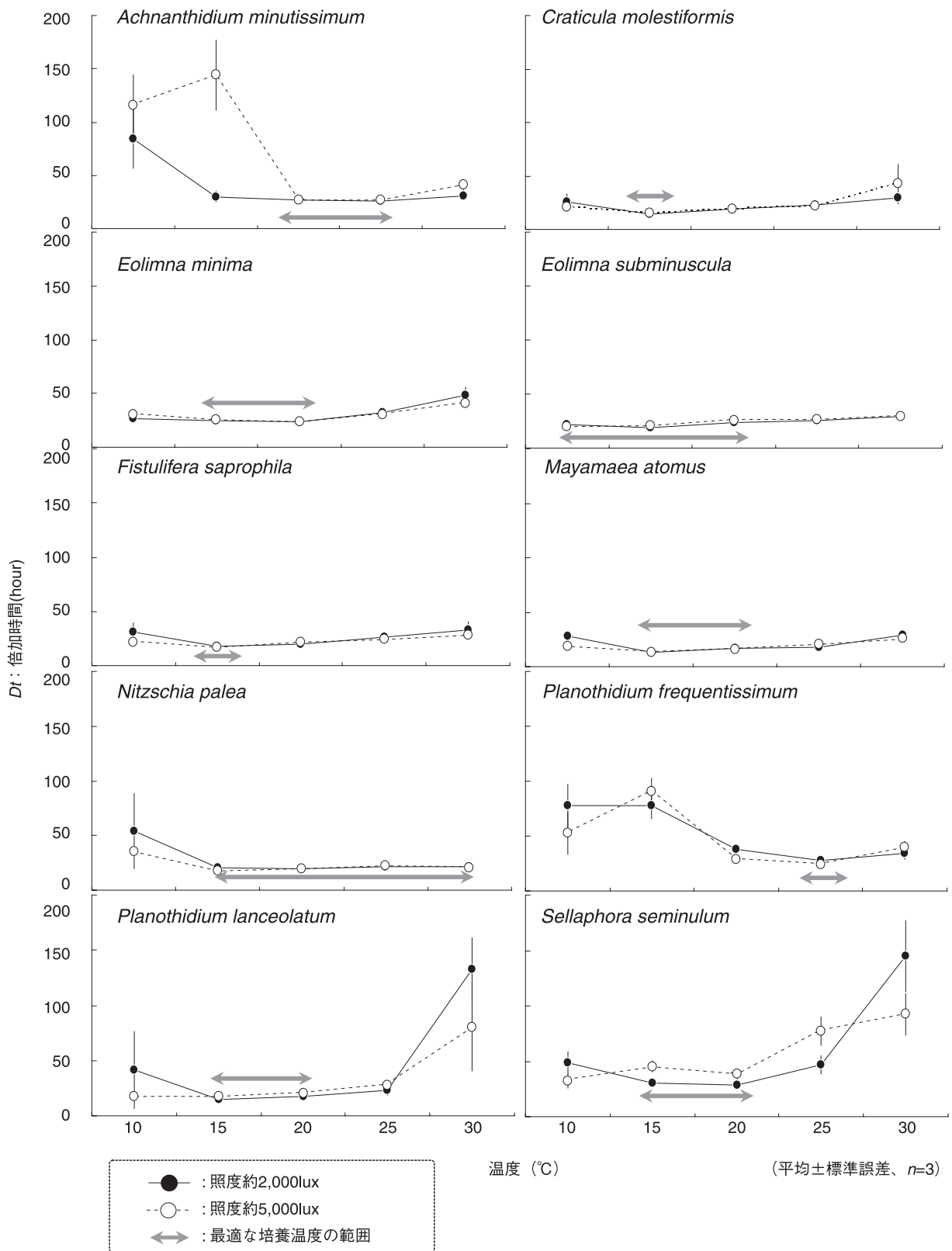


図15 各培養条件下での10種珪藻の倍加時間
図中の縦棒は標準誤差を示す

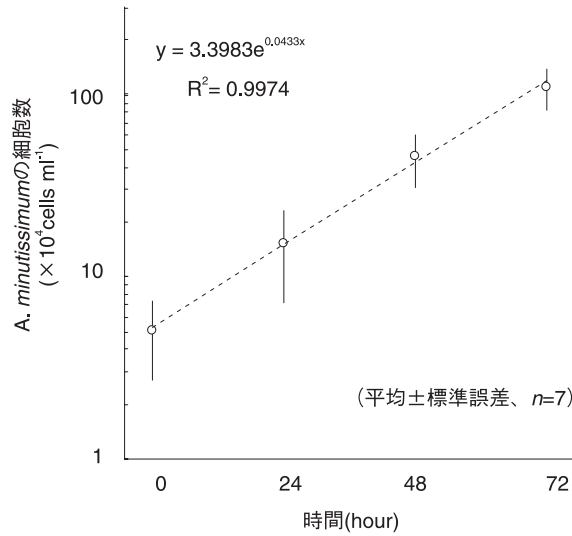


図16 対照区における *A. minutissimum* の生長曲線
図中の縦棒は標準誤差を示す

表15 珪藻 *A. minutissimum* を用いた生長阻害試験の概要

試験生物	<i>Achnantheidium minutissimum</i> NIES-71
初期細胞濃度	約 5×10^4 cells ml ⁻¹ (OD ₆₈₀ ≒ 0.007)
薬剤の濃度段階	公比 : 2.0、設定最高濃度区: 240 μg l ⁻¹
試験期間	静置培養(72時間) (1日に2回試験容器を撈拌)
連数	6連
試験容器	96穴マイクロプレート(平底、蓋付き)
培地	改良 Csi, 200 μl well ⁻¹
試験温度及び照度	20 ± 2°C、約2,000 lux(連続光)
測定項目	20 ± 2°C、約2,000 lux(連続光)
エンドポイント	680nmの吸光度(OD ₆₈₀) 72h-ErC ₅₀
前培養	前培養は固形培地を使用する

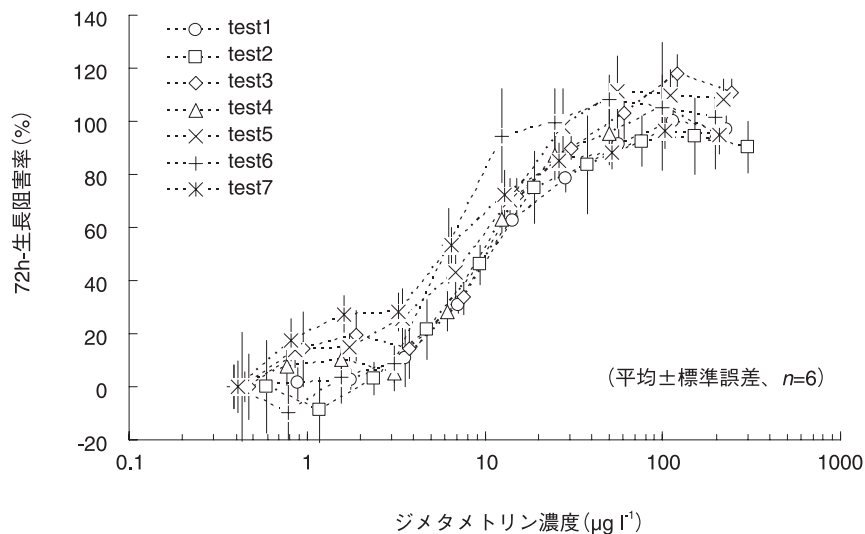


図17 ジメタメトリンによる、*A. minutissimum* の生長阻害曲線
図中の縦棒は標準誤差を示す (6連の試験を7回反復)

2) 最適培養温度及び照度の検討

河川より分離し、種を同定した9種の付着性珪藻について、最適培養条件の検討を行った。それぞれの珪藻の最適培養温度は、*C. molestiformis* が15~25℃、*E. subminuscula*、*F. saprophila* 及び *M. atomus* が15~30℃、*P. lanceolatum* 及び *S. seminulum* が20~25℃、*A.*、*E. minima* 及び *N. palea* が20~30℃、*P. frequentissimum* が25~30℃であった。いずれの種類においても最適培養温度での培養時に、低照度区(約2,000lux)と高照度区(約5,000lux)との間で生長速度に大きな差は認められなかった(図15)。速い生長速度(OD₆₈₀値の倍加時間30時間以下で試験終了時のOD₆₈₀値0.06以上)を示した種は、*C. molestiformis*、*E. minima*、*E. subminuscula*、*F. saprophila*、*M. atomus* 及び *N. palea* であった。一方、生長速度が遅い(試験終了時のOD₆₈₀値が0.03以下)種は、*P. frequentissimum* 及び *S. seminulum* であった(図18)。淡水産付着珪藻は浮遊性緑藻ほど高い生長力が期待できないため、試験温度はそれぞれの最適温度で行うことが、再現性の良い試験のためには重要であると考えられた。

(4) 総合考察

マイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験方法は、三角フラスコ等を使用する従来法と比較して簡易かつ安

価な方法として開発が進められてきた(Blaise et al., 1986; St-Laurent et al., 1992)。本研究は、これまで浮遊性緑藻類を対象試験生物として開発が進められてきたマイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験方法を改良することにより、淡水産付着珪藻の試験生物化を試みたものである。淡水の付着珪藻は河川の優占種として一次生産を支えているため、淡水産付着性珪藻の除草剤感受性を明らかにすることは、日本の河川での優占種ではない浮遊性の緑藻のみを指標生物とした現行の評価手法における不確実性を減少させるための有効な手段の一つに

表16 逆川(白井)及び桜川(君島)から平板培養法により単離した珪藻種

	白井	君島
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	0	10
<i>Achnanthydium</i> sp.	0	3
<i>Craticula molestiformis</i>	0	2
<i>Eolimna minima</i>	1	7
<i>Eolimna subminuscula</i>	0	2
<i>Fistulifera saprophila</i>	0	5
<i>Mayamaea atomus</i>	4	14
<i>Nitzschia palea</i>	44	38
<i>Nitzschia</i> sp.	11	5
<i>Planothidium frequentissimum</i>	0	2
<i>Planothidium lanceolatum</i>	0	2
<i>Sellaphora seminulum</i>	9	2

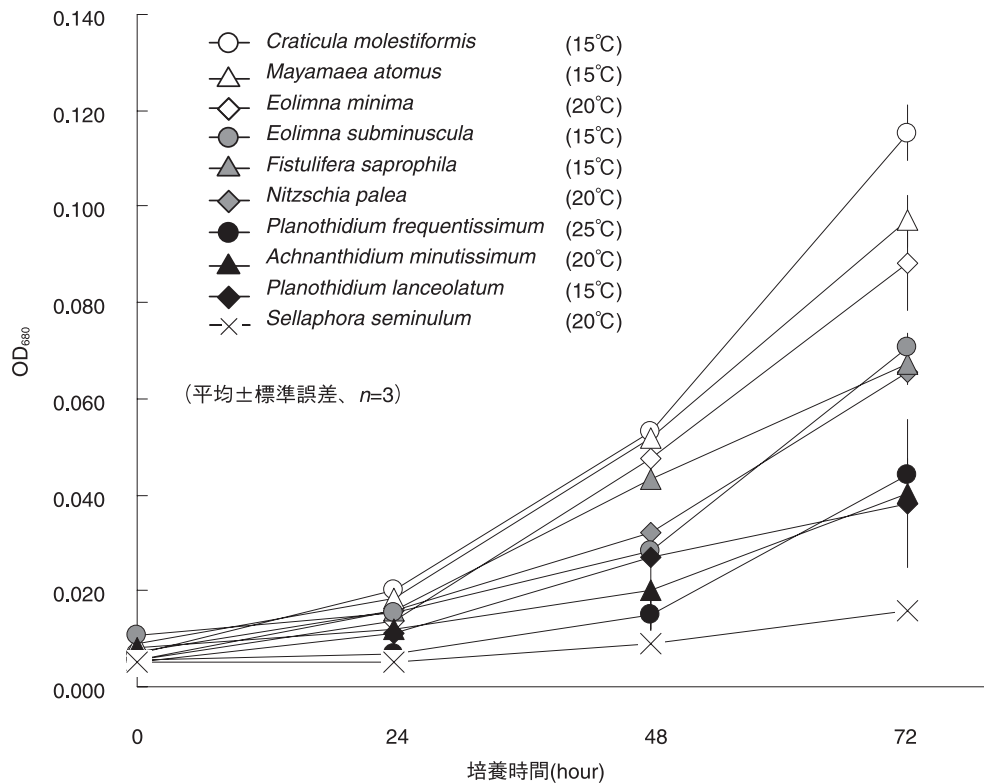


図18 最適温度、2,000luxで培養した珪藻の生長曲線
 図中の縦棒は標準誤差を示す(括弧内：培養温度)

なると考えられる。

現在、日本における農薬の生態影響評価は農用地及び農業用施設外の公共用水域を評価対象地点として想定し、農薬による生態系への影響の可能性を現状より小さくすることを目的としている（環境省水・大気環境局，2005）。農用地及び農業用施設外の公共用水域の大部分は、環境省の示す水域類型の区分の類型B（コイ・フナ域）（環境省水・大気環境局，2002）に相当し、また、水質の汚濁階級（津田，1972）で示す α 貧腐水性から α 中腐水性の水質に相当すると考えられる。本目的の達成には、生態系を構成している生物に対する有害性を明らかにする必要性が高い。従って、上記水質の水域に優占的に生息する生物種に対する有害性評価の結果は、河川生態系を対象とした農薬等化学物質の生態影響評価を行う上で有用な情報になると考えられる。

本章において研究に使用した淡水産付着珪藻はいずれも前述の水域に生息するものである。試験生物としての適用性は、生長速度から判断すると *C. molestiformis*、*E. minima*、*E. subminuscula*、*F. saprophila*、*M. atomus* 及び *N. palea* が高いと評価できた。一方、実環境中での生息範囲の広さ及び野外からの分離培養の容易さから判断すると、*M. atomus* 及び *N. palea* が試験生物として適していると考えられた。今後、これらの試験生物に対する化学物質の影響濃度を明らかにすることにより、河川の微細藻類による一次生産性に及ぼす化学物質の影響評価をより現実的に行えるものと考えられる。

Ⅶ ニッチア属珪藻のトリアジン系除草剤感受性

1 緒言

本章では、第Ⅵ章で開発した珪藻の生長阻害試験方法を利用し、河川及び湖に生息する珪藻の除草剤感受性を明らかにした。第Ⅴ章のリスク評価で、珪藻へのリスクが他の除草剤に比べ高いと評価したトリアジン系除草剤を対象物質とし、試験生物は広範囲の水域に生育する珪藻 *Nitzschia palea* 及び *N. palea* に被殻構造が類似している小型種 (*Nitzschia* sp.1) とした。

2 材料及び方法

(1) 調査地点

茨城県の逆川流域、桜川流域、霞ヶ浦及び福島県の比叡川流域を調査地点とした。珪藻を単離した地点を図19に示した。また、現場の写真を写真4に示した。図19-

1については、採集位置及び地点名は図2と一致している。なお、St.bは水田一筆を示している。また、図19-2については、採集地点として、水田地帯の上流 (St.11) 及び下流 (St.12) を設定した。

(2) 試験生物

珪藻株 (*N. palea* 及び *Nitzschia* sp.1) は、各地点の試料水及び石表面より採集した珪藻群集試料から寒天平板法を利用して単離した。試料水からは、2lの試料水をガラス繊維ろ紙 (Whatman, GF-B) を用いてろ過し、ろ紙上の残渣を1.5%の改良 Csi 寒天培地上に接種した。1~2週間培養後、培地表面に形成されたコロニーを単離した。一方、石表面の珪藻の単離は次のように行った。歯ブラシで石表面から採集した珪藻群集試料を1.5%の改良 Csi 寒天培地上に接種し、1~2週間培養後、培地表面に形成されたコロニーを単離した。いずれの手法についても培養条件は温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照度約2,000lux (白色蛍光灯による上部連続照明) とした。

単離した珪藻株のコロニーの一部を爪楊枝で採取し、市販のパイプ洗浄剤を利用した簡便処理法 (南雲, 1995) により、珪酸質の被殻の試料を作成した。次にマウントメディア (和光純薬工業) で各珪藻株被殻の試料を封入し、永久プレパラートを作成した。各被殻を光学顕微鏡で観察 (1,000倍) し、種を同定した。

