

農薬の水域生態リスク評価の最前線 ーシングルストレスからマルチストレスの世界へー

国立研究開発法人 農業環境技術研究所
有機化学物質研究領域 永井 孝志

1. はじめに

自然界はミクスチャーでありマルチストレスである。河川からは数十種の農薬が同時に検出されることは珍しくなく、水生生物はこれらの多数の農薬のミクスチャーによる複合曝露を受けている。また、水生生物は農薬以外にも、地形や気象、流水などの物理要因、農薬以外の化学物質や水質などの化学要因、他の生物との相互関係などの生物要因など、多種多様な要因による影響を日常的に受けているマルチストレス環境である。このような中で農薬の生態系保全に関する規制は、日本だけでなく諸外国においても、単独の農薬の影響のみを考慮し、農薬同士の複合影響や農薬以外の要因は考慮されないのが一般的である。

米国や欧州では農薬の健康影響に関する複合影響の検討は比較的進んでいる状況である¹⁾。米国の Food Quality Protection Act (食品品質保護法) では、同一の作用機作を有する農薬の累積リスク評価 (Cumulative Risk Assessment の訳) が要求され、5 つの農薬グループ (有機リン系、トリアジン系、酸アミド系、カーバメート系、ピレスロイド系) のそれぞれについての累積リスク評価が 2001 年から 2011 年にかけて実施された。一方欧州では、2009 年の欧州理事会決定により、将来のリスク評価において化学物質の複合影響の考慮が必要とされることになった。これを受けて欧州委員会では、複合影響評価に関する現状や課題の解析を行っている。また、European Food Safety Authority では、農薬の残留基準の設定に複合影響を考慮するための手法論の検討が続いている²⁾。

日本においても化学物質の複合影響を考慮した規制制度がすでにある。ダイオキシン類の評価においては、毒性等量 (Toxicity Equivalency Quantity, TEQ) に基づき、耐容一日摂取量を設定して基準値等が定められている。TEQ は、それぞれ毒性の異なる異性体の毒性を、毒性等価係数に基づいて 2,3,7,8-TCDD の量に換算して合計したものである。また、水道水の水質目標管理項目において、総農薬としての目標値が定められている。これは、120 種の農薬 (平成 27 年 4 月の時点) について、それぞれの検出値を目標値で割ったものの総和が 1 を超えないこととして設定されている。

化学物質の生態影響においては、米国等での全排水毒性 (WET) 手法の活用が主なものである。これは、様々な化学物質の混合物である排水そのものを使ったバイオアッセイ (WET 試験) に基づいて排水管理を行うものである。他にも複合影響に関する研究例は沢山あるが、主に二種類の化学物質の混合曝露下において、相乗効果や拮抗効果が見られるかどうかを調べた研究が多い。そこから先にある、リスク評価や管理に複合影響をどのように実装するか、ということろまでは議論があまり進んでいない。本稿では、まずは農薬同士の複合影響の評価手法の紹介を行い、さらにマルチストレス環境にある野外生物群集における農薬の影響評価手法について紹介する。

2. 化学物質の複合影響の評価方法の基本

2. 1. 複合影響予測モデル

複合影響を予測するモデルとして主なものに Concentration Addition モデル (CA モデル) と、Independent Action モデル (IA モデル) がある³⁾。CA モデルは毒性で重み付けした濃度をそれぞれ加算していく方法であり、ダイオキシン類の TEQ や水道水の総農薬方式を計算する方法と同様の概念である。このモデルは作用機作が同様の物質間で用いられる。IA モデルは、毒性の発現が完全に独立に起こるとする仮定の下で、確率を乗算していく方法であり、作用機作が異なる物質間で用いられる。両者ともに、それぞれの物質の濃度反応関係から累積影響率を計算することが可能である (図 1 上段)。

CA モデルと IA モデルの計算方法を解説する。CA モデルでは毒性で重み付けした濃度 (Toxic Unit, TU) の計算が核となる：

$$TU = \text{濃度}/\text{毒性}(\text{EC50})$$

例えば、農薬 A と農薬 B が混合している場合は：

$$TU_{\text{mixture}} = TU_A + TU_B = [\text{農薬 A}]/\text{EC50}_A + [\text{農薬 B}]/\text{EC50}_B$$

