農薬の陸圏生態系における影響評価について

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
内　海　　　透*
宮　本　　　貢
片　木　敏　行

Ecotoxicological Risk Assessment of Pesticides in Terrestrial Ecosystems

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Environmental Health Science Laboratory
Toru Utsumi
Mitsugu Miyamoto
Toshiyuki Katagi

Ecotoxicological risk assessment of pesticides in terrestrial ecosystems in particular has become one of the most important areas in scientific pesticide evaluation for consideration of biodiversity preservation. In order to develop safer pesticides, Sumitomo Chemical Co., Ltd. has been evaluating our pesticides by utilizing scientific knowledge and state-of-the-art techniques in accordance with the latest regulatory criteria for the ecological risk assessment in complicated terrestrial ecosystems. In this article, outlines of the terrestrial ecological risk assessment procedures in the EU, USA and Japan are comparatively summarized and some examples of higher-tier ecotoxicological studies undertaken to demonstrate that our pesticides are benign to the terrestrial environment are introduced along with the recent progress in our research.

はじめに

世界的な環境保全意識の高まりと共に、化学物質の自然環境に与える影響の評価は益々重要となってきており、特に害虫、雑草、並びに病原菌から作物を保護する為に自然環境に意図的に放出される農薬では、欧米を中心に世界各国で陸水両域における環境影響評価が必須の登録要件となっている[1),2)]。中でも生態影響評価は、事前評価によって生態系への化学物質の影響の有無を把握し、生態系保全の為の適切な諸施策を講じる事を目的としており、生態系を構成する「環境生物」への的確な影響評価が最重要課題である。

農薬の生態影響評価は、散布区域や散布後の移行から、大別して水域と陸域生態系の各々について行われている。水域生態系は、藻類などの生産者から甲殻類や魚類といった多段階の消費者に至る一連の階層構造が比較的考えやすい事に加えて、これら水産動植物を食料としている事から、陸域よりも優先して影響評価手法が世界的に議論されてきた。

一方、陸域生態系は、水域生態系と同様にヒトを含む全ての生物種が生存する場（恵み）である事から、農薬の陸域生態系に対する影響評価も安全性評価における最重要課題の一つと言える。ただ、大気、土壌および水系の各環境媒体が互い複雑に交錯する中、多種多様な生物種間で捕食、被食、競合、寄生などといった相互関係が保たれている陸域生態系に対する影響評価は、水域生態系での評価に比べて非常に高度かつ複雑なものとなってくる。加えて、養蜂に代表されるように、人間の日常生活や農業・産業活動といった人為的な関わりによる特有の構造と機能を持つ多様な生態系も混在する事が更に複雑さを来たす要因となっている。また、その生態系が不明な生物種も少なくなく、陸域生物に対する毒性学的知見が少ない事なども相俟って陸域生態影響評価を一層難しいものとしている。

当社は、生物多様性の保全に基づき、より安全で安心して使用できる農薬の開発の為に、この複雑かつ難解な陸域生態系に対する影響評価を、世界各国の最新規制動向を踏まえつつ、常に最先端の評価手法を駆使して行う事で、その安全性を確認している。本稿では、欧米および日本における陸域生態影響に関する影響評価について概説した上で、より精緻な評価を目的として設計された特徴ある高次評価系を駆使して当社農薬の環境生物に対する安全性を示す事ができた最近の具体例と、今後の新たな取り組みの一端について紹介する。

＊ 現職：国際アグロ事業部

陸域生態影響評価

1. 陸域生態影響評価の考え方

生態影響評価の対象である生態系、すなわち「自然環境」と「環境生物」の多様性と特徴について概説した上で、基本的な陸域影響評価手法について簡単に紹介する。

(1) 自然環境と環境生物

生物多様性条約[3]によると、生態系とは、「植物、動物および微生物の群集とこれらを取り巻く非生物的な環境とが相互に作用して一つの機能的な単位を成す動的な複合体をいう」とある。陸域生態系の場合、その生物部分は生態系の中で果たしている機能によって種々区分され、一般に緑色植物からなる生産者、従属栄養生物の消費者および両者の排泄や遺体を餌とし無機化する分解者（微生物など）の三つに分けられる。消費者を一次消費者（草食動物）、二次消費者（肉食動物）、三次さらに四次消費者などと食物連鎖（food chain）の順序に応じて分ける事もある。ただ、生産者から高次消費者に至る一連の生態系の階層構造と食物連鎖の相互関係が考えやすい水域生態系とは異なり、陸域生態系では様々な移動能を有する生物が多様な食性を有し、また、環境条件によって食性を変化させるものなども存在する為に、食物連鎖構造は単純ではなく、入り組んだ食物網（food web）を形成している[4]。