St.b-03株及び St.5-01株は、走査型電子顕微鏡 (KEYENCE, VE-8800) で詳細な被殻の観察を行った。

(3) 生長阻害試験

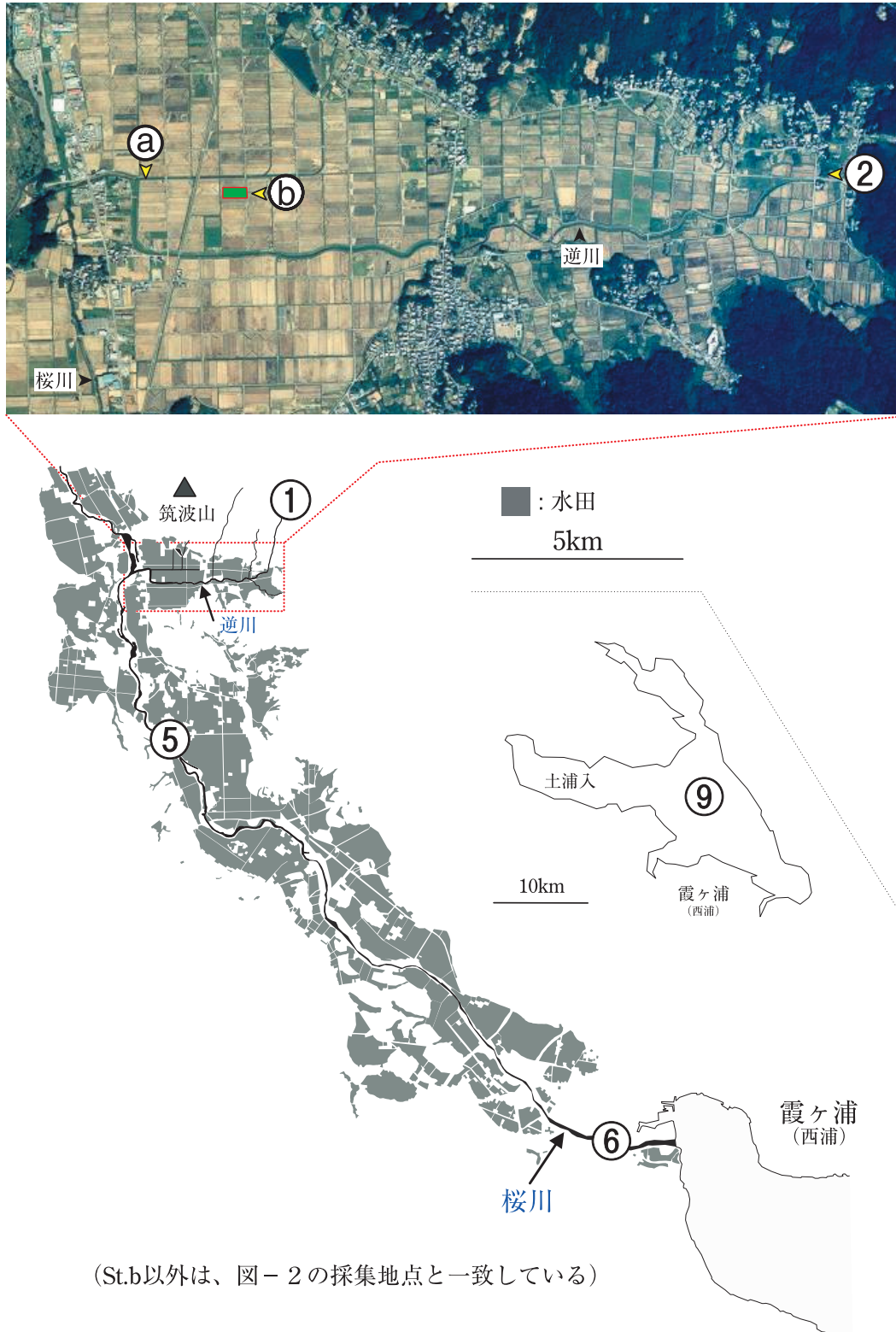
第Ⅵ章の試験方法に準じて試験条件を設定した。トリアジン系除草剤のジメタメトリンを被験物質とし、溶解補助剤はDMSO ($\leq 0.01\%$) を使用した。最高暴露設定濃度を $95 \mu\text{g l}^{-1}$ として公比2.0で11濃度区設定した。試験は1連で行い、エンドポイントは ErC_{50} 0-72h とした。 ErC_{50} 0-72h が $95 \mu\text{g l}^{-1}$ を超える株については、最高暴露設定濃度を $975 \mu\text{g l}^{-1}$ として公比2.0で5濃度区の再試験を行い、 ErC_{50} 0-72h を算出した。

同種同形でジメタメトリン感受性の異なる2株 (St. b-03株及び St.5-01株) については、最高暴露設定濃度を $780 \mu\text{g l}^{-1}$ とし、公比2.2で9濃度区設定した試験を6連で行った。なお、本試験は、試験開始時のジメタメトリン濃度をHPLCで測定し、精度の高い ErC_{50} 0-72h を算出した。HPLCの分析条件は表14に示した。

(4) 各種有機元素含量の計測

珪藻 *N. palea* の一次消費者の餌資源として質の評価を、各種有機元素含量を測定することにより行った。指数増殖期にある 2 株の *N. palea* (St.b-03株及び St.5-01株)

を80℃で一晩乾燥させ 4 mg の乾燥試料を調製した。この乾燥試料について有機元素分析計(Thermo Finnigan、FLASH EA1112型) で炭素、窒素及び硫黄含量を測定した。



(St.b以外は、図-2の採集地点と一致している)

図19-1 霞ヶ浦、桜川流域及び逆川流域における珪藻の採集地点

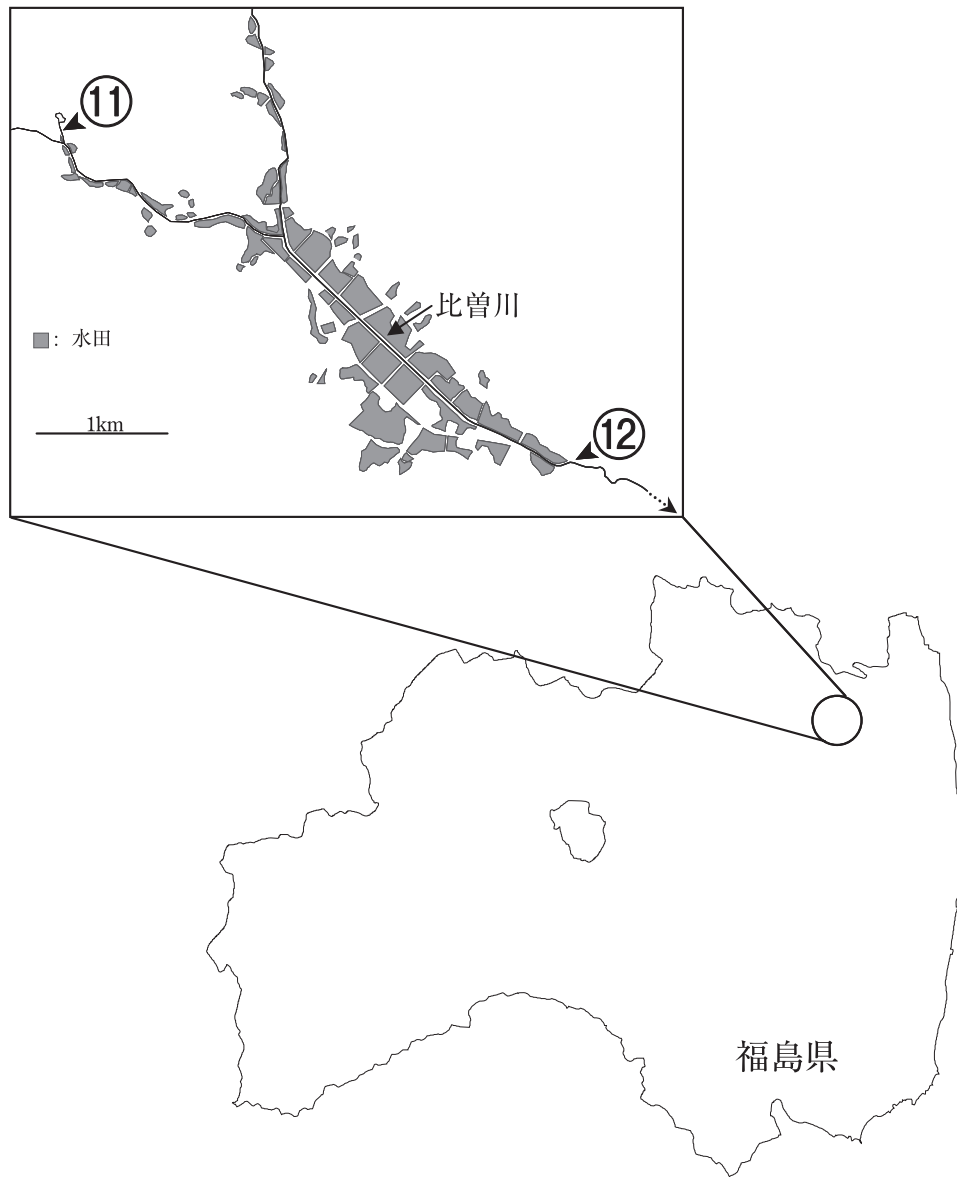


図19-2 比曾川流域における珪藻の採集地点



St. 1 逆川源流域



St. 2 逆川上流域



St. a 排水路



St. b 水田

写真4-1 珪藻の採集地点



St. 5 桜川中流域



St. 6 桜川下流域



St. 9 霞ヶ浦湖心（施設は国土交通省霞ヶ浦河川事務所の観測所）

写真4-2 珪藻の採集地点



St.11 比曾川源流域



St.12 比曾川上流域

写真4-3 珪藻の採集地点

3 結果

(1) 珪藻の単離

St.1及び2からそれぞれ2株、St.11から3株、St.9から5株、St.bから7株、St.aから8株、St.6から9株、St.12から12株、St.5から13株の計61株の珪藻株 (*N. palea* 及び *Nitzschia* sp.1) を単離培養した。単離した各株の光学顕微鏡観察による被殻像を写真5に示す。

走査型電子顕微鏡による St.b-03株及び St.5-01株の被殻像の比較では、2株に相違点はなく、同形同種であることを確認した (写真6)。

(2) ジメタメトリン感受性

61株の生長阻害試験の結果、 ErC_{50} 0-72h の最低値は $3.0\mu\text{g l}^{-1}$ (St.6-09)、最高値は $490\mu\text{g l}^{-1}$ (St.b-05) であり、その違いは約160倍であった。 ErC_{50} 0-72h の平均値は $54\mu\text{g l}^{-1}$ であり、中央値は $8.8\mu\text{g l}^{-1}$ (St.1-02) であった。それぞれの ErC_{50} 0-72h を写真5に示した。6連で試験を行った St.b-03株及び St.5-01株の ErC_{50} 0-72h はそれぞれ $4.5\mu\text{g l}^{-1}$ (95% 信頼限界: 310~550) であった (図20)。

4 考察

本研究結果より、同種の珪藻間でトリアジン系除草剤感受性 (ErC_{50} 0-72h) に100倍を超える大きな差があることが明らかになった。珪藻株を採取した地点別に感受性を比較し考察すると、農業排水の影響が少ない地点 (St.1、2及び11) からは感受性の低下している個体は単離されず、水田内及び水田排水が流入する地点 (St.5、6、12、a及びb) から単離される傾向にあった (図21)。この結果は、除草剤の使用が水田内の珪藻群集の除草剤感受

性に影響を及ぼしていることを示唆するものであった。藻類に対するトリアジン系除草剤の影響評価は、アトラジンを用いた研究で多く、Charlesらはアトラジンの検出される小河川から耐性を得ている緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を単離している (Charles et al., 1989)。また、Kasaiら (1995a) は、トリアジン系除草剤であるシメトリンを暴露した人工池から、感受性の低下した緑藻 *Scenedesmus gutwinskii* を単離している。そして、同じく Kasai (1998) は、水田内からシメトリン感受性の低い珪藻を単離し、低感受性個体の発生要因を除草剤の散布であると考察している。本章の結果も農地がトリアジン系除草剤に対し感受性が低下している個体の起源であることを支持している。

付着性珪藻が一次消費者の餌資源であることを考慮すると、感受性の違いが一次消費者の餌としての質に及ぼす影響を評価することは意義深い。ジメタメトリン感受性が大きく異なる2株 (St.b-03株及び St.5-01株) の各種元素含量を測定した結果では、2株の間の窒素、炭素及び硫黄含量に差はなく (表17)、感受性の違いが餌としての質に及ぼす影響は小さいことが示唆された。また、生長速度に関しても、2株の間で有意な差は認められなかった (図22)。これらの結果は、珪藻群衆内に除草剤に対する感受性の低下した個体が存在したとしても、一次生産者としての機能に影響を及ぼす危険性は小さいことを示唆するものであった。

遺伝的生物多様性の保全の必要性についての議論はあるが、生態系における機能という観点から考察すると、感受性の低下と生態系機能の低下は一致するものではないことを示す重要な結果であると考えられる。

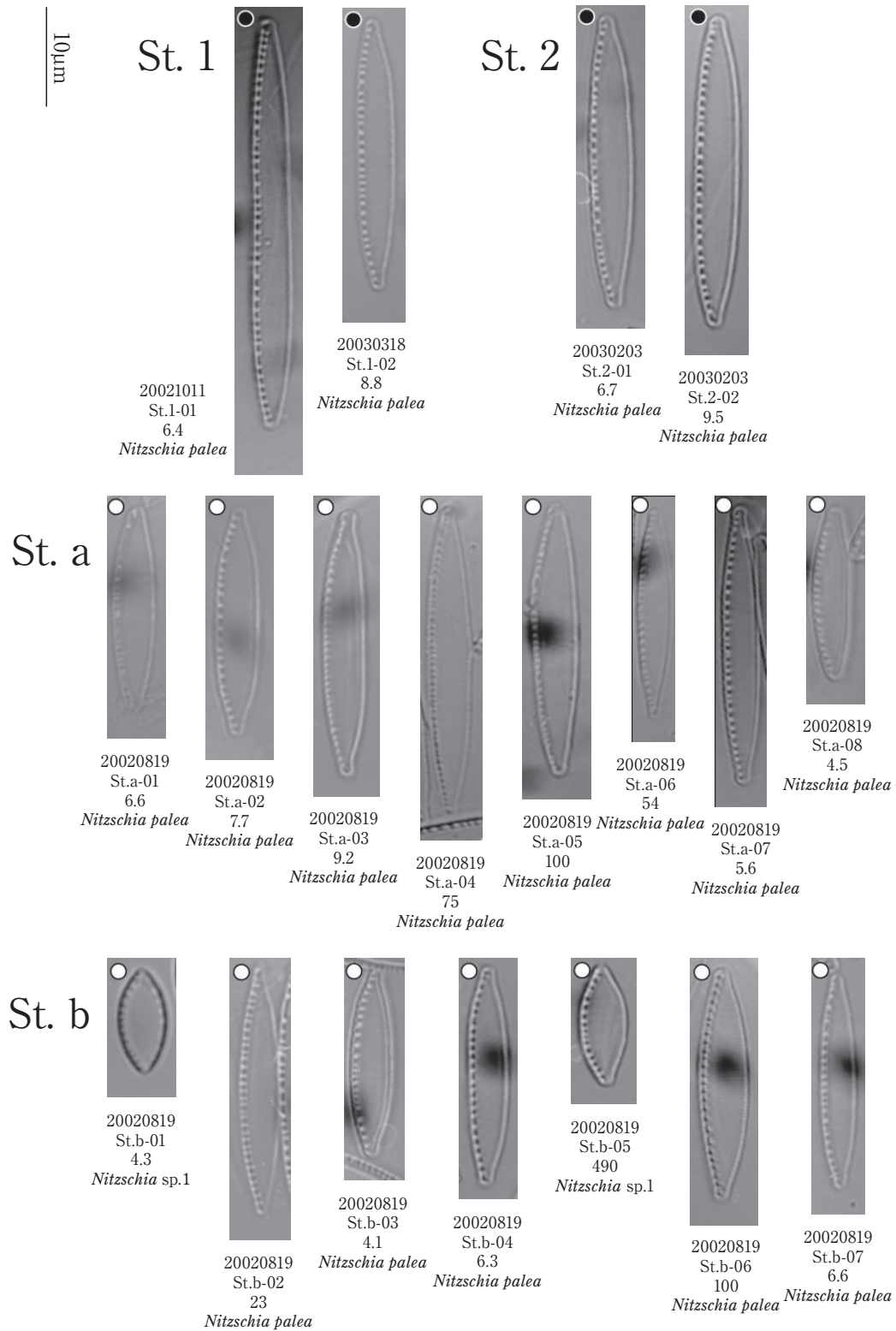


写真5-1 試験に用いた各珪藻株の顕微鏡像
 上から、採集日（西暦・月・日）、株番号、ジメタメトリン感受性（72hEC₅₀、 $\mu\text{g l}^{-1}$ ）及び種名
 それぞれの写真の左上に示した丸印は、○：試料水から単離、●：石表面から単離したことを示す

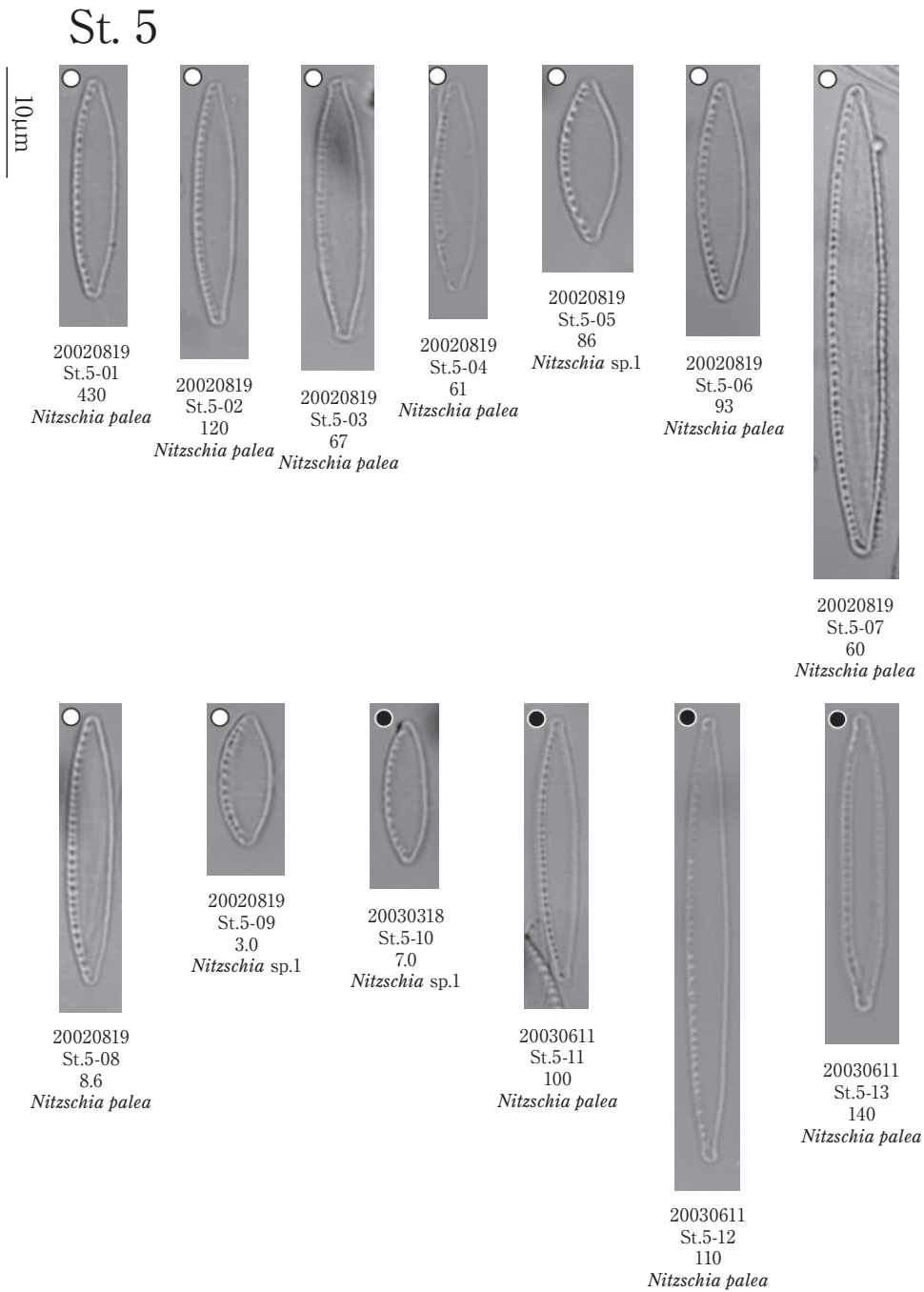


写真5-2 試験に用いた各珪藻株の顕微鏡像
 上から、採集日(西暦・月・日)、株番号、ジメタメトリン感受性(72hEC₅₀、µg l⁻¹)及び種名
 それぞれの写真の左上に示した丸印は、○：試料水から単離、●：石表面から単離したことを示す