となり、ロジスティック式による濃度反応関係を仮定する場合は：

$$\text{影響率}_{\text{mixture}} = \frac{1}{1 + TU_{\text{mixture}}^{fb}}$$

と計算される。ここで f_b 値は、農薬 A と農薬 B のそれぞれ個別の濃度反応関係式から得られる傾きの平均値である。CA モデルでは本来、濃度反応関係の傾きが等しいということが前提となっている。しかしながら、実際には傾きが若干異なるため、平均値をとって調整する。傾きが大きく異なる場合には作用機作が異なることが示唆されるため、CA モデルではなく IA モデルの適用が望ましいとされる。

IA モデルでは、影響は完全に独立に起こると仮定して確率をかけ算する (相乗効果とは異なる)。農薬 A と農薬 B の複合影響は、まずそれぞれ独立に濃度反応関係から影響率の計算を行い、最後に以下の式で計算する：

$$\text{影響率}_{\text{mixture}} = 1 - [(1 - \text{影響率}) = 1 - [1 - \text{影響率 A}] \times [1 - \text{影響率 B}]$$

これらのモデルについては、これまでに多くの実験的な検証が行われている。例えば、緑藻を用いた生長阻害試験において、18 種類のトリアジン系除草剤 (作用機作は光合成の光化学系 II 阻害) を阻害率 1% の各濃度で混合した結果、47% の増殖阻害率が得られた。そして、CA モデルによる予測では 43.7%、IA モデルによる予測では 16.6% と、CA モデルによる予測と一致していた⁴⁾。同様に、16 種類の作用機作の異なる薬剤を阻害率 1% の各濃度で混合した結果、18% の阻害率が得られた。そして、CA モデルによる予測では 75.0%、IA モデルによる予測では 14.9% と、IA モデルによる予測と一致していた⁵⁾。他にも多数の複合毒性試験をレビューした研究が報告されている⁶⁾。

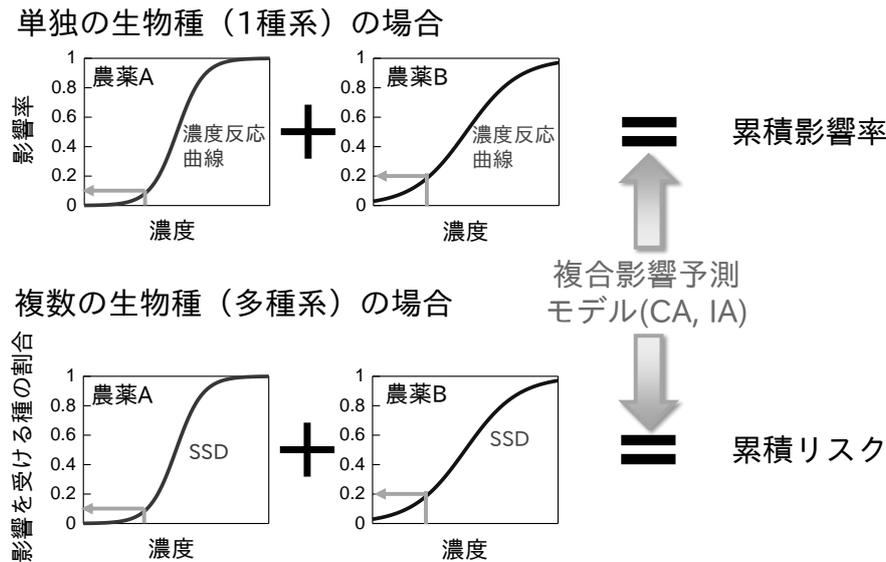


図 1. 複合影響評価の概念

2. 2. 複合影響モデルの多種系への応用

上記の CA, IA モデルの説明は単独種を用いた毒性試験の予測手法である。しかしながら、生態リスク評価は単独種への毒性をベースに行うものではなく、あくまで生物群集をターゲットとするものである。そこで便利な概念が種の感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）である⁷⁾。経験則により、多数の生物種の感受性は対数正規分布に適合することが知られており、図2のように累積確率分布で表現できる。つまり、ある程度の数（例えば OECD のガイダンスでは5種以上）の毒性データが揃っていれば環境中濃度と影響を受ける種の割合の関係を推定して表現できることになる。これが種の感受性分布の基本的な考え方である。すなわち、種レベルの影響から生物群集レベルの影響を予測（外挿）するモデルと捉えることもできる。SSD 法は生態系への影響を濃度との関数として表すことができるので、定量的なリスク評価方法として活用できる。農薬の濃度がわかると影響を受ける種の割合が計算でき、この指標は生物多様性（種の多様性）にどれだけ影響があるか、という定量的な「生物多様性影響度指標」として位置づけることができる。日本で使用される様々な水稲用除草剤や箱育苗施用殺虫剤についても、SSD を用いて評価したリスクの比較を行った事例がある^{8),9)}。