一方、地球上には現在、知られているだけで約175万種、未知のものを含めると3000万種とも言われる生物が生息し[5]、そのうち陸生種の総種数は約1000万種との推定がある[6]。既知の脊椎動物でも例えば哺乳類4500種、鳥類8650種、爬虫類5000種、両生類2000種が知られているが[7]、生活環や生活様式、行動パターン、餌の種類やその摂取比率、繁殖戦略等々の生態が不明な生物種も少なくない。

(2) 基本的な陸域生態影響評価手法

欧米および日本での評価対象と要求評価試験項目[8–13]の一覧を**Table 1**に示す。生息種や農業形態、

Table 1 Data requirements in pesticide registration for representative outdoor use patterns in EU, US and Japan

Taxonomic groups			Required data	EU	US	JP
Vertebrates	Birds	Tier-1	Acute: Acute oral study	R	R	R
			Short term: 5-day dietary study	CR	R	CR
			Long term: Reproduction study	CR	R	NR
		Higher tier	Avoidance/Palatability test for bait, granules and treated seeds	CR	NR	NR
			Pen/Cage test	CR	NR	NR
			Wild birds: Field test	CR	CR	NR
	Mammals	Tier-1	Acute: Acute oral study	R	R	NR
			Long term: Reproduction study (or Teratology study)	R	R	NR
		Higher tier	Wild mammals: Acute study	NR	CR	NR
			Pen/Cage test	CR	NR	NR
			Wild mammals: Field test	CR	CR	NR
Invertebrates	Bees	Tier-1	Acute oral study	R	NR	R*
			Acute contact study	R	R	
			Bee brood feeding study	CR	NR	NR
		Higher tier	Residue test	CR	CR	NR
			Cage/Tunnel test	CR	NR	NR
			Field test	CR	CR	CR
	Other arthropods	Tier-1	Standard laboratory study	R	NR	R
		Higher tier	Extended laboratory/Aged residue test	CR	NR	NR
			Field test	CR	NR	CR
	Silkworm	Tier-1	Acute: Acute oral study	NR	NR	R
		Higher tier	Residue test	NR	NR	CR
Soil organisms	Earthworms	Tier-1	Acute: Acute study	R	NR	NR
			Chronic: Reproduction study	CR	NR	NR
		Higher tier	Field test	CR	NR	NR
	Soil non-target micro-organisms	Tier-1	Soil nitrification and carbon mineralisation study	R	NR	NR
		Higher tier	Field test	CR	NR	NR
	Other soil non-target macro-organisms	Tier-1	Collembola/Gamasid mite: Reproduction study	CR	NR	NR
		Higher tier	Litter bag test	CR	NR	NR
Plants	Non-target plants	Tier-1	Screening data such as phyto-toxicity, Seedling emergence/Vegetative vigor study	R	R	NR
		Higher tier	Field test	CR	CR	NR

R: Required, CR: Conditionally Required, NR: Not Required
*: either of the acute oral or acute contact studies

気候風土、人間社会の文化・思想・価値観・産業などの違いを反映し、様々な違いはあるものの、陸域生態系の基盤である植物、植物を支える土壌の機能と栄養循環を保つ土壌生物、餌生物・受粉媒介生物・天敵・農業資材などとしての役割を担う無脊椎動物、脊椎動物のうち系統分類上最上位に位置づく鳥類や哺乳類など、広範囲の生物分類群が対象である。

一方、複雑で難解な陸域生態系に対する農薬の影響評価を早くから導入している欧米の評価手法の基本的な考え方は共通しており、一部ハザードベースの評価も存在するものの、基本的には各対象生物における毒性と推算される曝露濃度を比較・評価するリスクベースの手法である。

リスクベースの評価は、一般的に**Fig. 1**に示したように多段階的に毒性および曝露の両面をより自然環境に近い方向に精緻化する、いわゆるTier方式により進められる。初期の低次評価（Lower tier）では、例えば経済協力開発機構OECD（Organization for Economic Co-operation and Development）や米国環境保護局EPA（Environmental Protection Agency）で定められた標準化試験法により実験室で得られる毒性値と、農薬が最も多量に想定区域に移行すると想定した最悪条件下での環境中予想濃度や曝露予想濃度との比（毒性値/環境中予想濃度または曝露予想濃度）を求め、各規制当局が定めた保守的な許容基準と比較して評価を行う。この手法で充分な安全性が示されない場合は、より現実に近い高次（Higher tier）の影響評価を実施する事となる。