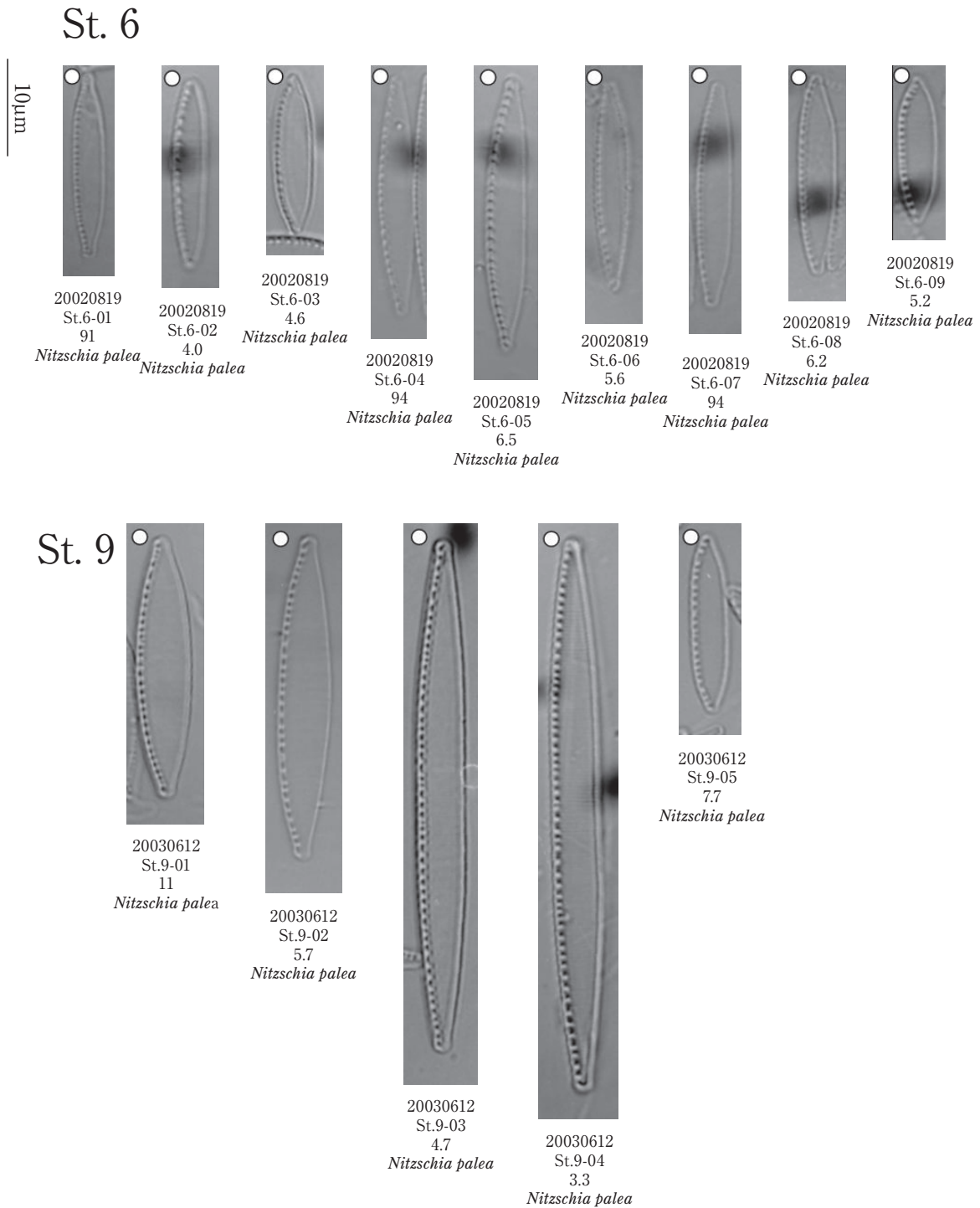


写真5-3 試験に用いた各珪藻株の顕微鏡像
 上から、採集日（西暦・月・日）、株番号、ジメタメトリン感受性（72hEC₅₀、μg l⁻¹）及び種名
 それぞれの写真の左上に示した丸印は、○：試料水から単離、●：石表面から単離したことを示す

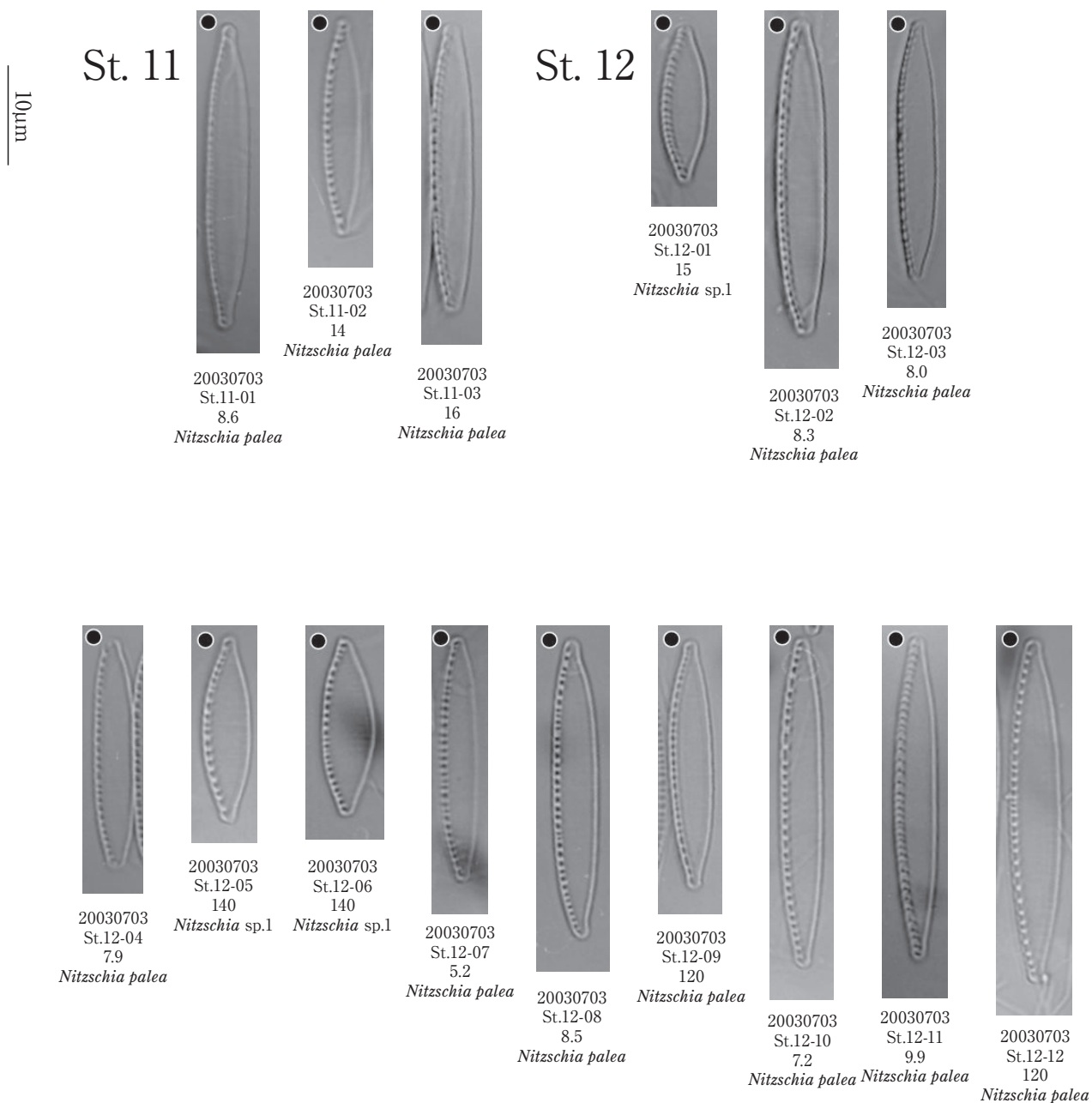


写真5-4 試験に用いた各珪藻株の顕微鏡像
 上から、採集日(西暦・月・日)、株番号、ジメタメトリン感受性(72hEC₅₀, µg l⁻¹)及び種名
 それぞれの写真の左上に示した丸印は、○: 試料水から単離、●: 石表面から単離したことを示す

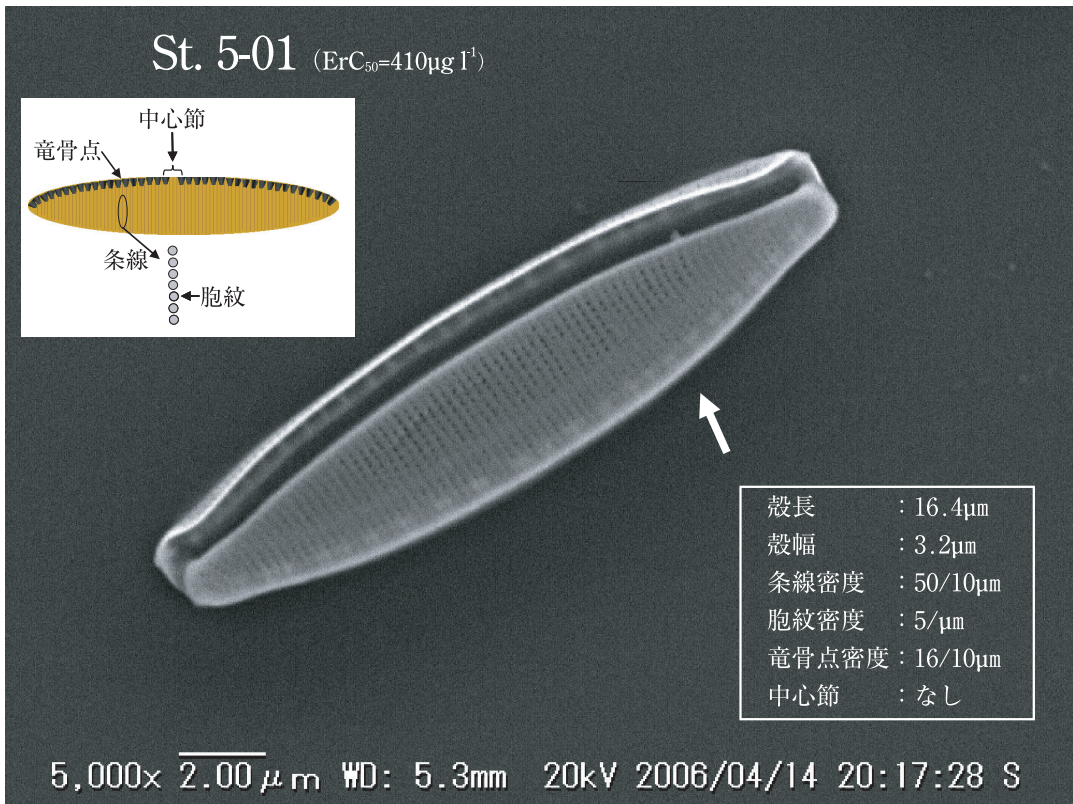
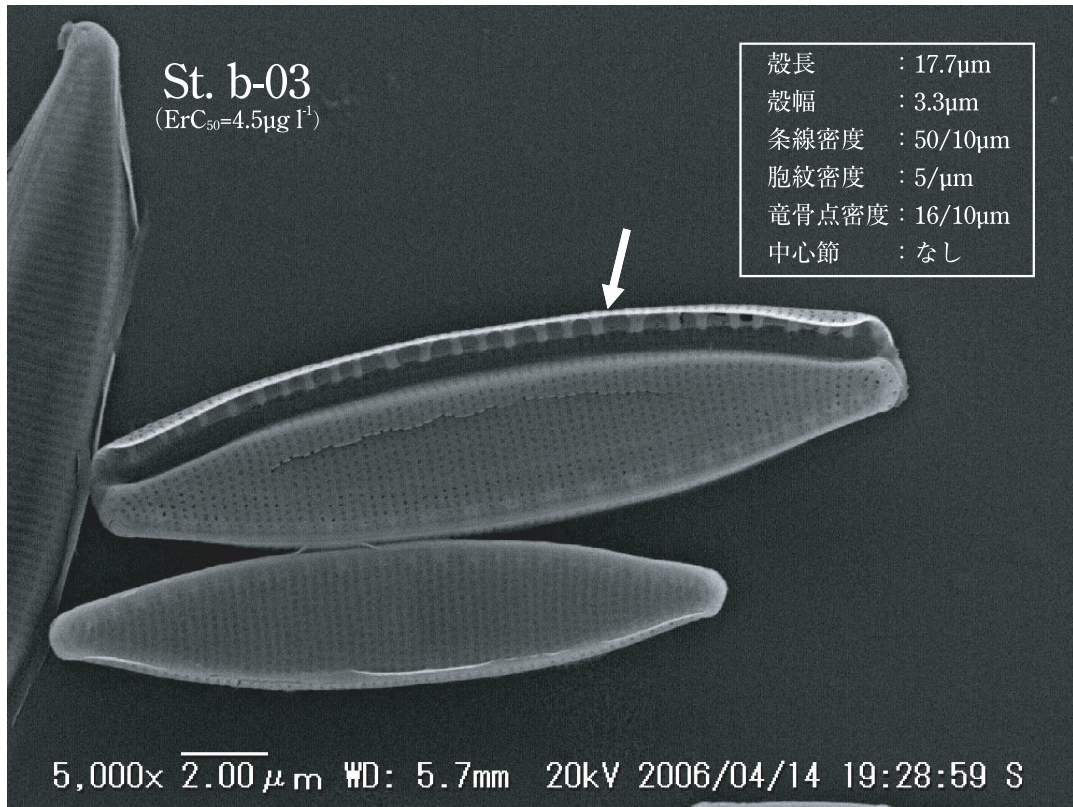


写真6 ジメタメトリン感受性の異なる *Nitzschia palea* 2株の走査電子顕微鏡像

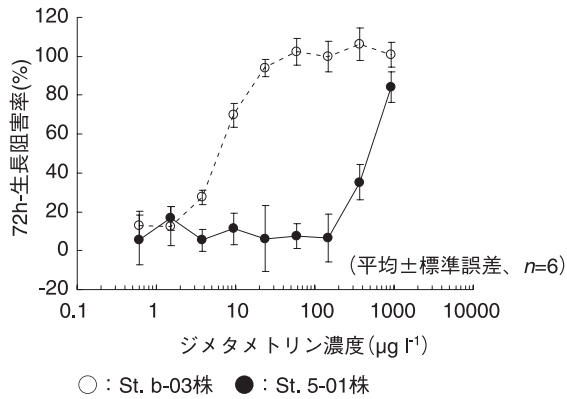


図20 ジメタメトリンによる *Nitzschia palea* St.b-03株及びSt.5-01株の生長阻害曲線
図中の縦棒は標準誤差を示す

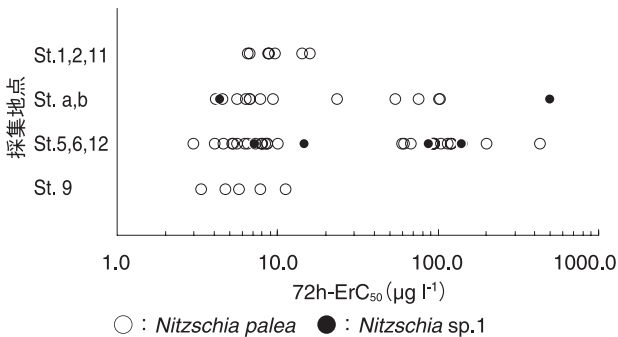


図21 珪藻株のジメタメトリン感受性

表17 *Nitzschia palea* St.b-03株及び St.5-01株の窒素、炭素及び硫黄の含量

	N%	C%	S%	C/N
St.b-03	4.5	51	0	11
St.5-01	4.9	49	0.029	9.9

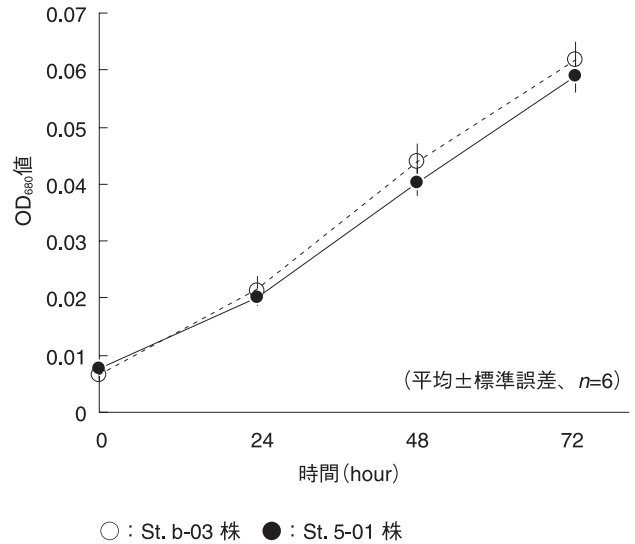


図22 *Nitzschia palea* St.b-03株及び St.5-01株の生長曲線
図中の縦棒は標準誤差を示す

Ⅷ 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性

1 緒言

欧米諸国では農薬等化学物質の生態影響評価に Tier システムが取り入れられており、簡易な評価により有害性が疑われるものについては追加試験を施し、評価の精緻化（個体レベルから個体群・群集レベルの評価へ）が図られている（SETAC, 1994; Campbell et al., 1999）。