CA, IA の複合影響モデルは、SSD にも同様に適用することができる。それぞれの物質の SSD を濃度反応関係曲線と見なし、CA モデルや IA モデルを適用することで、複数物質によって影響を受ける種の割合（multi substance potentially affected fraction, msPAF）を計算することができる（図1下段）。これを複数物質による累積リスクとみなす。これまでに、オランダの農業用水路で261農薬の累積リスクを評価し、水路の生物調査のデータと比較した研究例が報告されている¹⁰⁾。この結果では、msPAF が10%以上の地点で生物の種組成が変化した。ただし、msPAF の直接的な検証データは得られていないため、今後の重要な課題となる。

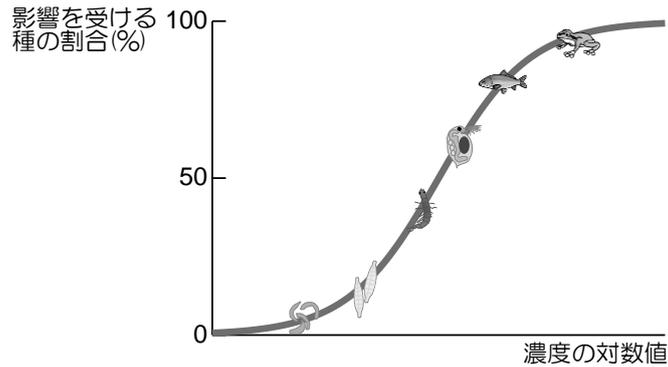


図 2. 種の感受性分布の概念図。6 生物種の毒性値のバラツキを対数正規分布（図中の曲線）に適合させている。

多種類の農薬が混合している系で、同じ作用機作同士のものとは異なる作用機作のものが混在している場合には、CA-IA 混合モデルを用いる。図 3 は 6 つの農薬の混合下を想定し、農薬 a, b, c が作用機作 1、農薬 d, e が作用機作 2、農薬 f が作用機作 3 の場合の累積リスクの計算の概念図である。まず、作用機作 1 の農薬 a, b, c の累積リスク (PAF_{MoA1}) を、それぞれの SSD から CA モデルで計算する。次に、作用機作 2 の農薬 d, e の PAF_{MoA2} を、それぞれの SSD から CA モデルで計算する。最後に、 PAF_{MoA1} 、 PAF_{MoA2} と農薬 f の単独の影響率 PAF_{MoA3} から、IA モデルによって msPAF を計算する。このように、混合物質数がいくつであっても同様の方法で計算することが可能である。