高次影響評価では、通常、低次評価で採用した最悪条件下での曝露評価の見直しの観点から、農薬の分配・分解を含む各種の指標を活用した環境中予想濃度の精緻化が行われる。また、対象となる生物種の生息・食性・繁殖の各行動パターンあるいは実場面条件下での農薬の餌中濃度などの情報を活用した曝露予想濃度の精緻化を影響評価に組み入れる手法もある。一方、低次評価に用いられる標準化された実験条件下でのラボ試験の毒性指標を見直す観点から、より実環境に近い試験条件下での高次試験を通して毒性値を取得し安全性を評価する手法など様々な取り組みが行われている。これら高次評価の試験設計に画一的なものはなく、評価対象種、生態影響における懸念点や度合いを考慮した特殊なものとなってくる。

2. 各地域（EU、米国、日本）の陸域生態影響評価

農薬登録における生態影響評価には、各地域、生物群ごとの特殊性が認められる。以下に欧米および日本における現在の陸域生態影響評価法を紹介する。

(1) EU

EUは、陸域生態評価手法の体系整備が最も進められている地域の一つと言える。**Fig. 2**にEUの農薬登録大綱の基盤となっている陸域生態評価の概念図[14]を示す。環境媒体（compartments）と環境生物（ecological receptors）との相互関係、および農薬の環境中移動を考慮した概念であり、食物連鎖も加味している。

EUに於いて要求される評価試験項目および評価に用いられる各指標[8)–10)]を**Table 2**に示す。次に、各指標を用いた各生物群での評価法を順次概説する。尚、EUに於いては土壌生物をはじめとする農地内に生息する

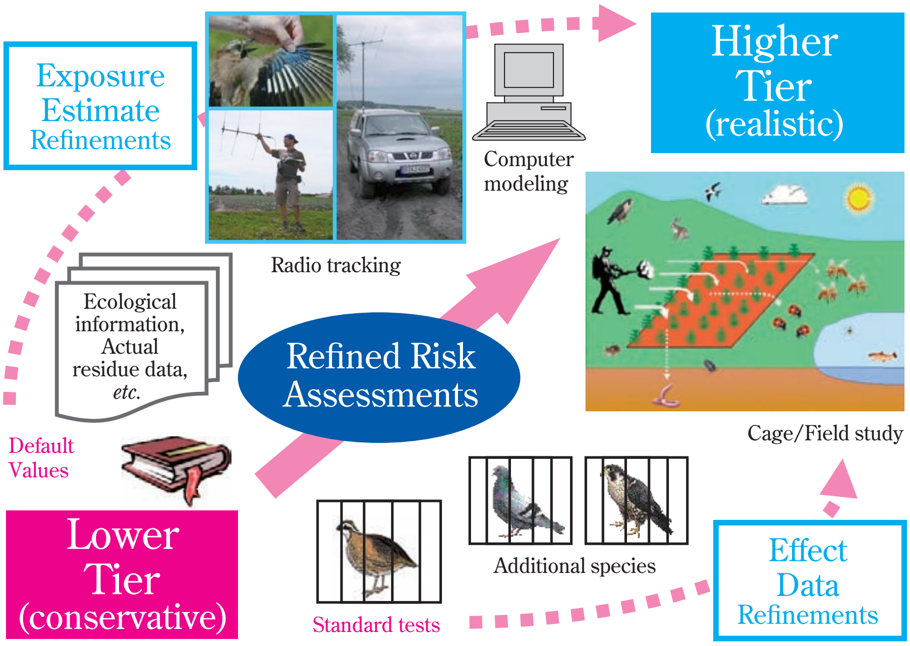
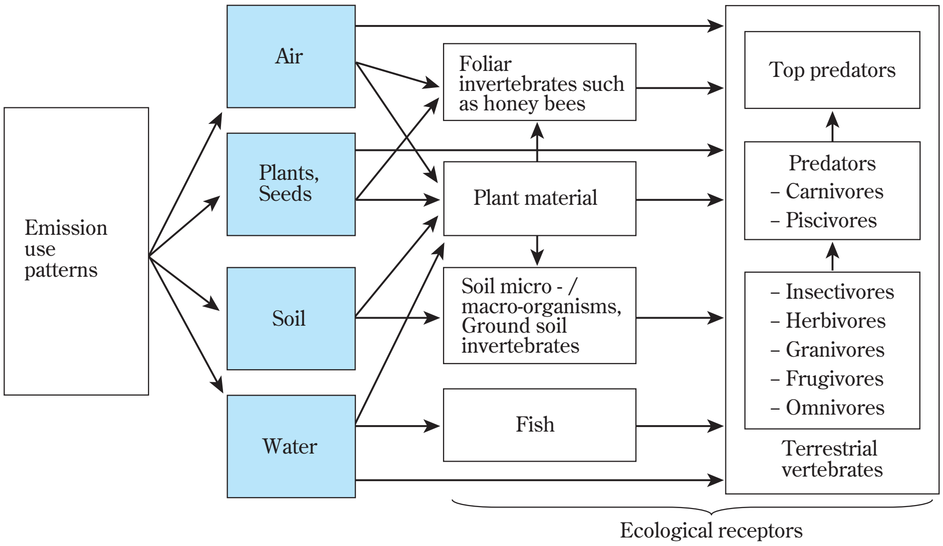