第Ⅲ、Ⅵ及びⅦ章で論じた試験方法は、いずれも藻類の個体群を用いた試験、すなわち初期段階の影響評価手

法と考えられる。より現実的・精緻な評価のためには、複数の種・属レベルが混在している群集に対する影響評価が重要である。そこで、本章では、高次の影響評価手法として、第Ⅵ章で開発した珪藻個体群の生長阻害試験法を改良し、珪藻群集を用いた生長阻害試験法の開発を試みた。さらには、開発した方法を利用し、第Ⅶ章で明らかにした、トリアジン系除草剤感受性が低下した珪藻群集の水界生態系における挙動を、茨城県桜川流域及び長野県千曲川流域で調査した。

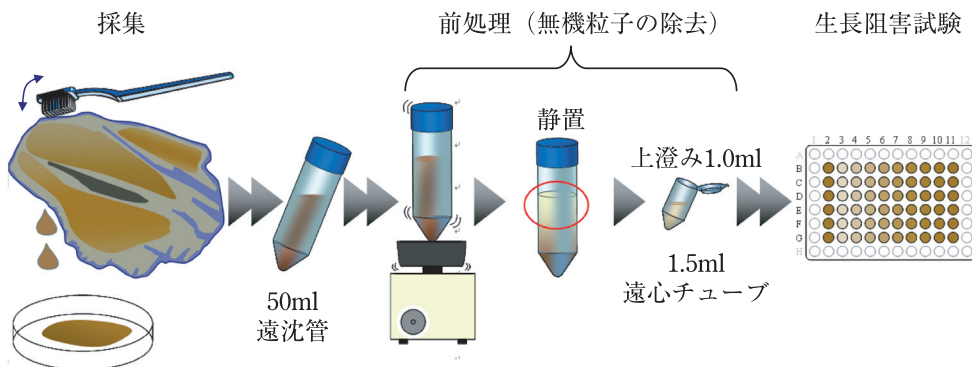


図23 試験生物（珪藻群集）の調製手順の概略

2 材料及び方法

(1) 河川珪藻群集を用いた生長阻害試験方法の検討

珪藻群集を用いた生長阻害試験は、第VI章で開発した試験法の試験生物を培養珪藻株から河床石表面の珪藻群集に代えて検討した。

1) 試験生物

珪藻群集を用いた生長阻害試験では、試験生物として河床の石表面の珪藻群集を使用した。試料採取には歯ブラシを使用した。石表面に堆積している砂などの微細な粒子は、吸光度測定時のバックグラウンドを上昇させ、再現性の高い吸光度測定のため、無機粒子が多量に混入しないよう注意し採取した。持ち帰った試料はボルテックスで攪拌後静置し、上澄み1mlを1.5mlの遠心チューブに移し取った。なお、試験の初期OD₆₈₀を0.015にするため、採取する上澄みのOD₆₈₀は0.8を超えている必要があった。次に、ボルテックス及び卓上簡易遠心機を用い上澄み液が透明になるまで洗浄を繰り返し、これを試験生物とした。試験生物調製方法の概要を図23に示す。

2) エンドポイント

本試験のエンドポイントはErC₅₀ 24-96hとした。通常、藻類の生長阻害試験では、指数増殖期にある藻類細胞を試験生物として使用し、試験期間中、試験生物は指数増殖しているため、エンドポイントとしてErC₅₀ 0-72hが用いられている。しかし、野外より採集した珪藻群集を試験生物とする場合、指数増殖期にない藻類細胞を試験に用いることになり、試験生物が指数増殖期に達するまでに約1日の期間を要した(図24)。そこで、本試験のエンドポイントは指数増殖期である試験開始後24時間から96時間における生長速度から算出したErC₅₀ 24-96hとした。

(2) 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性

1) 試験生物の採集地点及び時期

2004年4月13日から12月13日にかけてSt.2及びSt.5(図2、19)において9回(4/13、4/26、5/10、5/31、6/14、7/18、8/23、9/27、12/13)採取を行い、付着珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性を計測した。珪藻群集は予め河床に固定したレンガ表面(2~4週間放置)より採集した。レンガからの採集が困難な場合は、現場の河床の石表面から採集した。採集した試料は、50mlのプラスチック製の遠沈管に移し、低温(0~10℃)で実験

室に持ち帰り、当日に試験を行った。なお、St.5は周囲に水田が分布しており、水田排水の流入のある地点であった。一方、St.2は上流に水田がない水田排水の影響を受けない地点であった。

2005年7月27日及び11月15日に長野県飯山市、滝沢川、広井川及び千曲川流域(St.13-16、図25、写真7)の、河川河床の石表面より珪藻群集を50mlのプラスチック製遠心管に採集した。採集した試料は低温(0~10℃)で維持し、翌日に生長阻害試験を行った。なお、St.14~16は周囲に水田が分布しており、水田排水の流入のある地点であった。一方、St.13は上流に水田がない水田排水の影響を受けない地点であった。

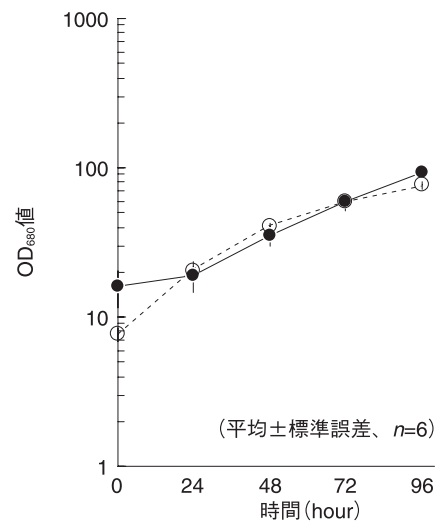


図24 *Nitzschia palea* St.5-01株及び珪藻群集(君島、2004/12/13)の生長曲線
○: *N. palea*(St.5-01株)、●: 君島珪藻群集(2004/12/13)
図中の縦棒は標準誤差を示す

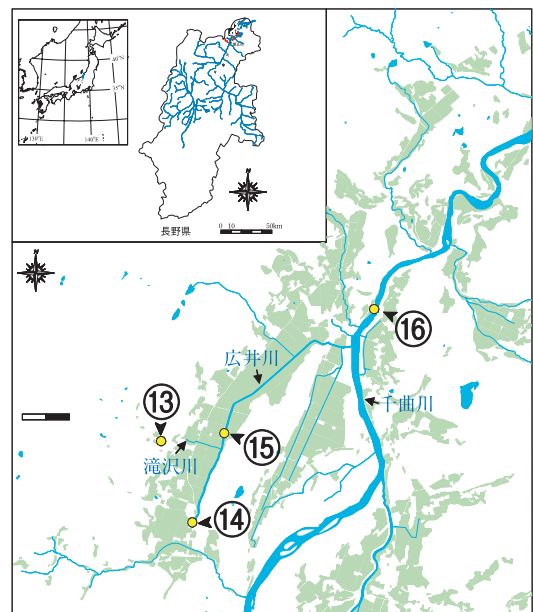


図25 珪藻群集の採集地点(長野県)



St.13 滝沢川源流域



St.14 広井川上流域



St.15 広井川中流域



St.16 千曲川中流域

写真7 珪藻群集の採集地点

2) 試験条件

第VI章の試験方法に準じ試験条件を設定した。トリアジン系除草剤のジメタメトリンを被験物質とし、溶解補助剤はDMSO ($\leq 0.01\%$)を使用した。St.2及び4/13、4/26、5/10に採取したSt.5の試料については、最高暴露設定濃度を $240\mu\text{g l}^{-1}$ とした。その他のSt.5の試料は、最高暴露設定濃度を $490\mu\text{g l}^{-1}$ とした。公比は2.0で9濃度区設定した。St.13~16の試料は、最高暴露設定濃度を $975\mu\text{g l}^{-1}$ とし、公比2.5で9濃度区設定した。いずれの試験においても、試験は6連で行い、試験開始時の OD_{680} は約0.015 (0.010~0.020)とした。培養条件は温度 $20\pm 2^\circ\text{C}$ 、照度約 $2,000\text{lux}$ (白色蛍光灯による上部連続照明)、静置培養 (1日に2回マイクロプレートミキサーにて攪拌)とした。試験開始時のジメタメトリン濃度をHPLCで測定し、 ErC_{50} 24-96hを算出には分析値を用いた。HPLCの分析条件は表14に示した。

3) 試験終了時における珪藻群集の種構成の解析

St.2及び5から採取した試料を用いた試験では、試験終了時 (暴露96時間後)に、対照区の珪藻を回収し、簡便処理法 (南雲, 1995)により珪酸質の被殻の試料を作成

した。次にマウントメディアで各珪藻株被殻の試料を封入し、永久プレパラートを作成した。光学顕微鏡で観察 (1,000倍)し、約500個体を種別に計測した。

3 結果及び考察

(1) 河川珪藻群集のトリアジン系除草剤感受性

茨城県の逆川及び桜川流域について調査した結果、St.2の珪藻群集のジメタメトリンに対する ErC_{50} 24-96hは、 $1.5\mu\text{g l}^{-1}$ から $15\mu\text{g l}^{-1}$ の範囲であった。一方、St.5の珪藻群集の ErC_{50} 24-96hは、 $14\mu\text{g l}^{-1}$ から $240\mu\text{g l}^{-1}$ の範囲であった。農業排水の流入がほとんどないSt.2の珪藻群集のジメタメトリン感受性はSt.5と比べ期間を通じて高い傾向にあった。(図26)。その差は、水田と河川の間で水の移動がある期間 (水稻の作付け期間)により大きくなる傾向にあった。

長野県の広井川及び千曲川流域について調査した結果、7/27に採集した珪藻群集の ErC_{50} 24-96hは、St.13、14、15及び16でそれぞれ、1.1、620、63及び $300\mu\text{g l}^{-1}$ であった。一方、11/15に採集した珪藻群集では、St.13、14、15及び16でそれぞれ、1.4、3.6、28及び $3.2\mu\text{g l}^{-1}$ であった (図27)。なお、St.13、14及び15の試料を用いた

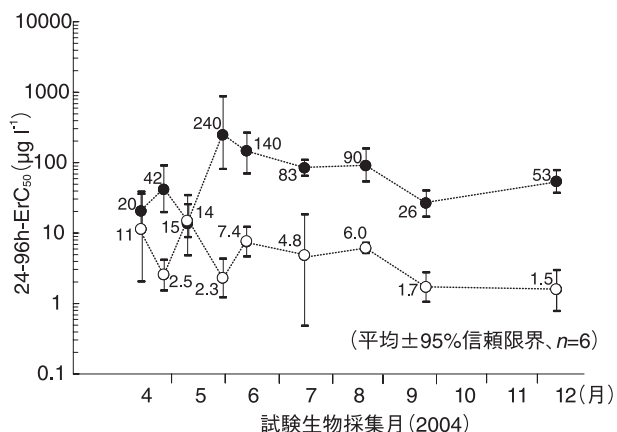


図26 St.2及びSt.5の珪藻群集のジメタメトリン感受性
 ●: St.5の珪藻群集 ○: St.2の珪藻群集
 図中の数値はErC₅₀値を示す、図中の縦棒は95%信頼限界を示す

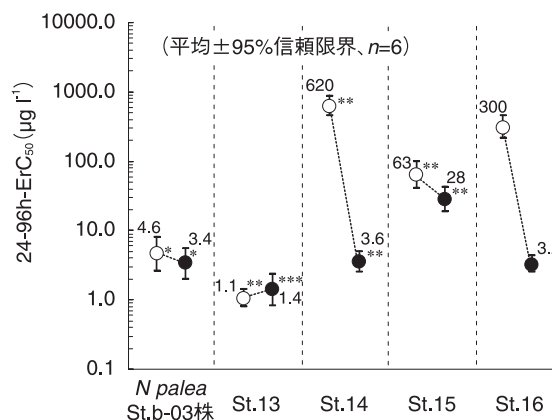


図27 St.13、14、15及び16の珪藻群集のジメタメトリン感受性
 ○: 7/28の試験 ●: 11/16の試験
 図中の数値はErC₅₀値を示す、図中の縦棒は95%信頼限界を示す
 *: 0-72hErC₅₀, **: 48-120hErC₅₀, ***: 72-148hErC₅₀値

試験に関しては、対照区珪藻の生長の速度が遅く、ErC₅₀ 24-96hの算出が不可能であったため、ErC₅₀ 48-120hもしくはErC₅₀ 72-144hを代替のエンドポイントとして算出した。本試験結果も、茨城県の河川での調査結果と同じく、農業排水の影響を受けないSt.13の珪藻群集はジメタメトリン感受性がSt.14-16と比べ高い傾向にあった。また、その感受性差は水稻の作付け期間により大きくなる傾向を示した。これらの結果は、第Ⅶ章で示唆した、農地がトリアジン系除草剤に対し感受性が低下している個体の起源であるという仮説をより強く支持するものであった。

(2) 試験終了時の珪藻群集

逆川及び桜川流域の珪藻群集を用いた生長阻害試験では、試験終了時の対照区では22属54種を超える種類が観察された(表18)。観察された主な種の顕微鏡像を写真8に示した。逆川(St.2)の試験では、*Mayamaea atomus*が優先することが多く、9回の試験のうち6回の試験で試験終了時の第一優占種となった。*M. atomus*以外では、*Nitzschia*属及び*Planothidium lanceolatum*が優占する傾向にあった。8/23の試験は、他の試験と試験終了時の種構成が異なっており、*P. lanceolatum*、*Cocconeis euglypta*及び*Rhoicosphenia abbreviata*が優占していた。桜川(St.5)

の試験では、*Nitzschia*属が優占することが多く、9回の試験のうち6回の試験で試験終了時の第一優占種であった。*Nitzschia*属以外では、*M. atomus*及び*Eolimna*属が優占する傾向にあった。St.5の試験でも、8/23の試験は前後の試験と種構成が異なっていたが、St.2の試験ほど顕著な種構成の違いではなかった。

8/23の試験で試験終了時の対照区の種構成に違いが見られた要因としては、試料採集現場において試料採集約1週間前の8/15に激しい雨(41mm day⁻¹、最大18mm hour⁻¹)が降ったため、河床表面の珪藻が流されてしまい、付着珪藻相が一時的に変化していたものと考えられた。その影響は川幅の狭いSt.2でより明確に表れたものと考えられた。

単一種を対象に開発した生長阻害試験を改良し、河川の珪藻群集の薬剤感受性を簡易に検定する方法を開発した。本手法により珪藻群集の生長に及ぼす化学物質の影響を評価でき、高次の評価手法として期待できた。しかし、本手法は野外の珪藻を直接試験に使用しているため、生物種が採集場所及び季節に左右される。今後、高次の評価に利用する為には、さらに珪藻群集と薬剤感受性に関する知見を集積し、詳細な試験条件を設定する必要があると考えられた。

表18-1 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻(St.2)