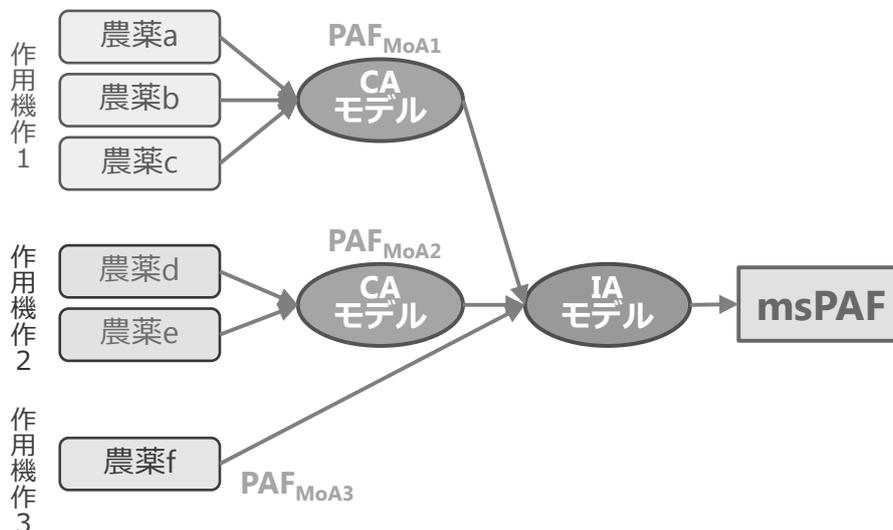


図 3. CA-IA 混合モデルによる累積リスクの計算

ところで複合影響といえは、加算的以上の影響をもたらす相乗効果、もしくは互いに毒性を打ち消し合って加算的以下の影響になってしまう拮抗効果が想定される。CA モデルや IA モデルは、基本的にそのような相互作用を想定していない。この想定の下での複合影響の予測は妥当なのだろうか。当然、実際の化学物質の複合影響では相乗や拮抗効果が起こりうるが、ここではファンネル仮説という考え方を紹介する。ファンネル仮説とは、Warne and Hawker¹¹⁾によって提唱された

複合影響に関する概念である（図 4）。混合の物質数が少ない場合、加算的モデルによる予測からの解離が大きい（相乗もしくは拮抗）ケースが多数出てくる（図 4 の左側）が、混合物質数が増えるにつれて、個々の組み合わせでは相乗や拮抗効果が起こるが、その組み合わせが多いためそれらが互いに相殺されて、見かけ上加算的に近づいていく（図 4 右側）。この図 4 のグラフが漏斗状に見えるためファンネル仮説と名付けられた。

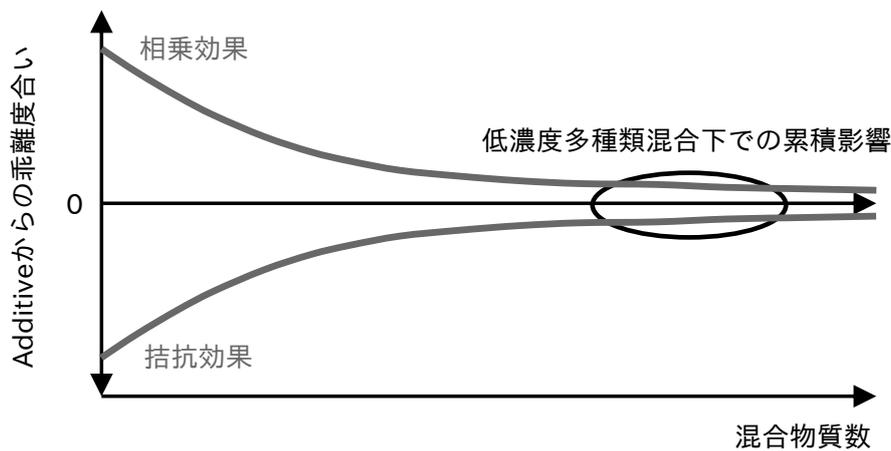


図 4. ファンネル仮説の概念図

毒性学的に興味を持たれるのは、高濃度 2 種類の混合系で相乗あるいは拮抗効果を見だし、そのメカニズムを探る研究である。しかしながら生態リスク評価で重要となるのは、むしろ実際の野外環境で見られる低濃度多種類混合下での累積影響である。このような場合、相乗や拮抗効果を重要視するよりも、全てファンネル仮説の下で加算的に計算できる方が効率的かつ実用的である。しかしながら、SSD を用いた多種系においては、実験的にファンネル仮説を検証した研究例は現時点では報告されていない。この検証のための研究が今後必要となってくる。

3. 農業環境技術研究所における農薬累積リスク評価の研究

3. 1. SSD-複合影響モデルの検証実験

ファンネル仮説の想定の下、SSD に複合影響モデル（CA と IA）が適用可能かどうかの実験的検証を行った。農業環境技術研究所で公開している「河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル¹²⁾」に従い、5 種類の付着藻類 (*Pseudanabaena galeata* N512 株; *Desmodesmus subspicatus* N797 株; *Achnanthydium minutissimum* N71 株; *Nitzschia palea* N487 株; *Navicula pelliculosa* U673 株) を用いて、各種農薬を 5 種類組み合わせた複合毒性試験を行った。5 種類の除草剤の組み合わせとして、作用機作が同じ除草剤同士の混合と作用機作が異なる除草剤同士の混合の 2 通り作った：複合 1（作用機作が同じ）プレチラクロール、ブタクロール、メフェナセット、カフェンストロール、フェントラザミド；複合 2（作用機作が異なる）プレチラクロール、ベンスルフロンメチル、シメトリン、エスプロカルブ、ピラクロニル。そして、それぞれの除草剤の毒性試験から解析した