Fig. 1 General principle of the ecotoxicological risk assessment scheme in the terrestrial ecosystems



Chemicals reach the initial exposed compartment (s) (Air, Plants, Seeds, Soil or Water), distribute in the environment and reach ecological receptors.

Fig. 2 EU Conceptual model for the hazard and risk assessments in the terrestrial ecosystems

Table 2 Data requirements and parameters for exposure/risk for the pesticide registration in EU (Tier-1)

Taxonomic groups	Required data	Endpoints	Parameters for exposure	Parameters for risk	Acceptable trigger of TER or HQ
Birds	Acute: Acute oral study	LD_{50}	DDD	TER	≥ 10
	Short term: 5-day dietary study	LC_{50}			≥ 10
	Long term: Reproduction study	NOEC			≥ 5
Mammals	Acute: Acute oral study	LD_{50}	DDD	TER	≥ 10
	Long term: Reproduction study (or Teratology study)	NOEL			≥ 5
Bees	Acute oral and contact study	LD_{50}	Application rate	HQ	< 50
	Bee brood feeding study	NOEC	Application concentration	TER	≥ 1
Other arthropods	Standard laboratory study	LR_{50}	Exposure rate	HQ	< 2
Earthworms	Acute: Acute study	LC_{50}	PEC soil	TER	≥ 10
	Chronic: Reproduction study	NOEC	PEC soil	TER	≥ 5
Soil non-target micro-organisms	Soil nitrification and carbon mineralisation study	NOEC	PEC soil	TER	≥ 1
Other soil non-target macro-organisms	Collembola/Gamasid mite: Reproduction study	NOEC	PEC soil	TER	≥ 5
Non-target plants	Screening data such as phytotoxicity	NOEC	Application rate	TER	≥ 1

DDD: Daily Dietary Dose, TER: Toxicity Exposure Ratio, HQ: Hazard Quotient
PEC soil: Predicted Environmental Concentration in soil

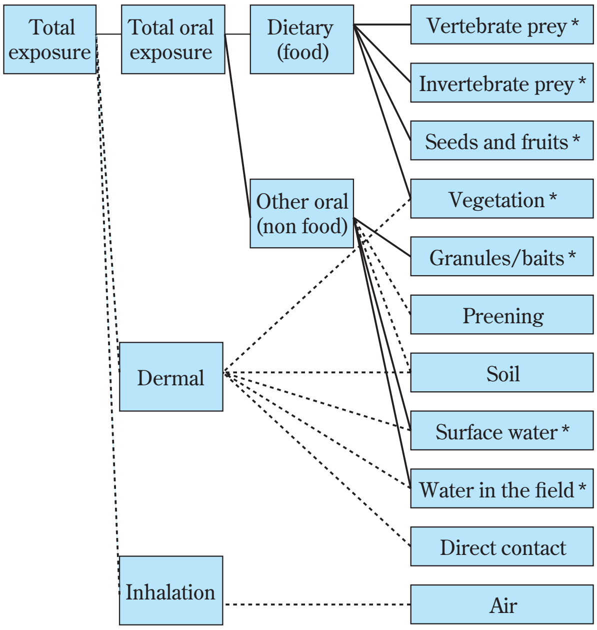
生物やミツバチ・有用節足動物など農業資材も評価対象となっており、また、低次評価の段階から曝露レベルの精緻化手法も示され、影響評価手法に柔軟性を持たせているのも特徴である。

① 鳥類・哺乳類[8)–10), 15)]

各試験の毒性指標（エンドポイント）と推定理論曝露量の比をTER（Toxicity Exposure Ratio, エンドポイント/推定理論曝露量）として求め、安全性許容基準値（Acceptable trigger value）と比較し安全性を評価する。低次評価では、鳥類1種（コリンウズラあるいはニホンウズラ）の急性経口投与試験データが求められ、農薬の使用方法によって親動物の曝露や繁殖期の営巣への曝露が否定できない場合は、鳥類1種の繁殖性試験のデータが必要となる。一方、哺乳類評価では、ヒト健康影響評価のため実施されるラットの急性経口投与試験と、2世代繁殖性試験など長期試験のデータを使用する。