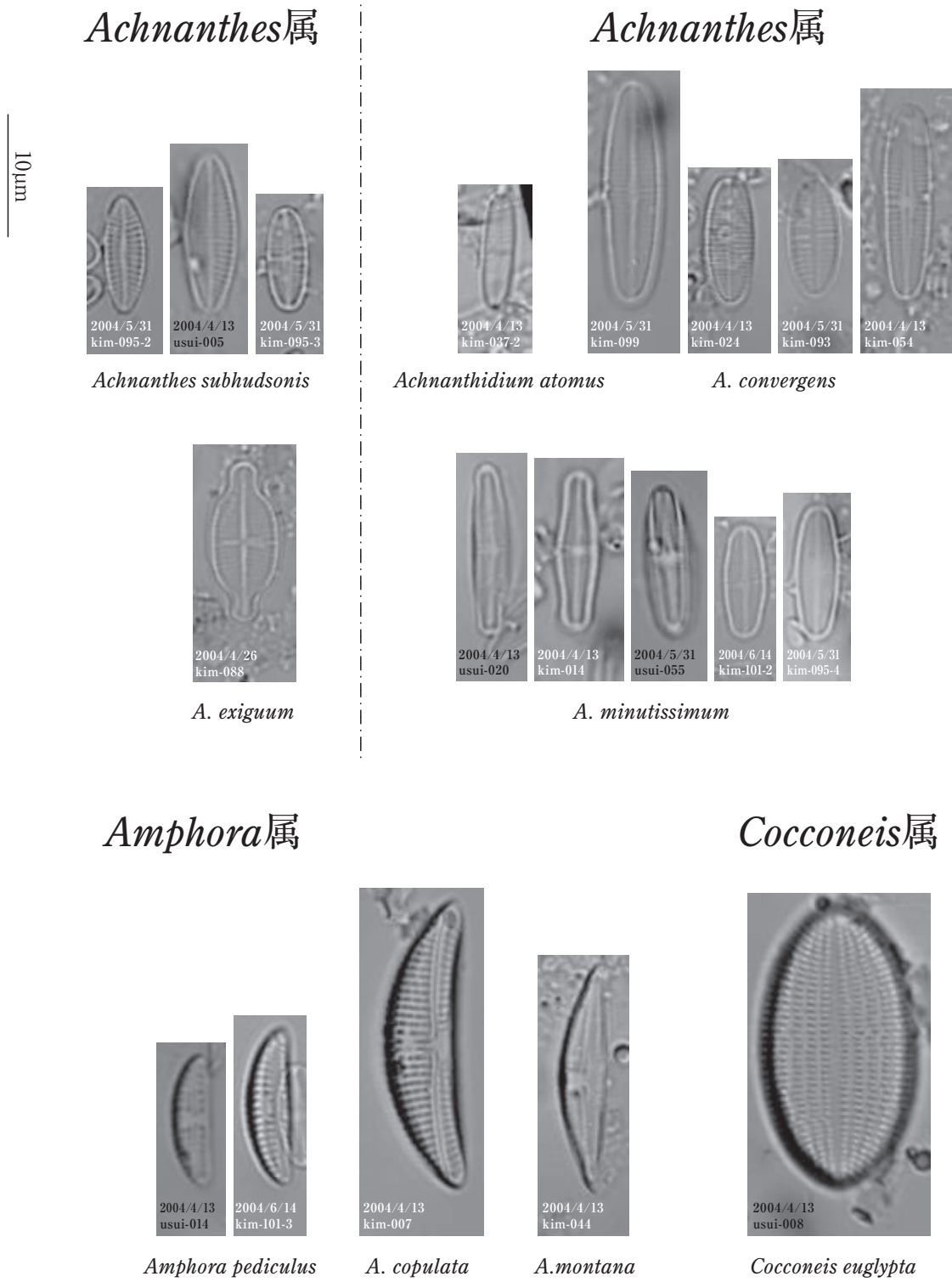
属名	種名	St.2									
		4/13	4/26	5/10	5/31	6/14	7/18	8/23	9/27	12/13	
<i>Achnanthes</i>	<i>Achnanthes subhudsonis</i>	0	1	1	2	0	0	6	0	0	
	<i>Achnantheidium atomus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Achnantheidium</i>	<i>Achnantheidium convergens</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	0	
	<i>Achnantheidium exiguum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0	0	1	5	4	3	8	9	5	
	<i>Achnantheidium</i> spp.	0	2	2	1	0	0	0	0	0	
<i>Amphora</i>	<i>Amphora</i> spp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
<i>Cocconeis</i>	<i>Cocconeis euglypta</i>	0	0	2	6	7	6	99	1	1	
<i>Cyclotella</i>	<i>Cyclotella</i> spp.	0	4	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Cymbella</i>	<i>Cymbella tumida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Encyonema</i>	<i>Encyonema</i> sp.	0	6	0	0	3	1	5	0	0	
<i>Eolimna</i>	<i>Eolimna minima</i>	1	1	4	3	1	8	19	3	15	
	<i>Eolimna subminuscula</i>	6	6	1	4	1	13	52	97	6	
<i>Fistulifera</i>	<i>Fistulifera saprophila</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Fragilaria</i>	<i>Fragilaria vaucheriae</i>	16	5	5	1	1	1	0	0	0	
	<i>Fragilaria</i> sp.	9	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Gomphoneis</i>	<i>Gomphoneis</i> spp.	0	0	0	0	0	0	4	0	0	
<i>Gomphonema</i>	<i>Gomphonema parvulum</i>	0	1	3	14	8	4	39	4	3	
	<i>Gomphonema</i> spp.	0	0	1	3	0	0	21	0	0	
<i>Hippodonta</i>	<i>Hippodonta capitata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Hippodonta pseudoacceptata</i>	2	22	5	32	32	7	5	1	0	
<i>Luticola</i>	<i>Luticola goeppertiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Mayamaea</i>	<i>Mayamaea atomus</i>	19	276	117	190	287	221	2	305	410	
	<i>Navicula cryptocephala</i>	3	3	0	1	1	0	4	2	0	
	<i>Navicula gregaria</i>	38	36	9	7	2	0	0	1	5	
	<i>Navicula lanceolata</i>	1	1	1	6	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula radiosafallax</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
	<i>Navicula rostellata</i>	1	0	1	0	0	2	0	0	0	
	<i>Navicula salinarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula trivialis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula yuraensis</i>	0	2	0	0	0	0	1	1	9	
	<i>Navicula</i> spp.	0	1	1	0	0	3	5	0	0	
	<i>Nitzschia</i>	<i>Nitzschia acicularis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nitzschia amphibia</i>		2	0	0	0	3	1	10	5	0	
<i>Nitzschia dissipata</i>		4	5	0	7	0	0	0	0	1	
<i>Nitzschia fonticola</i>		36	0	0	9	0	0	0	0	0	
<i>Nitzschia hantzschiana</i>		44	15	25	17	4	4	0	0	1	
<i>Nitzschia inconspicua</i>		2	6	2	2	0	1	3	0	0	
<i>Nitzschia linearis</i>		6	0	0	0	3	0	0	0	0	
<i>Nitzschia palea</i>		261	90	306	75	73	120	10	66	24	
<i>Nitzschia recta</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Nitzschia solgensis</i>		0	0	0	1	0	0	1	1	0	
<i>Nitzschia subacicularis</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Nitzschia</i> spp.		9	11	4	6	0	0	0	4	0	
<i>Planothidium</i>	<i>Planothidium lanceolatum</i>	3	11	8	86	100	9	112	0	0	
	<i>Planothidium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Rhoicosphenia</i>	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>	1	0	2	1	0	0	59	0	1	
<i>Sellaphora</i>	<i>Sellaphora japonica</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	<i>Sellaphora pupula</i>	2	0	0	0	0	0	9	0	0	
	<i>Sellaphora seminulum</i>	0	2	1	3	2	13	34	0	19	
<i>Surirella</i>	<i>Surirella angusta</i>	31	1	3	5	2	0	0	0	7	
	<i>Surirella pinnata</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Synedra</i>	<i>Synedra ulna</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Synedra</i> sp.	3	0	5	3	4	0	0	0	0	
	未同定	0	3	1	7	0	0	1	2	1	
	計	505	514	514	506	538	417	510	502	509	

■:第一優占種、■:第二優占種、■:第三優占種

表18-2 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻(St.5)

属名	種名	St.5									
		4/13	4/26	5/10	5/31	6/14	7/18	8/23	9/27	12/13	
<i>Achnanthes</i>	<i>Achnanthes subhudsonis</i>	0	0	0	0	4	0	5	0	0	
	<i>Achnantheidium atomus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Achnantheidium convergens</i>	0	0	0	0	3	1	0	0	0	
<i>Achnantheidium</i>	<i>Achnantheidium exiguum</i>	0	0	0	1	0	1	66	2	0	
	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0	9	14	0	48	23	38	2	5	
	<i>Achnantheidium</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Amphora</i>	<i>Amphora</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Cocconeis</i>	<i>Cocconeis euglypta</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
<i>Cyclotella</i>	<i>Cyclotella</i> spp.	17	12	2	2	1	1	6	3	0	
<i>Cymbella</i>	<i>Cymbella tumida</i>	1	0	0	3	0	0	0	0	0	
<i>Encyonema</i>	<i>Encyonema</i> sp.	0	0	0	1	1	0	1	4	0	
	<i>Eolimna minima</i>	0	1	9	0	57	53	145	10	10	
<i>Eolimna</i>	<i>Eolimna subminuscula</i>	1	11	183	66	54	10	49	25	30	
<i>Fistulifera</i>	<i>Fistulifera saprophila</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Fragilaria vaucheriae</i>	10	1	2	1	0	0	0	0	0	
<i>Fragilaria</i>	<i>Fragilaria</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Gomphoneis</i>	<i>Gomphoneis</i> spp.	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	<i>Gomphonema parvulum</i>	0	0	1	1	0	0	3	4	8	
<i>Gomphonema</i>	<i>Gomphonema</i> spp.	0	0	5	5	5	1	4	1	0	
	<i>Hippodonta capitata</i>	0	1	0	1	0	2	0	0	0	
<i>Hippodonta</i>	<i>Hippodonta pseudoacceptata</i>	0	2	0	1	1	0	5	0	2	
<i>Luticola</i>	<i>Luticola goeppertiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
<i>Mayamaea</i>	<i>Mayamaea atomus</i>	5	35	38	78	94	1	7	14	290	
	<i>Navicula cryptocephala</i>	0	7	0	1	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula gregaria</i>	21	25	1	1	4	0	0	1	22	
	<i>Navicula lanceolata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula radiosafallax</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
<i>Navicula</i>	<i>Navicula rostellata</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
	<i>Navicula salinarum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	<i>Navicula trivialis</i>	3	4	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Navicula yuraensis</i>	0	0	0	1	3	1	0	9	15	
	<i>Navicula</i> spp.	0	0	0	1	1	1	1	3	7	
	<i>Nitzschia acicularis</i>	189	77	0	5	0	0	0	0	0	
	<i>Nitzschia amphibia</i>	1	1	0	0	5	7	37	8	1	
	<i>Nitzschia dissipata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	<i>Nitzschia fonticola</i>	5	11	0	24	0	0	0	6	0	
	<i>Nitzschia hantzschiana</i>	53	26	17	46	2	1	1	9	0	
<i>Nitzschia</i>	<i>Nitzschia inconspicua</i>	1	1	1	2	111	374	80	229	43	
	<i>Nitzschia linearis</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Nitzschia palea</i>	160	229	177	203	64	8	3	169	49	
	<i>Nitzschia recta</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Nitzschia solgensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	<i>Nitzschia subacicularis</i>	3	27	0	0	1	0	0	0	0	
	<i>Nitzschia</i> spp.	5	12	3	13	0	0	2	1	1	
<i>Planothidium</i>	<i>Planothidium lanceolatum</i>	0	1	25	1	9	10	26	2	0	
	<i>Planothidium</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Rhoicosphenia</i>	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Sellaphora japonica</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
<i>Sellaphora</i>	<i>Sellaphora pupula</i>	1	1	1	8	2	1	0	0	0	
	<i>Sellaphora seminulum</i>	0	0	1	0	37	16	26	11	3	
	<i>Surirella angusta</i>	11	3	0	5	0	0	0	0	2	
<i>Surirella</i>	<i>Surirella pinnata</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Synedra ulna</i>	1	1	0	0	0	0	2	1	0	
<i>Synedra</i>	<i>Synedra</i> sp.	11	5	3	35	0	0	0	0	4	
	未同定	1	4	28	12	1	2	8	3	3	
	計	510	509	511	518	509	515	518	520	501	

■:第一優占種、■:第二優占種、■:第三優占種



Achnanthes, *Achnanthidium*, *Amphora*, 及び *Cocconeis*属

写真8-1 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

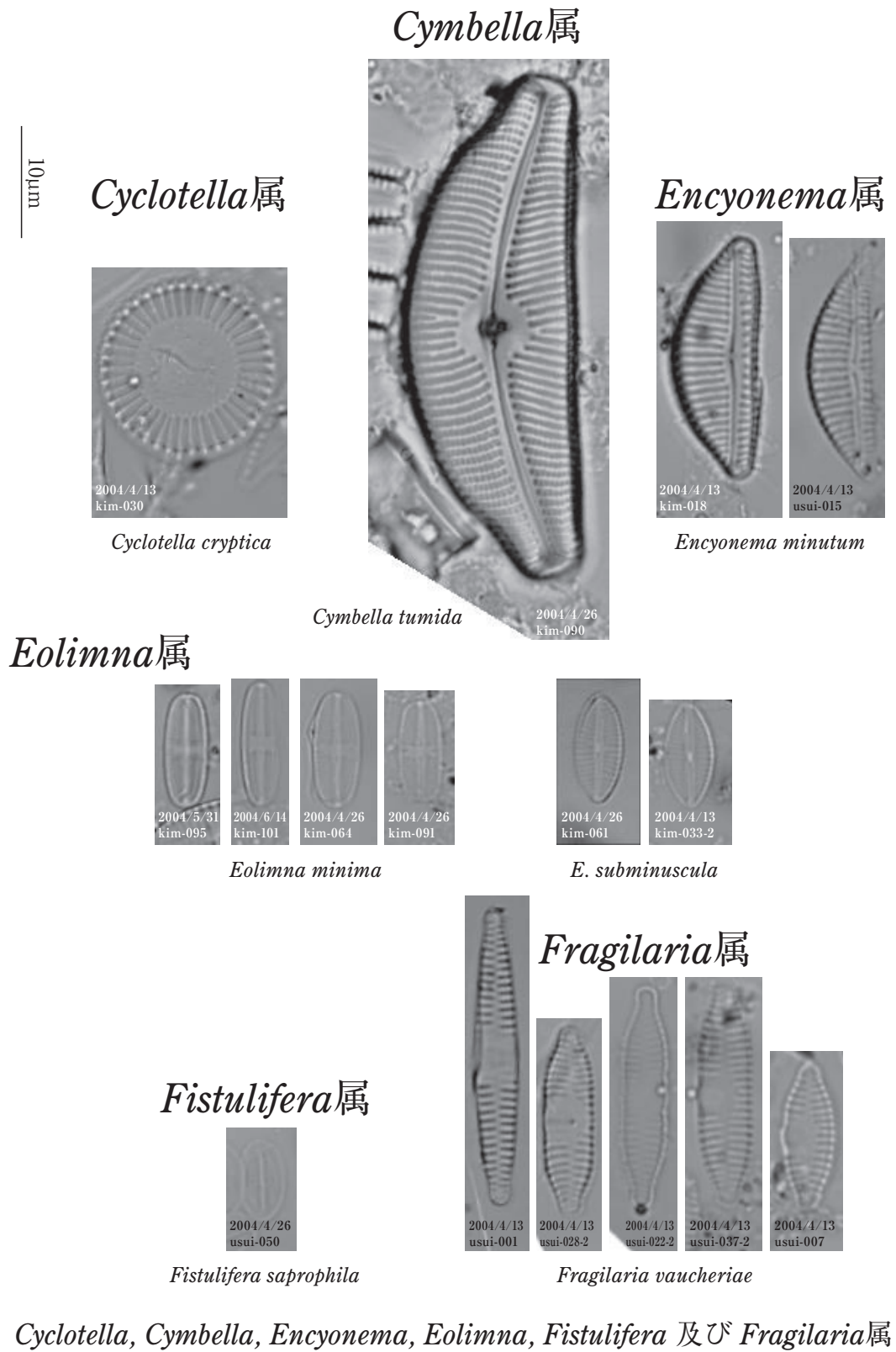


写真8-2 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

Gomphoneis属

Gomphonema属

10µm



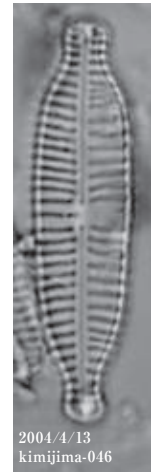
Gomphoneis quadripunctata



G.heterominuta



Gomphonema parvulum



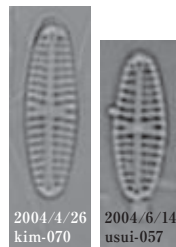
Gomphonema sp.

Hippodonta属

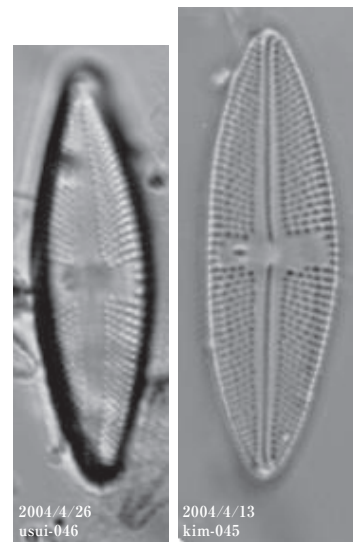
Luticola属



Hippodonta capitata

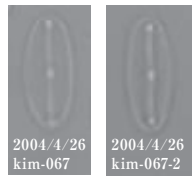


H. pseudoacceptata



Luticola goeppertiana

Mayamaea属

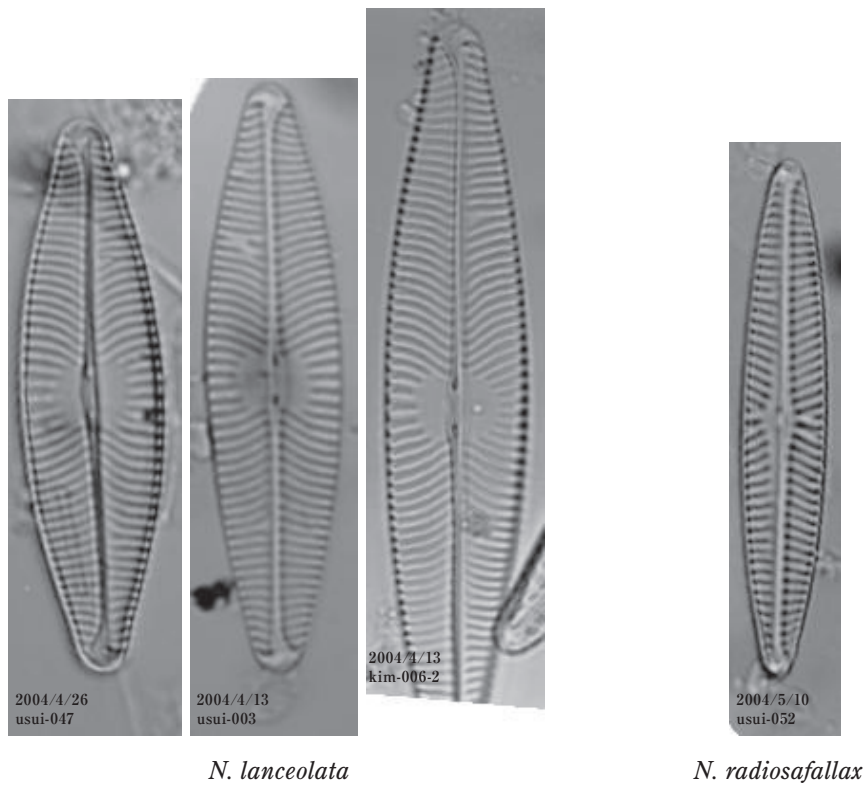
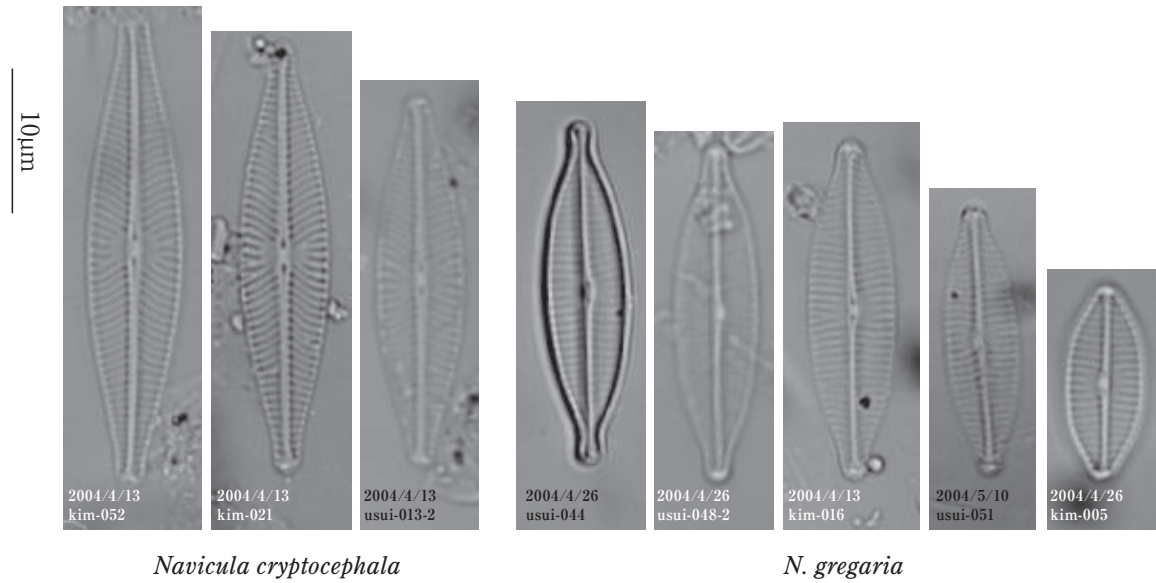