SSD の 5, 10, 20 パーセントイルの濃度（それぞれ HC5, HC10, HC20 と表記）で混合した。このときのコントロール区の増殖速度を 1 とした場合のそれぞれの藻類の比増殖速度を図 5 に示す。

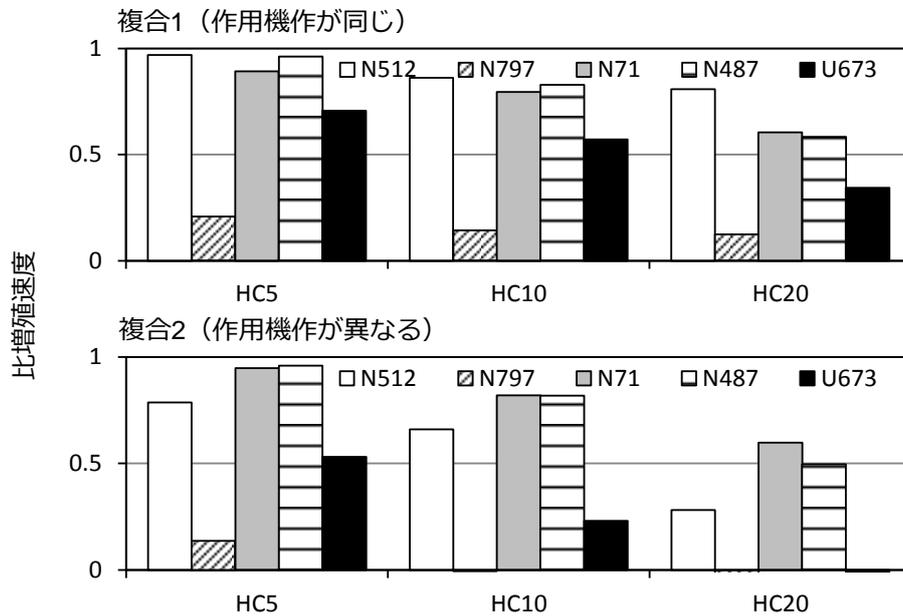


図 5. 複合毒性試験における各種の比増殖速度

比増殖速度が 0.5 以下になった場合にその種は影響を受けたとみなし、5 種で試験をしたうち 1 種が影響を受けるたびに影響を受ける種の割合 (msPAF) が 20% ずつ上昇するとして、影響を受ける種の割合は図 6 のように計算された。また、CA モデルと IA モデルを用いた複合影響の予測結果も重ねて図 6 に示す。作用機作が同じ複合 1 の場合には、CA モデルの方が IA モデルよりも予測精度が良好であった。一方、作用機作が異なる複合 2 の場合には、IA モデルの方が CA モデルよりも予測精度が良好であった。つまり、SSD を用いた複数の農薬による影響を受ける種の割合 (msPAF) の計算においても、CA と IA モデルが適用可能であることを示すことができた。これは、図 3 に示した累積リスクとしての msPAF の計算の妥当性を示すものである。