各試験のエンドポイントは、急性経口投与試験では半数致死量LD_{50}（Lethal Dose 50%）、繁殖性試験では最大無影響濃度NOEC（No Observed Effect Concentration）または最大無影響量NOEL（No Observed Effect Level）である。そのうち、餌中の濃度単位（mg/kg dietまたはppm）で表記されるNOECについては、摂餌量に基づき体重1kg当たりのNOEL（単位はmg/kg b.w./day）に変換して評価に用いる。

EUの曝露ルート（**Fig. 3**）の考え方は、曝露の頻度や量が最も高いと想定される経口を最重要経路と位置づけ、餌および飲水の経口曝露シナリオ、並びに生物濃縮からの曝露シナリオを設定し推定理論曝露量を求める。尚、EU評価法では使用方法（茎葉への液剤スプレー散布、土壌への粒剤散布、種子処理）に応じた曝露シナリオの例示もあるが、ここでは代表的な使用方法である茎葉へのスプレー散布に絞って紹介する。



*: covered by Tier-1 scenarios

Fig. 3 Relevant exposure routes dependent on the plant protection product to be assessed in EU

例えば、餌の推定理論曝露量DDD（Daily Dietary Dose）の計算は、以下に示した式からも分かるように、体重当たりの摂餌率FIR/b.w.に農薬散布後の餌中予想濃度Cを乗じて求める。忌避係数AV、散布区域内で摂餌する比率PTおよび餌中の餌種類比率PDなどの要因も曝露量の算出に用いられるが、低次評価では初期設定値の1とする。

DDD = (FIR/b.w.) * C * AV * PT * PD

DDD: Daily Dietary Dose (mg/kg b.w./day)

FIR : Food intake rate of indicator or generic focal species (g fresh weight/day)

b.w. : Body weight (g)

C : Concentration of compound in fresh diet (mg/kg diet)

AV : Avoidance factor (0: no avoidance, 1: complete avoidance)

PT : Fraction of diet obtained in treated area (0～1)

PD : Fraction of food type in diet (0～1)

また、飲水を介する曝露では、植物の葉腋に溜まる散布液および畑内の水溜り液からの曝露を想定したLeafシナリオおよびPuddleシナリオに従い評価する。

もし、これら評価でTERが許容基準を下回る場合には、更に様々な精緻化を通した安全性の評価を行う事となる。例えば餌曝露の場合には、実際の餌中濃度の実測、公表文献や各種食性などをまとめたBIRD BIBLE[16] やMAMMAL BIBLE[17] といったデータベースに基づく初期設定値（AV、PD、PTなど）の精緻化、施用時期を考慮した実際に曝露されうる対象種の絞込みによる推定理論曝露量の見直し、あるいは追加生物種の試験や既存試験の毒性パターンの解析、個体群モデリング、野外試験の実施[10] などが考えられる。

尚、生物濃縮性と食物連鎖の懸念から、logPow（オクタノール－水分配係数）＞3の農薬の場合、ミミズを餌とする鳥類・哺乳類の評価、魚を餌とする鳥類・哺乳類の評価および食物連鎖を介した生物蓄積性（biomagnification）の評価を行う。生物蓄積性に関する評価では、陸生脊椎動物の食物連鎖を想定し、低次栄養段階の動物を捕食するハヤブサやキツネなどの高次捕食者、更にはワシ、オオヤマネコ、オオカミなどの最上位捕食者の評価を段階的に行う。

② ハチ[8), 9), 15)]

閉鎖空間での貯穀用途や受粉媒介生物のいない温室用途などミツバチへの曝露が考えられない限定使用の農薬以外、セイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）の急性経口および急性接触試験は必須である。影響評価に用いられるエンドポイントはLD_{50}（μg/bee）で、散布量との比であるHQ（Hazard Quotient, 散布量（g/ha）/LD_{50}）を算出し、HQが50を下回った場合に安全であると判断される。一方、化合物がIGR（Insect Growth Regulator）の場合は、ハチ幼虫への影響を評価するBee brood feeding試験も必要である。もし、リスク評価でHQ≧50であれば、高次試験である残毒（Residue）試験や野外でのケージ（Cage）試験、トンネル（Tunnel）試験、圃場試験などで安全性を評価する。

③ 非標的節足動物（ハチを除く有用昆虫など）[8), 9), 15), 18)]

ミツバチと同様、曝露が考えられない限定使用の農薬以外は必須の試験である。実施および評価の基準を記したESCORT2ガイダンスドキュメント[18] に従い、農薬の使用形態によって供試生物種を選択するが、標準の2種（寄生性ハチの一種：*Aphidius rhopalosiphi*、捕食性ダニの一種：*Typhlodromus pyri*）を用い、ガラス