Mayamaea atomus

Gomphoneis, Gomphonema, Hippodonta, Luticola及び Mayamaea属

写真8-3 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

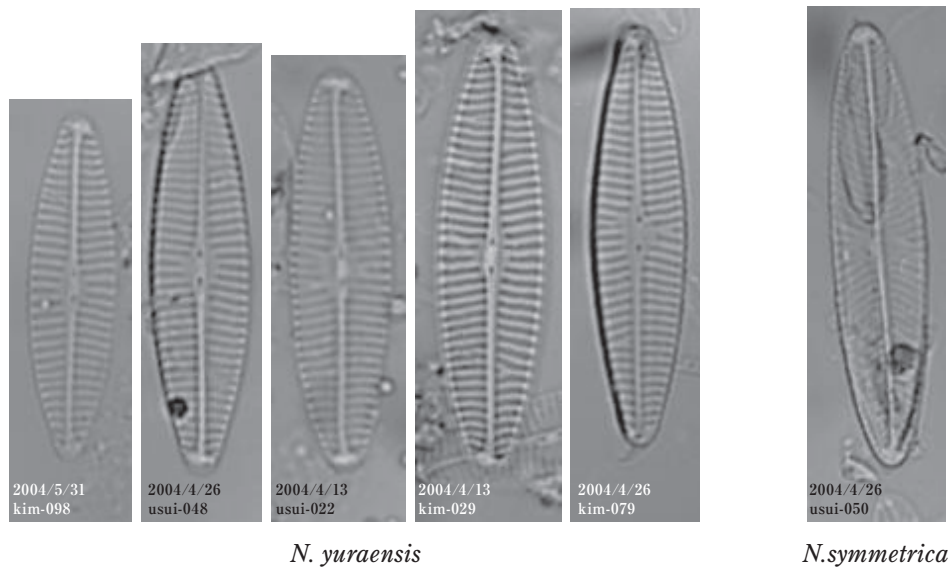
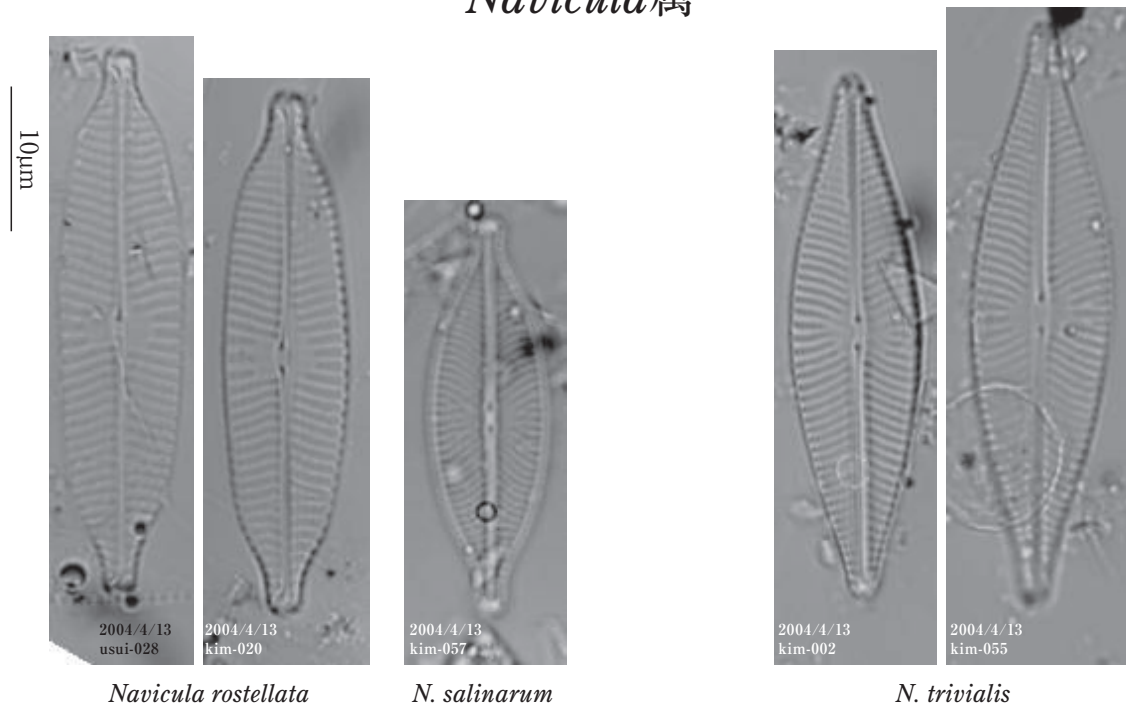
Navicula属



Navicula属-1

写真 8-4 試験終了時（96時間後）の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

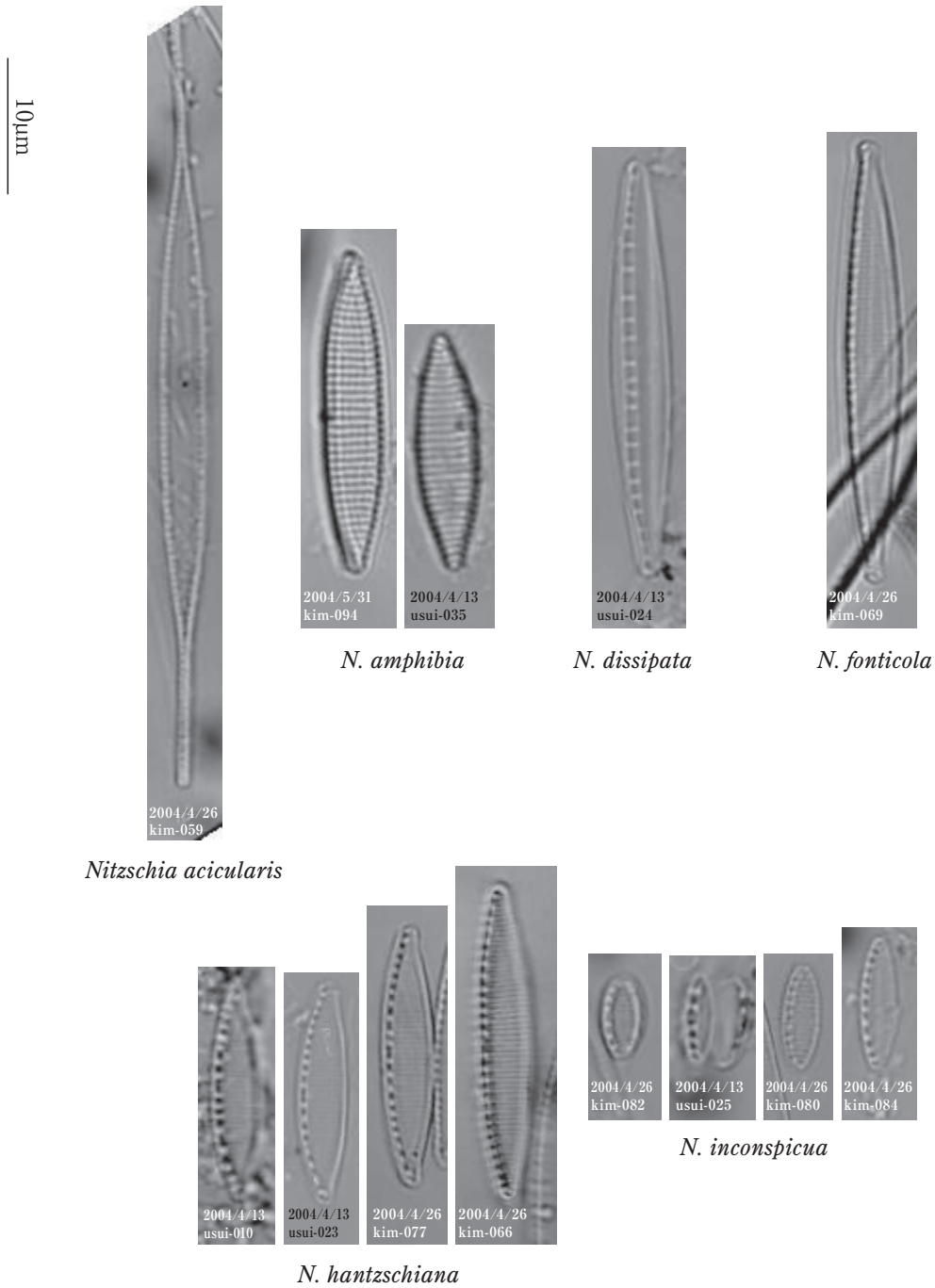
Navicula属



Navicula属-2

写真8-5 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

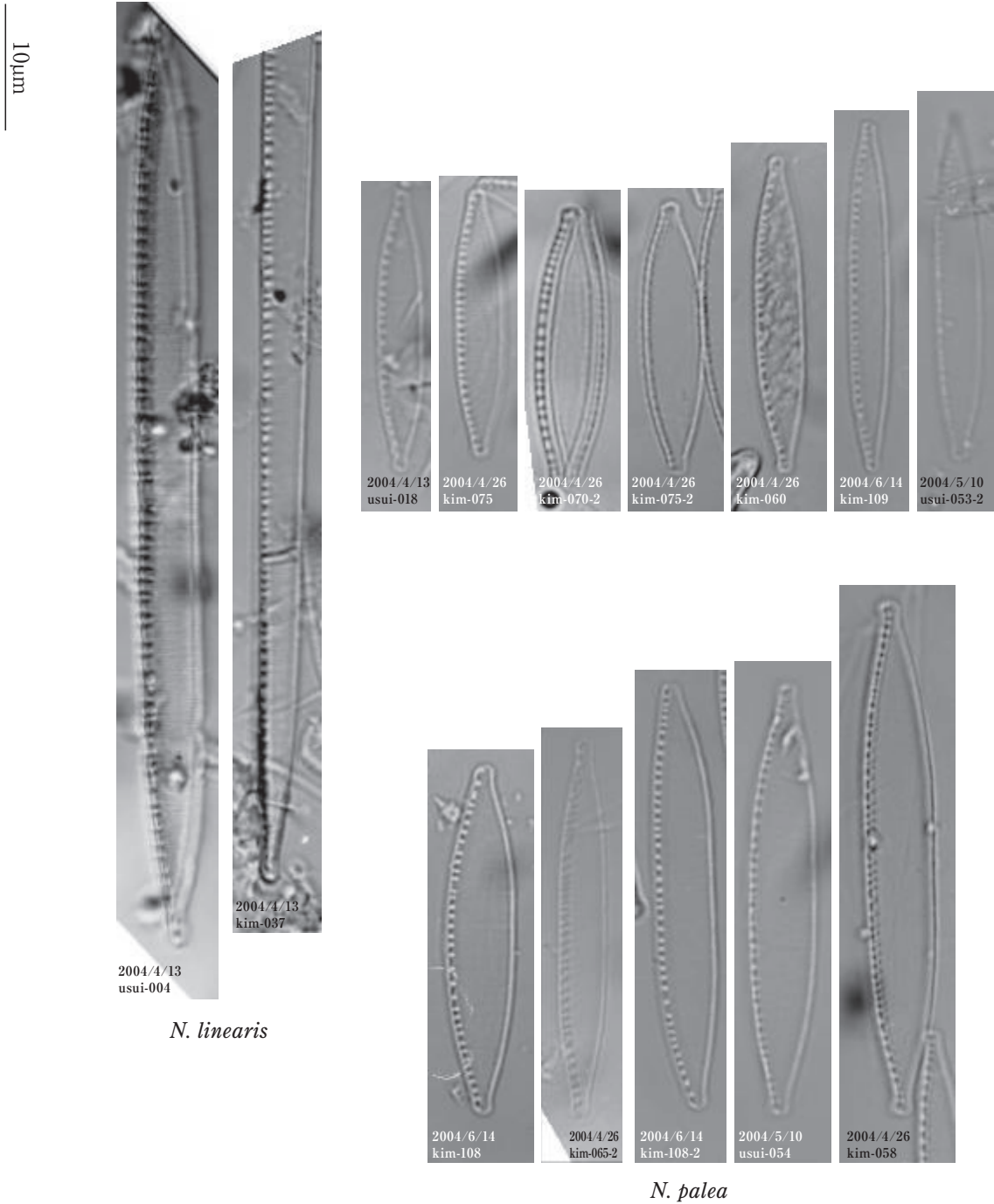
Nitzschia属



Nitzschia属-1

写真8-6 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

Nitzschia属



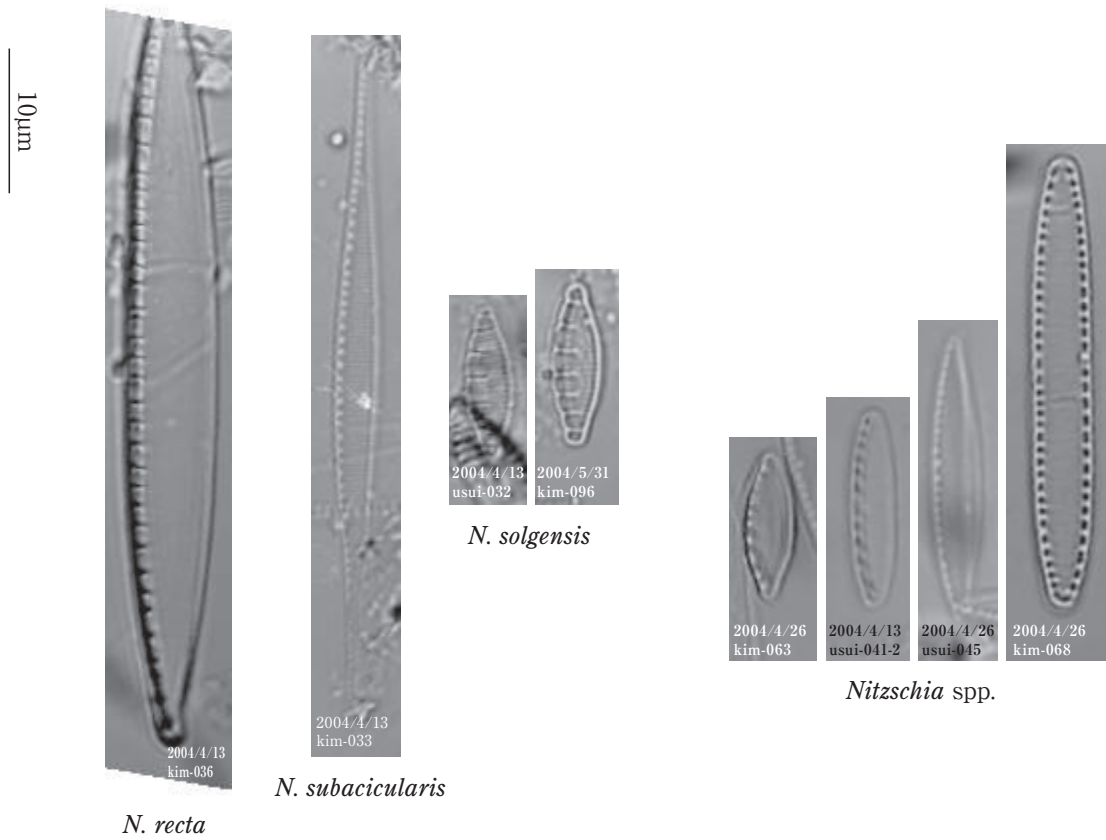
N. linearis

N. palea

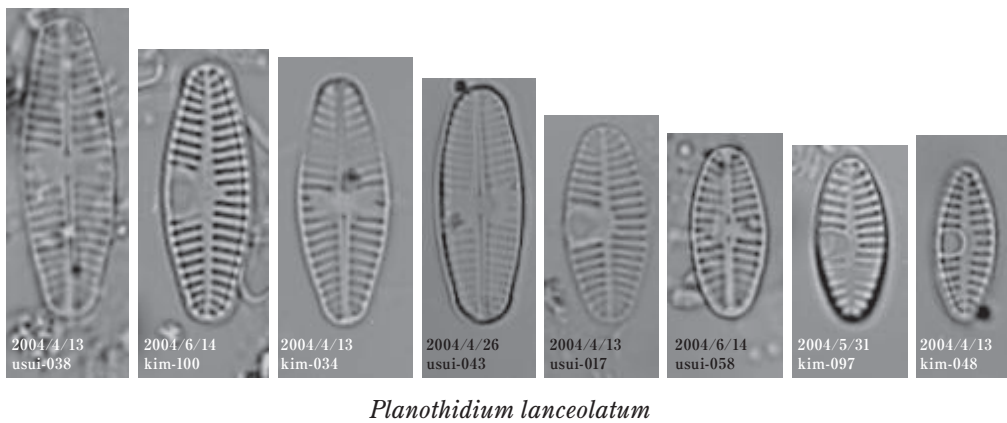
Nitzschia属-2

写真8-7 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

Nitzschia属



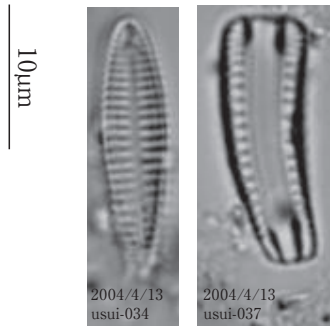
Planothidium属



Nitzschia属-3 及びPlanothidium属

写真8-8 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

*Rhoicosphenia*属

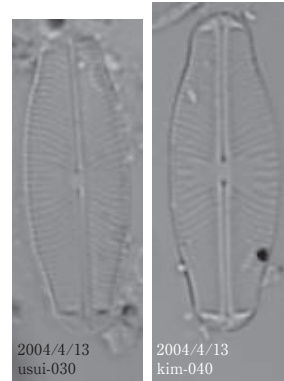


Rhoicosphenia abbreviata

*Sellaphora*属



Sellaphora japonica



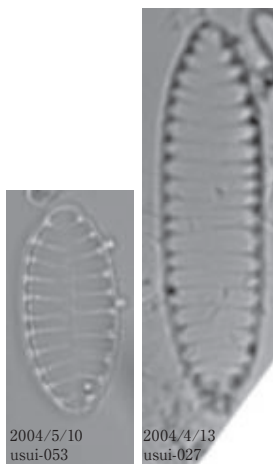
S. pupula



S. seminulum

*Synedra*属

*Surirella*属



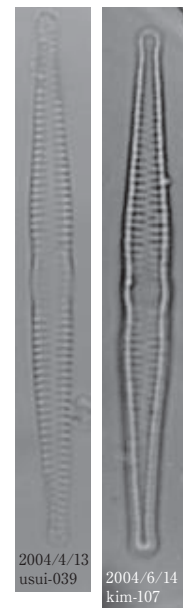
Surirella angusta



S. minuta



Synedra ulna



Synedra sp.