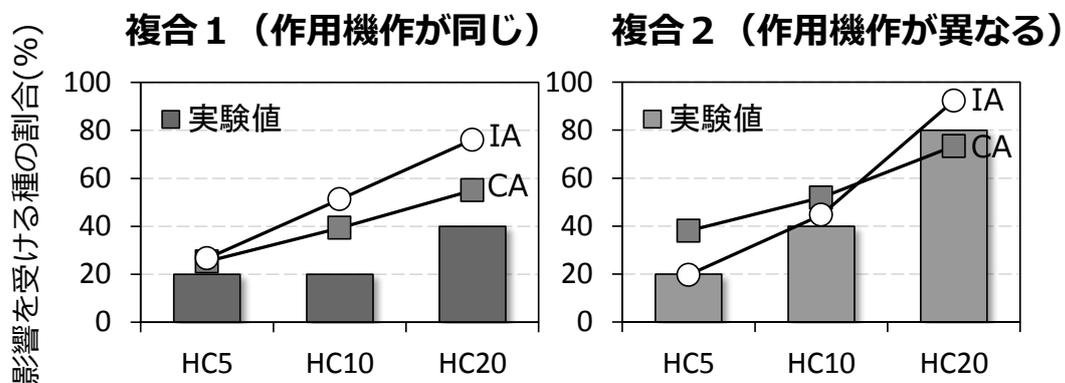


図 6. 複合毒性試験結果とモデル予測の比較

3. 2. 防除体系毎の生態リスク比較

SSD と複合影響モデルの統合により、複数の農薬使用からなる防除体系毎の定量的なリスクの比較が可能となる。これにより、「農薬の使用量を減らす」、「より低毒性の農薬に切り替える」、「農薬の流出防止対策をとる」などの管理対策を行った場合のリスク低減効果を事前に定量的に評価して、効率的な管理対策を選択できるようになる。例えば現在の環境保全型農業においては、農薬使用量（農薬成分使用回数）の低減が優先的に行われているが、使用する農薬の種類毎にそれぞれリスクの大きさは異なり、また同じ農薬であっても使用方法や流出防止対策などによりリスクは変化する。よって、農薬の使用回数を減らす努力がそのままリスクの低減に貢献するとは限らない。「減らすべきは農薬ではなく農薬使用に伴うリスクである」という原則に立ち、農薬を削減する前後のリスクの大きさを定量的に比較することでリスクの低減効果が明確になり、環境保全効果をよりアピールしやすくなる。また、やみくもに農薬を減らして生産効率を下げよりも、低リスクの農薬に切り替えて流出防止対策を徹底することでリスクを下げることで、農業生産の安定化と環境保全対策とが両立する方向を探ることができる。

各防除体系で使用する農薬の SSD と濃度予測から、CA-IA 混合モデルにて累積リスクを計算することにより、防除体系毎のリスクの大きさを定量的に比較した事例を紹介する。フィールドは茨城県南部の桜川の支流である逆川流域とし、典型的な慣行（成分数として 14 回使用）および特別栽培（同 6 回使用）の各シナリオ下での農薬使用に伴う生態リスクを評価した。慣行栽培での累積リスク (msPAF) は 6.2%であったのに対し、農薬成分数を半分以下に低減した特別栽培では、リスクは 4.2%まで減少した。一方、慣行栽培において、水管理の徹底（農薬流出防止対策(1)）することによるリスクは 5.2%に減少し、さらに、畦塗りの徹底（農薬流出防止対策(2)）により、河川への農薬流出量が大幅に減少するため、特別栽培と同程度の 3.5%までリスクを低減できることが示された（図 7）。以上のように、農業現場での様々な農薬使用に伴うリスクを定量的に評価することが可能となり、農薬の節減や農薬流出防止対策の導入によるリスク低減効果を相互に比較することで、地域性を考慮した適切な農薬使用方法の提示が可能となった。

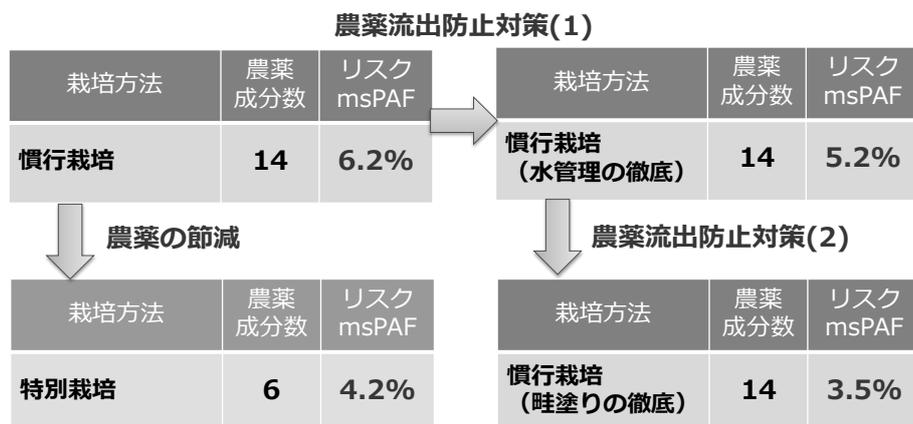


図 7. 農薬使用に伴う生態リスク評価結果（慣行および特別栽培との比較）

4. 野外生物調査から影響を評価する

これまで上記で述べてきたことは、実験室内での毒性試験をベースとした知見であり、農薬というシングルストレスによる複合影響を見てきたものであった。また、累積リスク（msPAF）の生態学的な意味付けについては現時点では不明確である。すなわち、例えば 10%の種に影響が出た場合に生態系はどうなるのか？といった問いには現時点では明確な答えを出すことはできない。ところが実際に我々が知りたいのは、実験室内での生物への影響ではなく野外の生物群集に対する影響である。ただし、実際の野外生物群集は様々な要因によって影響を受けるマルチストレスの世界であり、農薬の影響はその中のわずかな部分でしかない。また、対照区の設定が難しいこともあり、野外生物調査から農薬の影響を調べるのは非常に困難であるとされてきた。しかしながら近年では、この困難を乗り越えるための研究が進んできているので、その手法について紹介する。