板に農薬を塗布した試験を行い、半数致死散布量であるLR_{50}（Lethal Rate 50%, g/ha）を求める。得られたLR_{50}と曝露予想量（g/ha）から、in-field（圃場内）とoff-field（圃場周辺）のHQ（曝露予想量/LR_{50}）を算出し、HQが2を下回った場合に安全であると判断される。曝露予想量には、in-fieldでは散布量および多回散布係数MAF（Multi Application Factor）を、off-fieldでは散布量、MAF、ドリフト率および植物分布係数を乗じて算出する。尚、HQ算出に於いて、節足動物種の多様性を考慮し、off-field評価で種多様性不確実係数の10を乗じる配慮もなされる。

もし、リスク評価でHQ ≧ 2であれば、供試生物種を増やして高次試験により影響評価を行う。高次試験では、ガラス板ではなく実際の植物の葉を用いた試験（Extended laboratory test）や残毒（Aged residue）試験、野外での圃場試験などで安全性を確認する。尚、高次試験における評価基準は、影響の回復性に着眼され、in-fieldでは1年以内、off-fieldでは生態学的に許容される期間内での回復性となっている。

④　土壌生物[8), 9), 15)]

土壌施用あるいは土壌汚染が想定される場合に必須であり、代表種であるミミズの他、土壌微生物、場合によってはミミズ以外の大型土壌生物の評価が必要である。

(i) ミミズ

シマミミズ（*Eisenia fetida*）を供試生物にOECD人工土壌を用いた急性毒性試験からLC_{50}を求め、土壌予想濃度PEC soil（Predicted Environmental Concentration in soil、土深5 cm、土密度1.5）の初期値との比であるTER（LC_{50}/PEC soil）を算出し、TER ≧ 10であれば安全であると判断される。もし、TER < 10であれば、長期試験である繁殖性試験によって影響を評価する必要がある。農薬への長期曝露の可能性が想定される場合（野外の土壌中DT_{90} > 365日あるいは農薬の使用回数が年6回を超える場合は必須、DT_{90} = 100～365日で使用回数3～6回ではケースバイケースで要求され、DT_{90} < 100日かつ使用回数 < 年3回では不要; DT_{90}, 農薬が90%減衰するに必要な期間）も繁殖性試験を行う必要がある。繁殖性試験では、リスク評価上のエンドポイントであるNOECと別途算出のPEC soil初期値とを比較してTER（NOEC/PEC soil）を算出し、TERが5を上回った場合に安全であると評価する。もし、TER < 5であれば、天然土壌を用いたラボ試験や圃場試験などのオプションにより安全性を評価する。

(ii) 土壌微生物

牧草地などから採取した土壌に最大PEC soilを想定した試験濃度の農薬を処理し、二酸化炭素生成量および硝酸体窒素生成量の経時推移により微生物の炭素無機化および窒素変換を指標として、28日から最長100日以内に無処理対照区との差が25%以内になれば安全であると評価される。

(iii) 土壌大型無脊椎動物

野外の土壌中DT_{90} = 100～365日で、かつ、ミミズ長期TER < 5 あるいは 土壌微生物への影響 > 25%（対無処理対照区）に加え、非標的節足動物の標準試験HQ ≧ 2の場合、トビムシの一種（*Folsomia candida*）またはトゲダニの一種（*Hypoaspis aculeifer*）の繁殖性試験によって影響評価を行う。得られたNOECとPEC soilとを比較し、TER（NOEC/PEC soil）が5を上回れば安全であると評価される。

トビムシまたはトゲダニ試験で安全性が確認できない場合やDT_{90} > 365日の場合は、高次試験の一つとして、物質循環への影響を評価する観点から有機物分解能を指標とした有機物分解試験（Litter bag test）による評価を行う。この試験では、シミュレーションモデルにより求められる長期使用後に安定水準に達する農薬の土中濃度（プラトー濃度）で散布された野外圃場に所定量の藁を埋設し、その後1週間以内に年間最大施用量の農薬を散布して、藁重量の減衰を6～12ヶ月間経時的に無処理対照区と比較しながら評価する。

⑤　非標的植物[8), 9), 15)]

殺鼠剤や種子処理剤、温室内での施用など曝露が無視しうる場合を除いて評価が必要となる。薬効・薬害などの初期評価スクリーニング情報が活用される第1段階、6～10種の植物を用いた用量相関性の試験から50%影響用量ER_{50}（g/ha）を求め散布量と比較する第2段階、野外試験に基づく第3段階といった段階的な評価手法が提示されている。除草剤や植物生長調節剤は第2段階以上の評価が要求される。