Rhoicosphenia, *Sellaphora*, *Surirella* 及び *Synedra* 属

写真8-9 試験終了時(96時間後)の対照区で観察された珪藻の光学顕微鏡像

IX 結論

本研究により、これまで知見が少なかった藻類に対する除草剤の影響濃度が明らかになると共に、長期かつ広域におよぶモニタリングにより、陸水生態系における一次生産者の水稲用除草剤による詳細な暴露実態が明らかになった。また、フローサイトメトリー技術を利用した細胞計測により、藻類細胞の形態に及ぼす影響および回復性を考慮した容易な評価を可能とした。さらに、これまで試験が困難であった付着性珪藻を使用した生長阻害試験手法の開発は、より現実的な影響評価を可能とした。これらの知見は、農薬の生態影響評価手法の開発に有用な情報であり、現在我が国において実施されている水生生物への生態影響評価につづく高次のリスク評価法としての貢献が大きく期待される。

謝辞

本論文は、著者の農業環境技術研究所における研究成果を平成19年に博士論文として東京農工大学大学院・連合農学研究科に提出し、受理されたものである。

本研究を行うにあたり、農業環境技術研究所上路雅子理事、同研究コーディネータ遠藤正造博士には終始懇切な御指導、御鞭撻を頂いた。また、本論文の取りまとめに際し、適切な御指導と御助言を頂いた宇都宮大学雑草科学研究センター竹内安智教授、東京農工大学生物制御化学研究室安部浩教授、農業環境技術研究所有機化学物質研究領域與語靖洋領域長に厚く感謝の意を表す。農薬の分析法及びデータ解析手法等について、日本植物調節剤研究協会研究所石井康雄博士の御指導と御助言を頂いた。また、珪藻の分類方法及びデータの解析手法等について、東京学芸大学教育学部真山茂樹助教授の御指導と御助言を頂いた。ここに深く感謝を申し上げます。

湖水の採水に当たり、多大なご協力をいただいたHAL東関東アクアラインの大久保裕司氏、採水にご協力頂いたつくば市沼田の稲作農家小倉寿男氏に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり種々の励まし、御協力を頂いた農業環境技術研究所堀尾剛主任研究員、小原裕三主任研究員、横山淳史研究員、石坂眞澄主任研究員、殷熙洙主任研究員、稲生圭哉主任研究員、上垣隆一主任研究員、松本公吉氏、飯泉良行氏、岡田利之氏、鎌田輝志氏、鈴木忠男氏、渡邊浩二氏、高橋正史氏、田島佳子氏、鈴木紀子氏、浜口香代子氏に感謝申し上げます。

最後に、本研究を進める間、終始私を支えてくれた妻石原（旧姓相田）美喜に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Adams, M.S. et al.(2004) : Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1957-1968
- 2) 秋山優ら(1986)：“9. 河川底生藻類の生態” 藻類の生態. p.309-334, 内田老鶴圃, 東京
- 3) Tomlin, C. D. S. ed. : BCPC(The British Crop Protection Council)(2001) : The Pesticide Manual. 12th ed., BCPC Publications, Hampshire
- 4) Tomlin, C. D. S. ed. : BCPC(The British Crop Protection Council) (2003) : The Pesticide Manual. 13th ed., p.732, BCPC Publications, Hampshire
- 5) Berglund, D. L. and S. Eversman(1988) : Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells. *Cytometry*, 9, 150-155
- 6) Blaise, C. R. et al.(1986) : A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxic. Assess.*, 1, 261-281
- 7) Bringmann, G. and R. Kuhn(1956) : Der Algan-Titer als Masstab der Eutrophierung von Wasser und Schlamm. *Gesundheitsingenieur*, 77, 374
- 8) Campbell P.J.et al.(1999) : Guidance document on higher-tier aquatic risk assessment for pesticide (HARAP). p.5-18, SETAC-Europe, Brussels, Belgium
- 9) Charles M. Hersh and William G. Crumpton (1989) : Atrazine tolerance of algae isolated from two agricultural streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 327-332
- 10) Chisholm, S.W. et al.(1988) : A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343
- 11) Cid, A. et al.(1995) : Flow cytometry determination of acute physiological changes in a marine diatom stressed by copper. *Microbiologia.*, 11, 455-60
- 12) Environment Canada(1992) :Biological test method: growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum* Report EPS 1/RM/25. Environment Canada, Ottawa
- 13) European Union(1997) : Establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of

- plant protection products on the market (Council directive 97/57/EC)
- 14) Franklin, N.M. et al.(2004) : Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1452-1462
 - 15) Franqueira, D. et al.(2000) : Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.*, 247, 119-126
 - 16) Gary M.R. (1995) : Algal and Vascular Plant Tests : Fundamentals of Aquatic Toxicology. 2nd ed., p.135-169, Taylor & Francis, London
 - 17) GEF (Global Environmental Forum) (1997) : GEF List of Strains '97 : Microalgae and Protozoa. p.9-27, Global Environmental Forum, Tokyo
 - 18) Hamala, J. A. and H. P. Kollig(1985) : The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. *Chemosphere*, 14, 1391-1408
 - 19) 廣瀬弘幸ら(1977) : 日本淡水藻図鑑. p.39, 内田老鶴圃, 東京
 - 20) 堀克也ら(1982) : 熊本県内水圏における農薬汚染. 生態化学, 5, 3-13
 - 21) 飯塚宏栄(1989) : 水稲用除草剤の水系における動態. 農業環境技術研究所報告, 6, 1-17
 - 22) ISO(International Standards Organization) (1989) : Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO8692
 - 23) ISO(International Standards Organization) (1995) : Water quality-marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*
 - 24) Jansen, M. S. and R. Altenburger(2005) : Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 62, 539-545
 - 25) Jurgensen, T. A. and K. D. Hoagland. (1990) : Effects of short-term pulses of atrazine on attached algal communities in a small stream. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 617-623
 - 26) 環境庁編(1992) : 平成4年版環境白書 総説. p.100-111, 環境庁, 東京
 - 27) 環境庁国立環境研究所編(1995) : 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. 国立環境研究所特別研究報告, 19, 1-64
 - 28) 環境庁国立環境研究所(1999) : 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. 国立環境研究所特別研究報告, 29, 1-52
 - 29) 環境省水環境部(2002) : 農薬生態影響評価検討会第2次中間報告 - 我が国における農薬生態影響評価の当面の在り方について -. p.1-47
 - 30) 環境省 水・大気環境局(2002) : 水生生物の保全に係る水質目標について. p.8-14, 環境省, 東京
 - 31) 環境省 水・大気環境局(2005) : 環水土発第050801003「農薬取締法第3条第1項第4号から第7号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める等の件の一部を改正する件」について
 - 32) Kasai F. and S.Hatakeyama(1993) : Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*, 27, 899-904
 - 33) Kasai, F. and T. Hanazato(1995a) : Genetic changes in phytoplankton communities exposed to the herbicide simetryn in outdoor experimental ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 154-160
 - 34) Kasai, F. and S. Hatakeyama(1995b) : Changes in herbicides susceptibility of algae in a river running through an agricultural region. *Ecol. Chem.*, 5, 292-296. (Russian)
 - 35) Kasai, F.(1998) : Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application. *Chemosphere*, 38, 919-931
 - 36) Kobayashi, H. and S. Mayama(1982) : Most pollution-tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo. *Jap. J. Phycol.*, 30, 188-196
 - 37) Kobayasi, H. and S. Mayama(1989) : Evaluation of river water quality by diatoms. *Korean J. Phycol.*, 4, 121-133
 - 38) 小竹美恵子ら(1993) : 水田排水が流入する小河川への水田農薬の流出. 愛知県農業総合試験場研究報告, 25, 69-79
 - 39) Lange-Bertalot, H.(2001) : Diatom of Europe Volume2 Navicula sensu stricto 10 genera separated from Navicula sensu lato Frustulia. A.R.G.Gantner Verlag K.G., p.116
 - 40) 丸論(1991) : 水系環境における農薬の動態に関する研究. 千葉県農業試験場特別報告, 18, 1-62
 - 41) 松原孝之ら(1963) : 有明海における除草剤 PCP 被害調査. 佐賀県養殖試験場報告, 1, 1-13

- 42) Mayama, S. (1999) : Taxonomic revisions to the differentiating diatom groups for water quality evaluation and some comments for taxa with new designations. *Diatom*, 15, 1-9
- 43) Mayama, S. and H. Kobayasi (1988) : Morphological variations in *Navicula atomus* (Kutz.) Grun. In Round, E. F. (ed.). Proceedings of the ninth international diatom symposium, Bristol, 1986. p.427-435, Biopress, Bristol
- 44) 御厨初子ら (1983) : 佐賀県における水田地帯のクリーク水の農薬による汚染. 生態化学, 6, 23-33
- 45) 水戸部英子ら (1999) : 水田地域を流域とする河川水中における農薬濃度の変動. 環境化学, 9, 311-320
- 46) 三菱化学安全科学研究所 (1999) : 環境庁委託業務報告書 平成10年度農薬の生態影響評価システム確立調査. p.58-70
- 47) 南雲保 (1995) : 簡単に安全な珪藻被殻の洗浄法. *Diatom*, 10, 88
- 48) 中村幸二 (1993) : 水田及び水田周辺における除草剤の消長. 埼玉県農業試験場研究報告, 46, 30-71
- 49) 中内啓光 (2004) : 新版フローサイトメトリー自由自在. 秀潤社. 東京
- 50) Nelson, K.J. et al. (1999) : Chronic effects of atrazine on tolerance of a benthic diatom. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1038-1045
- 51) 日本植物防疫協会 (1986) : 農薬要覧1986年. p.258-278, 日本植物防疫協会, 東京
- 52) 日本植物防疫協会 (2001) : 農薬ハンドブック2001年版. p.711-766, 日本植物防疫協会, 東京
- 53) 日本植物防疫協会 (2002) : 農薬要覧2002年. p.332-377, 日本植物防疫協会, 東京
- 54) 日本植物防疫協会 (2003) : 農薬要覧2003年. p.329-375, 日本植物防疫協会, 東京
- 55) 日本植物防疫協会 (2004) : 農薬要覧2004年. p.324-372, 日本植物防疫協会, 東京
- 56) 日本植物防疫協会 (2005a) : 農薬要覧2005年. p.328-377, 日本植物防疫協会, 東京
- 57) 日本植物防疫協会 (2005b) : 農薬ハンドブック2005年版. p.476-679, 日本植物防疫協会, 東京
- 58) 農業・生物系特定産業技術研究機構 (2006) : 最新農業技術辞典. 農山漁村文化協会, 東京
- 59) 農林水産省農業環境技術研究所 (1995) : 農業環境研究叢書第9号. p.50-117, 茨城
- 60) 農林水産省農産園芸局 (2000) : 農薬の登録申請に係る試験成績について (平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知), 東京
- 61) 農林水産省生産局 (2002a) : 農薬の登録申請書等に添付する資料等について (平成14年1月10日付け13生産第3987号農林水産省生産局長通知), 東京
- 62) 農林水産省生産局 (2002b) : 「農薬の登録申請書に添付する資料等について」 (平成14年1月10日付け13生産第3987号農林水産省生産局長通知) の運用について (13生産第3988号農林水産省生産局生産資材課長通知), 東京
- 63) 農林水産省生産局生産資材課 (2001) : 「農薬の登録申請に係る試験成績について」 (平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知) の運用について (平成13年10月10日付け13生産第3986号農林水産省生産局生産資材課長通知), 東京
- 64) OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (1984) : Environment monographs No. 105 report of the OECD workshop on environmental hazard/risk assessment. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris
- 65) OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (2002) : Proposal for updating guideline 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris
- 66) Ohyama, T. et al. (1987) : Fate and behavior of herbicides, butachlor, CNP, chlomethoxynil, and simetryne in river water, shellfish, and sediments of the Ishikari River. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 555-562
- 67) Okamoto, Y. et al. (1998) : Surface water monitoring survey for bensulfuron methyl applied in paddy fields. *J. Pest. Sci.*, 23, 235-240
- 68) Ono, H. and J. Nakanishi (1987) : Herbicide, CNP contamination in the Lake Kasumigaura basin. *Wat. Res.*, 21, 669-675
- 69) Reiriz, S. et al. (1994) : Different responses of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* to copper toxicity. *Microbiologia.*, 10, 263-72
- 70) Rioboo, C. O. Gonzalez et al. (2002) : Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat Toxicol.*, 59, 225-35
- 71) Rimet, F. et al. (2004) : Impacts of fluoranthene on

- diatom assemblages and frustule morphology in indoor microcosms. *Vie Milieu*, 54, 145-156
- 72) Saroja, G and B. Salil(1982) : Effects of methyl parathion on the growth, cell size, pigment and protein content of *Chlorella protothecoides*. *Environ. Pollut. Ser. A.*, 27, 297-308
- 73) Seguin, F. et al.(2001) : Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Ann. Limnol. – Int. J. Limnol.*, 37, 3-8
- 74) SETAC(Society of environmental toxicology and chemistry)(1994) : Pesticide risk assessment & mitigation. p.23-75, SETAC Press, Pensacola, Florida
- 75) Shigeoka T. et al.(1988) : Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 847-854
- 76) Shiraiishi,H. et al.(1988) : Behaviour of pesticides in Lake Kasumigaura. *Japan. Sci. Total Env.*, 72, 29-42
- 77) 衆議院 (1962) : 第041回国会農林水産委員会第6号, 議事録(41- 衆 - 農林水産委員会 - 6号 昭和37年08月28日)
- 78) Skulberg, O. M.(1964) : Algal problems related to the eutrophication of water supplies, and bioassay method to assess fertilizing influences of pollution on inland waters. In D. F. Jackson (ed.), *Algal and Man*. Plenum Press, New York
- 79) 園池公毅(2005) : パルス変調クロロフィル蛍光測定におけるデータの解釈. 日本光合成研究会会報, 42, 7-12
- 80) Stauber, J.L.,N.M. Franklin and M.S. Adams(2002) : Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.*, 20, 141-143
- 81) St-Laurent, D. and C. Blaise(1992) : Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 7, 35-48
- 82) Sudo, M. et al.(2002) : Concentration and loading of pesticide residues in Lake Biwa basin (Japan). *Wat. Res.*, 36, 315-329
- 83) 竹内誠(1992) : 水質浄化機能の評価手法. 農林水産技術会議事務局 農業環境技術研究所 多面的機能評価手法の手引き. p. 1-30
- 84) Tang, J. et al.(1997) : Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 631-637
- 85) Torres, A.M. and O' Flaherty, L.(1976) :Influence of pesticides on *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Stigeoclonium* (Chlorophyceae), *Tribonema*, *Vaucheria* (Xantophyceae) and *Oscillatoria* (Cyanophyceae). *Phycologia*, 15, 25-36
- 86) Troussellier, M. et al.(1993) : Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell.*, 78, 111-121
- 87) 津田松苗(1972) : “第2部汚水生物体系論” 水質汚濁の生態学. p.53-134, 公害対策技術同友会, 東京
- 88) Tsuda, T. et al.(1996) : Pesticides in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 442-449
- 89) U. S. Environmental Protection Agency (1971) :Algal assay Bottle Test, National Eutrophication Research Laboratory
- 90) U. S. Environmental Protection Agency (1974) : Marine algal assay Procedure Bottle Test, National Eutrophication Research Laboratory
- 91) U. S. Environmental Protection Agency (1996) : Ecological effects test guidelines:Algal toxicity Tiers I and II, OPPTS 850.5400
- 92) Vu Hong Son et al.(2002) : Monitoring pesticide runoff from rice paddy fields for developing a river water quality model. The 3rd International Symposium-Environmental Issues in Korea and Japan. p.103-112
- 93) Vu Hong Son et al.(2003) : Fate and transport of rice pesticide in agricultural surface water –Model concept and testing for river water compartment-, The 4th International Symposium-Environmental Issues in Korea and Japan. p.52-59
- 94) 渡辺仁治(1962) : 北海道常呂川の水質汚濁に対する珪藻の種類数に基づく生物指標. 日本生態学会誌, 23, 86-101
- 95) Watanabe, T. et al.(1986) : Saprophylic and eury saprobic diatom taxa to organic water pollution and diatom assemblage index (DAIpo). *Diatom*, 2, 23-73
- 96) 渡辺仁治(2005) : “第3章 湖沼, 河川胸中の水質汚濁指数 DAIpo” 淡水珪藻生態図鑑. p.18-53, 内田老

鶴圃，東京

97) Wehr, J. D. and P. G. Sheath (2003): Freshwater algae of North America ecology and classification. p.32-36 Academic press, New York

98) 山谷正治ら(1981)：空中散布された農薬の水系における消長．生態化学，4, 37-44

Development of Risk Assessment Procedure for Evaluating Effect of Herbicides on Primary Productivity of River Ecosystem

Satoru Ishihara

Summary

Organochemicals Division, National Institute for Agro-Environmental Sciences / 3-1-3 Kannondai, Tsukuba, 305-8604, Japan

(Present address: Physical and Chemical Properties Evaluation Division, Agricultural Chemicals Inspection Station/ 2-772, Suzuki-cho, Kodaira-shi, 187-0011, Japan)

Algal communities are important for the maintenance of functioning ecosystems in fresh, brackish, and marine aquatic environments. Planktonic and periphytonic algae form the base of most food chains, produce oxygen, and are important in the nutrient cycle. Alterations of a phytoplankton community as a result of toxic stress may affect the structure and functioning of the whole ecosystem.