通常の野外生物調査では、多数の種の個体数のデータが得られるため、これを単純化するために生物群集 index を用いることが一般的である。例えば、トータル種数や、Shannon の多様度指数、底生生物であれば EPT 値（トビケラ、カゲロウ、カワゲラ種数）や ASPT 値（日本版平均スコア法）、付着藻類であれば DAIPo（diatom assemblage index to organic pollution）などがある。これらの値と、その地点での農薬濃度から計算された msPAF の相関を取ろうと考えても、図 8 左のように、バラバラなプロットからほとんど相関なしという結果が得られてしまう。これは、農薬以外の影響が大きいため、農薬の影響との相関が隠れて見えなくなるからである。そこで、相互関係を調べるため、平均値からのずれを最小化する通常の回帰分析ではなく、95 パーセンタイル点を用いた分位点回帰が有効である。農薬の影響の程度がどの程度かにかかわらず、農薬の影響がもし存在するならば、生物指標値の上限は制限を受けるはずである。ただし、上限値は統計的に脆弱な値であるため、代わりにより頑健な 95 パーセンタイル点を用いて回帰を行うことが望ましい。この分位点回帰を用いると、その上限値付近が農薬の影響によってどのように変化するかを捉えることができる。図 8 右のプロットは左の図と全く同じであるが、通常の回帰では見つかからない上限値の変化が発見できる。この回帰線よりも下に位置するプロットは農薬以外の影響を受けて生物群集 index が下がっていると解釈できる。また、この結果を用いると、切片の値がその「場」における生物指標の最大値を示すことになる。

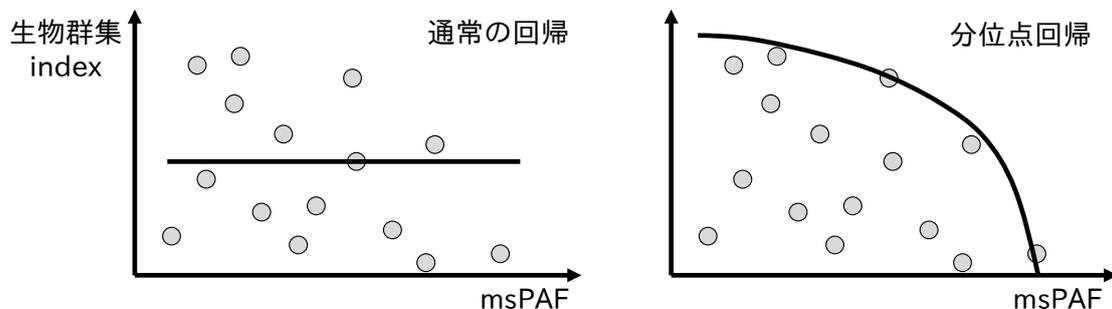


図 8. 野外生物調査データの解析のイメージ図

例えば Iwasaki and Ormerod¹³⁾は、英国、米国、日本の金属汚染河川における約 400 地点の野外底生動物の調査データから、上記の手法を用いて銅、亜鉛、カドミウム、マンガンがそれぞれ EPT 値に有意な影響を与えない濃度を推定した。これらの濃度は、室内毒性試験から計算された予測無影響濃度とほぼ同様な値を示したことが報告されている。