⑥　代謝物の評価[9)]

農薬製剤中の有効成分（いわゆる親化合物）から環境中で生物学的あるいは非生物学的過程を経て形成される分解物（代謝物）については、その生成量などを踏まえ、影響評価する必要がある。土壌代謝試験などで10%以上認められた主要代謝物（major metabolite）では急性毒性試験などを通した評価を行うが、10%未満の代謝物（minor metabolite）については、例えば毒性が親化合物より10倍強いと仮定した場合の仮想毒性値など関連情報を活用して評価する事も行われている。

(2) 米国

米国登録でEPA評価の対象とされる鳥類・哺乳類、ハチおよび非標的植物での評価指標および許容基

Table 3 Data requirements and parameters for exposure/risk for the pesticide registration in US (Tier-1)

Taxonomic groups	Required data	Endpoints	Parameters for exposure	Parameters for risk	Level of concern
Birds	Acute: Acute oral study	LD_{50}	Dose-based EEC	Dose-based RQ	0.5 (0.1 for endangered species)
	Short term: 5-day dietary study	LC_{50}	Dietary-based EEC	Dietary-based RQ	
	Long term: Reproduction study	NOEC			1
Mammals	Acute: Acute oral study	LD_{50}	Dose-based EEC	Dose-based RQ	0.5 (0.1 for endangered species)
	Long term: Reproduction study (or Teratology study)	NOEC or NOEL	Dietary-based EEC or Dose-based EEC	Dietary-based RQ or Dose-based RQ	1
Bees	Acute contact study	LD_{50}	–	–	< 11 μg a.s./bee
Non-target plants	Seedling emergence study	NOEC	Application rate or 3 times EEC	–	< 25% adverse effect
	Vegetative vigor study				

RQ = EEC or Application rate/Toxicity endpoint, a.s. = active substance

準[11), 12), 19)–21)]の概要を以下に概説する（Table 3）。基本的な考え方はEUと同様であるが、米国での絶滅危惧種への配慮がなされているのが特徴と言える。また、影響評価には、環境中予想濃度/エンドポイントであるRQ（Risk Quotient: TERの逆数）を利用している。

① 鳥類・哺乳類[11), 12), 19)–22)]

農薬の使用形態によって、鳥類2種（スズメ目1種、コリンウズラまたはマガモのいずれか1種）の急性経口投与、鳥類2種（コリンウズラ、マガモ）の5日間混餌投与および繁殖性の試験の実施が必要となる。尚、液体製剤の温室での使用や室内使用の場合は、急性経口投与試験のデータは不要である。一方、哺乳類では、ヒト健康影響評価で実施されるラットの急性経口投与試験や2世代繁殖性試験など長期試験のデータを評価し、その結果次第で野生種を用いた急性毒性試験などが求められる事もある。

影響評価に用いられる鳥類・哺乳類の毒性試験のエンドポイントは急性経口投与試験のLD_{50}、5日間混餌投与試験（鳥類のみ）のLC_{50}、繁殖性試験ではNOECないしNOELである。これらエンドポイントは、環境中予想濃度EEC（Estimated Environmental Concentration）と比較してRQ（EEC/エンドポイント）を算出し、基準値LOC（Level of Concern）との比較を行う。

米国にもEU同様に処理方法の違い（茎葉への液剤スプレー散布、土壌への粒剤散布、種子処理）に応じた評価シナリオ[22)]がある。ここでは茎葉へのスプレー散布の場合について述べる。急性経口評価に於いては、鳥類および哺乳類とも小型、中型および大型の各体重サイズ別に補正されたShort grassや種子、昆虫などの餌中残留量Dose-based EECと、エンドポイントを各体重サイズ別に補正したAdjusted LD_{50}とを比較する。短期摂餌および長期影響評価に於いては、鳥類では各種餌中濃度Dietary-based EECとエンドポイント（LC_{50}、NOEC）を、哺乳類ではそれに加えDose-based EECとAdjusted NOELを比較する。影響評価でRQがLOCを上回った場合、例えば実際の餌中濃度の実測や、初期設定値（餌中半減期など）の精緻化などにより、曝露レベル軽減による高次評価が図られる事になる。それでも安全性に懸念が残る場合は、野外試験など更なる試験を実施して影響評価を行う事となる。

② ハチ[11), 12), 19)–21)]

農薬の使用方法によって、セイヨウミツバチの急性接触試験の試験データが必要となる。影響評価に用いられるエンドポイントはLD_{50}（μg/bee）で、LD_{50} < 11 μg/beeの場合は、高次試験の残毒（Residue）試験や受粉媒介者の圃場試験を通した評価が必要となる。