In Japan more than half of agricultural land is paddy fields, and various herbicides are used for rice cultivation. The herbicides applied to paddy fields are apt to flow into water bodies such as rivers and lakes and those were detected in rivers at concentrations of several micrograms per liter for some months after the rice-planting season. Although it is important to understand the effects of herbicides on primary production in riverine ecosystems of Japan, only a few studies have examined the influence of rice herbicides on aquatic plants.

Planktonic green algae are generally used test species for first tier aquatic risk assessment of pesticides. However, these species are not indicators suitable enough for assessing influence of pesticides to primary productivities at riverine ecosystems. In streams, attached diatoms (ADs) usually are dominant algal groups in terms of biodiversity and comprise major biomass, therefore, the phytotoxicity of chemicals to ADs or AD communities will be significant indicators for higher tier risk assessment.

The objectives of this study were to investigate exposure characteristics of rice herbicides at riverine ecosystems of Japan, to compare the relative sensitivity of various algal taxa to herbicides, to develop the growth inhibition test method using fresh water ADs, and to construct more realistic and scientifically sound ecological risk assessment procedure for primary productivity.

1. The eighteen kinds of paddy rice herbicides concentration in water samples at Sakura R. and L. Kasumigaura were monitored from 2001 to 2005. The highest concentrations of the rice herbicides were observed at Sakura R. during middle May to early June and these concentration levels at the midstream of Sakura R. were 0.12-8.8 $\mu\text{g l}^{-1}$. The residual rice herbicides observed in Sakura R. water was rapidly diluted and dispersed in L. Kasumigaura and the dilution magnification from downstream of Sakura R. to Tsuchiura bay of L. Kasumigaura was 3 to 17 times. The annual trends of the detected rice herbicides concentration at midstream of Sakura R. were almost correlated with the annual trend of sales amounts of these rice herbicides in Ibaraki prefecture.

2. By comparing $\text{EC}_{50}(0-72 \text{ h})$ values (50% growth inhibition concentration at 72 h after treatment), the sensitivities

of four unicellular algal species to fourteen herbicides were investigated. The test species were green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella vulgaris*), a diatom (*Achnanthes minutissimum*), and a blue-green alga (*Merismopedia tenuissima*). Test herbicides were selected based on frequency of recent usage in paddy fields in Japan and were four carbamates (thiobencarb, esprocarb, molinate, dimepiperate), three amides (pretilachlor, mefenacet, cafenstrole), two triazines (dimethametryn, simetryn), two sulfonylureas (bensulfuronmethyl, imazosulfuron), a urea (daimuron), a thiadiazine (bentazone), and a quinone (quinoclamine). The certain amide, triazine and sulfonylurea herbicides were highly hazardous for any tested species of algae. EbC₅₀ values of pretilachlor and cafenstrole were 1.7–4.3 µg l⁻¹ for the green alga *P. subcapitata*, those of triazines were 0.30–25 µg l⁻¹ for all test algae, and those of sulfonylureas were 0.70–10 µg l⁻¹ for the blue-green alga *M. tenuissima*. In contrast, the herbicides mefenacet, bentazone, daimuron, and thiocarbamates posed low hazards to these four algae.

3. The effects of forty herbicides on cell morphologies of the freshwater microalgae such as *P. subcapitata*, *A. minutissimum* and *M. tenuissima* were investigated by microscopic observation, measuring side scatter (SSC) intensity and autonomous fluorescence (AF₆₁₀) of chlorophyll a using a flow cytometry. Morphological changes and differences in chlorophyll a amount of these microalgae were induced by the exposures to high concentration (10mg l⁻¹ or water solubility) of herbicides. Especially, the responses on cell shape of *P. subcapitata* were greater than those of two other species and these reactions observed in *P. subcapitata* were classified into four types. The cell volumes were greatly increased at the highest concentrations (6 to 12 times of EbC₅₀) of the five herbicides (bensulfuronmethyl, esprocarb, mefenacet, pretilachlor, and thiobencarb) and the blanching cells were observed in incubations with three herbicides (esprocarb, quinoclamine and thiobencarb). The recoverability from morphological changes of *P. subcapitata* cells was confirmed in exposure experiments with seven kinds of herbicides (bensulfuronmethyl, esprocarb, mefenacet, pretilachlor, quinoclamine, simetryn and thiobencarb). It is clear that every treated *P. subcapitata* population did not extinct in a short time (72h) exposures of high concentration of seven herbicides, and that the recoverability of *P. subcapitata* population is apt to decline with increasing the amount of blanching cells.

4. A risk assessment was conducted based on calculated ErC₅₀ values and the detected highest concentration of herbicides in the Sakura R., Saka R., L. Kasumigaura and Paddy drain. This assessment strongly suggested that certain amides, triazines, and sulfonylureas may pose a relatively high ecological risk to aquatic ecosystems in Japan.

5. A growth inhibition test method using fresh water attached diatoms was developed by improving microplate algal assay technique for planktonic green algae. Applying the solid culture technique for the pre-culture, using the flat bottom microplate for the test vessel and vortexing the microplate at least twice a day were necessary procedures to ensuring the reproducibility of the test using attached diatoms. Reproducible result was obtained from seven repetitions of growth inhibition tests using dimethametryn, a triazine herbicide on *A. minutissimum* of attached diatom. The average ErC₅₀ values calculated from these tests was 7.9µg l⁻¹ ($n=7$, SE=1.3). The optimum culture condition and the adaptability as test organism were evaluated in ten kind of attached diatoms (*A. minutissimum*, *Craticula molestiformis*, *Eolimna minima*, *Eolimna subminuscula*, *Fistulifera saprophila*, *Mayamaea atomus*, *Nitzschia palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Planothidium lanceolatum*, *Sellaphora seminulum*). The optimum culture temperature was 15–30°C. The difference of illumination intensity (c.a.2,000lux or c.a.5,000lux) did not influence the growth rate of every diatom at the optimum culture temperature. It is concluded that *C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus* and *N. palea* are suitable test species in these diatoms in terms of high growth potential and that *M. atomus* and *N. palea* are valuable test species in terms of habitat diversity and easiness of isolation.

6. The 61 strains of the attached diatom (*Nitzschia* spp.) were isolated from several areas, Saka R., Sakura R. and Hiso

R. basins and L. Kasumigaura. The ErC_{50} values of dimethametryn ranged over two orders of magnitude among the strains. Tolerant strains were collected only from midstream site, suggesting that the strains may have been selected by the herbicide in paddy fields. The difference in organic element contents (carbon, nitrogen and sulfur) was not significant between two strains of *N. palea* which have different susceptibilities to dimethametryn. The results indicated that the changes in dimethametryn susceptibilities of diatoms don't cause serious disadvantages as primary producers.

7. The growth inhibition test for single species was improved to apply for diatom communities, as higher tier impact assessment. Using the method, the susceptibilities of diatom communities from the sites not affected with paddy drainages were concluded to be higher than that from the sites with inflow of drainages. Furthermore, bigger differences in susceptibilities were shown especially during the rice growing period.

付表

－ 備 考 －

定量下限値以下の数値についても掲載した。

定量下限値以下の数値は薄文字とした。

ピークが検出されなかった試料は－で示した。

分析を行っていない試料は網掛けで示した。

付表1：イマズスルフロン及びエスプロカルブの測定値

付表2：オキサジクロメホン及びカフェンストロールの測定値

付表3：シマジン及びジメタメトリンの測定値

付表4：シメトリン及びジメピペレートの測定値

付表5：ダイムロン及びチオベンカルブの測定値

付表6：ピラズスルフロンエチル及びピリブチカルブの測定値

付表7：ピリミノバックメチル及びブタクロールの測定値

付表8：プレチラクロール及びベンスルフロンメチルの測定値

付表9：ペントキサゾン及びメフェナセットの測定値

付表10：モリネート及びフェニトロチオンの測定値

付表11：フェノブカルブの測定値

付表1：イマズスルフロン及びエスプロカルブの測定値

除草剤名：イマズスルフロン

定量下限：0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 5	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 6	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 7	2001	-	-	-	-	0.19	0.10	0.16	0.60	0.29	0.22	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 10	2002	5/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	6/27	-	-	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-

除草剤名：エスプロカルブ

定量下限：0.06 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																			
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 5	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-	
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 6	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-	
	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 7	2001	-	-	-	-	-	0.033	0.44	0.20	0.12	0.084	0.042	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 10	2002	5/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-	
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	6/27	-	-	-	-	-	-	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-	

付表2：オキサジクロメホン及びカフェンストロールの測定値

除草剤名： オキサジクロメホン 定量下限： 0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																			
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 1	2001	測定なし																			
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21												
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8 0.0083	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20 0.0092	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18											
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27												
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8 0.053	5/14 0.0049	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20 0.0095	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 10	2002	5/22	測定なし																		
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21								
				0.010								0.040	0.028								

除草剤名： カフェンストロール 定量下限： 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																											
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
St. 1	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	0.064	0.074	0.86	0.10	0.21	0.090	0.24	0.086												
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19														
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	0.026	0.037	1.0	0.32	0.44	0.092	0.077	0.069	0.064	0.043	-	-	8/5	0.080
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	0.11	0.71	1.7	0.63	0.37	0.091	0.061	0.080	0.024	-	-	-	
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2															
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18																			
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27																				
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	0.21	0.79	1.3	0.60	0.24	0.15	0.074	0.082	-	-	-		
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2															
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19									
St. 10	2002	5/22	0.22																										
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	0.15	1.7	1.9	0.54	0.29	0.21	0.13	0.063	0.022	-	-	0.083	
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2															
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21																
				0.021	0.56	1.5	0.94	0.29	0.21	0.16	0.15	0.029	0.029																

付表3：シマジン及びジメタメトリンの測定値

除草剤名：シマジン 定量下限：0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																			
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 1	2001	測定なし																			
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21												
		-	0.010	0.014	0.016	-	-	0.020	0.039												
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		測定なし																			
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		測定なし																			
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		測定なし																			
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
		0.021	0.022	0.016	0.018	0.015	0.015	0.031	0.015	0.031	0.020	0.021	0.026	0.033							
St. 6	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18											
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27												
		0.042	0.025	0.016	0.016	0.010	0.024	0.014	0.015												
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
		0.042	0.048	0.032	0.030	0.012	0.0090	0.11	0.030	0.10	0.023	0.019	0.014	0.11							
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		測定なし																			
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		測定なし																			
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		測定なし																			
St. 10	2002	5/22																			
		測定なし																			
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		測定なし																			
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21								
		0.011	0.010	0.015	0.037	0.012	0.019	0.065	0.043	0.010	0.0054	0.018	0.0088								

除草剤名：ジメタメトリン 定量下限：0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																			
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
St. 1	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		測定なし																			
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21												
		測定なし																			
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		0.0033	0.0056	0.19	0.15	0.15	0.049	0.039	0.027	0.035	0.015	-	-	0.017							
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		0.0035	0.0048	0.11	0.15	0.17	0.026	0.026	0.033	0.035	0.016	-	0.019	-	0.017						
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		-	-	-	-	-	0.063	0.15	0.11	0.14	0.070	0.036	0.017	0.0090	0.0080	-	0.0031	-	-	-	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		0.0072	0.0089	0.063	0.16	0.17	0.16	0.082	0.032	0.049	0.035	0.028	0.028	0.024	0.021						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
		-	-	0.045	0.12	0.18	0.17	0.22	0.086	0.048	0.045	0.040	0.034	0.014							
St. 6	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18											
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27												
		0.0048	0.011	0.084	0.17	0.13	0.065	0.048	0.023												
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		-	-	-	-	-	0.0055	0.013	0.14	0.12	0.064	0.039	0.019	0.0066	0.0060	-	-	-	-	-	
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		-	0.013	0.11	0.18	0.18	0.12	0.079	0.10	0.056	0.039	0.032	-	0.024	0.019						
2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2								
		-	-	0.012	0.096	0.089	0.18	0.21	0.087	0.048	0.045	0.043	0.032	0.015							
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		-	-	-	-	-	-	0.0087	0.074	0.067	0.045	0.039	0.015	0.0040	0.0065	-	-	-	-	-	
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		-	-	-	-	-	-	-	-	0.046	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
St. 10	2002	5/22																			
		測定なし																			
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19						
		0.0031	0.0036	0.014	0.19	0.093	0.075	0.075	0.042	0.062	0.019	0.028	0.021	0.021	0.017						
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2							
		-	-	-	0.093	0.033	0.94	0.24	0.070	0.054	0.031	0.051	0.012	0.0049							
2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21									
		0.0041	0.0051	0.0095	0.39	0.37	0.52	0.12	0.072	0.091	0.11	0.13	0.037								

付表8：プレチラクロール及びベンスルフロンメチルの測定値

除草剤名：プレチラクロール

定量下限：0.04 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2002	0.28	0.14	0.69	0.86	0.63	0.045	0.054	-	0.058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 10	2002	5/22	0.045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-
	2004	0.11	0.30	0.16	2.6	2.2	3.4	0.63	0.28	0.44	0.28	0.088	0.021	-	-	-	-	-	-	-

除草剤名：ベンスルフロンメチル

定量下限：0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 10	2002	5/22	測定なし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-
	2004	-	1.9	0.84	0.62	1.5	1.2	0.39	0.30	0.32	0.32	0.21	0.12	-	-	-	-	-	-	-

付表9：ペントキサゾン及びメフェナセットの測定値

除草剤名：ペントキサゾン

定量下限：0.04 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	0.077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		0.021	0.050	0.083	0.047	0.10	0.059	0.046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		0.022	0.18	0.60	0.45	0.16	-	-	0.081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	0.072	0.14	0.087	0.068	0.048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	0.11	0.14	0.11	0.16	0.10	0.044	0.044	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	0.040	0.28	0.21	0.12	0.15	0.094	0.15	0.098	0.066	0.053	0.052	0.027	0.021	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0.048	0.36	0.29	0.17	0.089	0.063	0.063	0.056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	0.15	0.24	0.20	0.14	0.061	0.047	0.023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	0.081	0.077	0.045	0.069	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	0.11	0.12	0.18	0.14	0.11	0.11	0.056	0.052	0.096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 6	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	0.11	0.096	0.15	0.17	0.070	0.056	0.049	0.060	0.022	0.016	-	-	-	-	-	-
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	0.042	0.045	-	0.060	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 10	2002	5/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		0.018	0.59	1.4	0.45	0.21	0.098	0.094	0.098	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	0.45	1.5	0.51	0.44	0.89	0.22	0.31	0.10	0.099	0.12	0.015	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-
		0.024	0.58	0.58	0.67	0.27	0.25	0.20	0.11	0.11	0.10	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-

除草剤名：メフェナセット

定量下限：0.04 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	0.11	1.8	0.21	0.16	0.081	0.067	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	0.0079	1.2	0.34	0.74	0.068	0.076	0.064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	0.015	2.0	0.31	0.86	0.061	0.059	0.058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	0.064	1.7	2.5	1.6	1.3	0.68	0.23	0.13	0.11	0.079	0.061	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		0.044	0.14	2.2	3.7	2.3	1.9	0.58	0.14	0.17	0.11	-	-	-	0.089	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
	-	-	0.30	1.6	1.6	1.7	2.1	1.1	0.52	0.21	0.046	0.058	0.020	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	7/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	0.025	2.4	3.2	1.0	0.95	0.60	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 5	2005	4/18	5/1	5/9	5/17	5/24	6/2	6/15	6/27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0.021	0.081	0.83	2.4	2.0	0.69	0.24	0.063	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	0.061	0.12	0.27	3.0	1.3	0.67	0.38	0.15	0.12	0.095	0.057	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
	0.095	0.19	2.0	2.7	2.3	0.98	0.88	0.28	0.20	0.15	0.13	-	-	0.088	-	-	-	-	-	-
St. 6	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	1.6	1.5	2.3	2.3	1.2	0.47	0.26	0.041	0.029	0.017	-	-	-	-	-	-
St. 7	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	0.054	0.065	0.20	1.6	0.67	0.50	0.32	0.16	0.12	0.079	0.058	-	-	-	-
St. 8	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.38	0.19	0.088	0.11	0.10	0.066	-	-	-	-	-
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.084	0.088	0.087	0.081	0.064	-	-	-	-	-
St. 10	2002	5/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	-	5.4	3.5	1.8	0.31	0.12	0.10	0.084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	-	0.72	6.4	3.4	3.4	1.3	2.9	0.84	0.075	0.015	0.017	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	2.7	1.6	3.8	1.9	0.74	0.41	0.31	0.24	0.044	0.034	-	-	-	-	-	-	-

付表11：フェノブカルブの測定値

除草剤名：フェノブカルブ 定量下限：0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$

調査地点	調査年	採水日																		
		3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
St. 1	2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	2004	4/26	5/3	5/10	5/17	5/24	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	0.26	-	-
St. 4	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	0.012	0.023	0.018	0.021	0.077	0.068	-	-	-	-	-	-	0.043	-	-	-	-	-
St. 5	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	0.093	0.45	0.17	0.080	0.097	-	0.052	-	0.064	-	0.080	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	0.026	0.022	0.22	0.19	0.28	0.15	0.033	0.12	0.067	-	-	-	0.044	-	-	-	-	-
	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
St. 6	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	0.021	-	-	-	0.038	0.042	0.11	0.15	0.079	0.059	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 7	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		0.024	0.040	0.30	0.12	0.23	0.11	0.11	0.068	0.12	-	-	-	-	0.042	-	-	-	-	-
St. 8	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	0.12	0.12	0.15	0.42	0.11	0.11	0.20	0.048	0.052	0.0099	-	-	-	-	-	-
St. 9	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	0.026	-	-	-	-	-	0.10	0.10	0.10	0.053	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 10	2001	3/20	4/10	4/17	4/24	5/1	5/8	5/15	5/22	5/29	6/5	6/12	6/19	6/26	7/3	7/17	7/31	8/14	8/28	9/19
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2002	5/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2002	4/22	5/2	5/8	5/14	5/20	5/27	6/3	6/10	6/17	6/24	7/8	7/22	8/5	8/19	-	-	-	-	-
		-	-	0.019	0.31	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2003	4/28	5/2	5/7	5/13	5/14	5/20	5/21	5/28	6/4	6/11	6/18	6/25	7/2	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. a	2004	4/26	5/3	5/7	5/10	5/13	5/17	5/21	5/24	5/27	5/31	6/7	6/21	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	0.016	-	-	0.44	0.078	-	0.015	-	-	-	-	-	-	-