さらに近年、新しい生物群集 index として、SPEAR (SPEcies At Risk) という河川底生生物指標が開発された¹⁴⁾。SPEAR の WEB サイト (<http://www.systemecology.eu/SPEAR/index.php>) においても紹介されているが、近年注目を集めている Trait based ecological risk assessment の一つと考えられる。これは、農薬の影響を統計的に増幅させることで、野外生物調査においても鋭敏に農薬の影響を検出できるように工夫されたものである。SPEAR の解析においては、河川底生生物を(1)農薬への感受性、(2)生活史形質 (trait) の 2 つの観点から、農薬によるリスクを受けやすい種 (SPEAR) と受けにくい種 (notSPEAR) に分けるのが核となっている。さらに、生活史形質は個体群の回復性のポテンシャルの観点から(1)世代時間、(2)コロニーの移動性、(3)農薬の使用時期に水中にいるかどうか、が考慮される。そして、河川生物のモニタリング調査から、全体の個体数に対して、SPEAR の個体数の割合を「%SPEAR_{pesticide}」という指標で表現する。この指標が低いほど農薬の影響を受けている地点と見なすことができる。実際に、河川水中の農薬濃度をミジンコの毒性 (EC50) で割った係数 Toxic Unit (TU) と %SPEAR は良い相関が得られることが知られており、いくつかのケーススタディーでその妥当性が確認されている。msPAF によって計算された生態リスクの大きさと、このような現場環境での影響指標とがどのような関係になるかなどが、今後の重要な課題となると考えられる。

例えば SPEAR を開発したドイツの Liess らのグループは、野外生物調査の結果を用いて msPAF と SPEAR の関係を調べた結果を報告している¹⁵⁾。この論文によれば msPAF が 5% 以下の場合でも、SPEAR の減少が見られるとのことである。また、農業環境技術研究所でもこれに類似する研究を開始したところである。

5. 今後の展望

これまで農業環境技術研究所では、全国の河川における農薬生態リスクを俯瞰するリスクマップの作成等を行ってきた。これは、全国の流量観測地点 350 地点における河川水中農薬濃度をモデルによって予測し、それと SSD を組み合わせて影響を受ける種の割合の全国分布を解析するものである。これまでに約 70 種の農薬について解析し、この結果を簡便に可視化できるツールも開発中である。今までは、個別の農薬毎のリスクを解析してきたが、今後はこれらの複合影響を考慮した累積リスクとしての全国分布を解析するなどの研究が課題となってくるだろう。さらに、その累積リスクの妥当性の検証のため、野外生物調査を行って比較を行っていくことも重要な課題である。このように、単独の農薬の影響→複数の農薬による複合影響→農薬以外の影響も考慮、という順番で、シングルストレスからマルチストレスの世界へと研究を進化させていく必要があるだろう。

謝 辞

本稿で紹介した農業環境技術研究所における研究は、環境研究総合推進費 5C-1102 「適切なリスク管理対策の選択を可能にする農薬の定量的リスク評価法の開発」の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) 一般社団法人化学物質評価研究機構 (2013) 平成 24 年度化学物質複合影響評価手法検討調査業務報告書.
- 2) EFSA (2008) Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. *The EFSA Journal* 704, 1–84.
- 3) de Zwart, Posthuma L (2005) Complex mixture toxicity for single species and multiple species: proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2665–2676.
- 4) Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Bödeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2001) Predicting the joint algal toxicity of multicomponent s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56, 13–32.
- 5) Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Bödeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63, 43–63.
- 6) Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management* 3, 364–372
- 7) Posthuma L, Suter GW, Traas TP (2002) Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology (Environmental and Ecological Risk Assessment), Lewis Publishers, CRC Press.
- 8) Nagai T, Yokoyama A (2012) Comparison of ecological risks of insecticides for nursery-box application using species sensitivity distribution. *Journal of Pesticide Science*, 37, 233–239.
- 9) 永井孝志、稲生圭哉、横山淳史、岩船敬、堀尾剛 (2011) 11 種の水稻用除草剤の確率論的生態リスク評価. *日本リスク研究学会誌*, 20, 279–291.
- 10) de Zwart (2005) Ecological Effects of Pesticide Use in The Netherlands: Modeled and Observed Effects in the Field Ditch. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 1, 123–134.
- 11) Warne MSJ, Hawker DW (1995) The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 23–28.
- 12) 農業環境技術研究所 (2014) 河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル.
- 13) Iwasaki Y, Ormerod SJ (2012) Estimating safe concentrations of trace metals from inter-continental field data on river macroinvertebrates. *Environmental Pollution* 166, 182–186.
- 14) Liess M, von der Ohe PC (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 954–965.
- 15) Smetanová S, Bláha L, Liess M, Schäfer RB, Beketov MA (2014) Do predictions from species sensitivity distributions match with field data? *Environmental Pollution* 189, 126–133