③ 非標的植物[11), 12), 19)–21)]

ハチと同様に使用方法によって、Tier-1評価に位置付けられた実生の出芽試験および生長試験が必要となる。実施用量あるいはEECレベルの3倍量で試験を行い、無処理対照区との比較で25%以上の毒性影響が認められれば、以降 段階的に高次試験として用量相関性を評価するTier-2試験や、Tier-3試験として圃場試験によって影響評価を行う。

(3) 日本

日本におけるデータ要求[13)]の対象生物群は鳥類、ミツバチ、天敵昆虫および蚕で、農業に関連した産業への配慮が窺える一方で、陸域生態系への定量的リスク評価は行われておらず、現時点では、ハザード評価のみに基づく、製品ラベルへの注意事項によるリスク管理に止まっている。

① 鳥類[13), 23)]

急性経口投与試験を実施し、強い毒性（LD_{50} < 300 mg/kg）が認められた場合、混餌投与試験を行う。毒性が弱い場合には、注意事項は不要である。

② ハチ[13), 23)]

養蜂および受粉用昆虫の双方への影響評価の観点から、セイヨウミツバチに対する急性毒性試験（急性経口試験または急性接触試験）を行う。ただし、農薬の剤型や使用方法などから、ミツバチが当該農薬に曝露される恐れがないと考えられる場合（例：粒剤、倉庫くん蒸剤など施設内でのみ使用）には試験成績の提出は免除される。急性毒性試験の結果、強い毒性が認められる場合には圃場試験が求められる。LD_{50}値が11 μg/bee以上、あるいは農薬登録申請における最高薬量で影響が認められない場合には、注意事項は不要である。

③ 天敵昆虫など[13), 23)]

生物農薬としての天敵および土着の天敵への影響評価の観点から試験が求められる。捕食昆虫類（双翅目、半翅目、鞘翅目、脈翅目）、寄生蜂類（膜翅目）、クモ目、捕食性ダニ類（ダニ目）から2目3種以上を供試生物として選択し、農薬登録申請における最高薬量で急性毒性試験を行う。急性毒性試験の結果、強い毒性が認められる場合は圃場試験が求められる。毒性が弱い場合には、注意事項は不要である。

④ 蚕[13), 23)]

農薬登録申請における最高薬量を散布し、風乾した後の桑葉を給餌する急性経口毒性試験を行う。ただし、農薬の剤型や使用方法などから、蚕が桑葉を摂取する事などにより当該農薬に曝露される恐れがないと認められる場合（例：粒剤、倉庫くん蒸剤など施設内でのみ使用）には試験成績の提出は免除される。急性毒性試験の結果、強い毒性が認められる場合は、農薬処理後所定の日数を経過した葉を給餌する残毒試験を行う。蚕影響試験成績の結果、毒性が弱い場合には、注意事項は不要である。

3. 最近の動向

世界的に見ても早くから導入された欧米の評価体系でさえ、自然環境、生物および生態系の複雑さ、生態学的に未解明な点の多さ、その結果として関連する影響評価の困難さから、現行評価体系や評価手法には様々な課題点があり、陸域生態影響評価法の更なる研究・検討、改良・提案が行われている。例えば、EUでは初期設定値を多用する事により極端に保守的な評価になっていた従来の鳥類および哺乳類リスク評価体制を改良し、対象作物の種類や形態、農薬の使用方法や使用時期、並びに曝露されうる動物種の生態学的な特性をそれぞれ組み合わせた広範囲な低次評価シナリオが最近導入された[10)]。また、非標的節足動物、ミツバチあるいは土壌生物についても、ESCORT3[24)]、ICPBR[25)]あるいはIRIS[26)]などのワークショップで影響評価法に関する議論が活発であり、それらの動向も踏まえた陸生生物全般に関するEUリスク評価ガイダンスドキュメントの改訂の動きもある[27)]。

一方、試験要求基準の見直しも図られ、米国では最近の基準改定[12)]では、Songbirdsへのリスクを直接評価するスズメ目1種の急性経口投与試験が求められようになった（当初、Red-winged blackbirdハゴロモガラスが推奨種と提案されたが、野生種で捕獲する必要があるなど取り扱い上の難しさから具体名は省かれた）。EUでは、嘔吐発現による過小評価の懸念からマガモが推奨種から外れ、鳥類5日間混餌投与試験も得られるデータの生態毒性学的意義の不明さおよび動物福祉の観点から標準試験項目から外れた[10)]。また、土壌生態系では機能面の試験（土壌微生物試験、有機物分解試験）の取り扱いについて審議中で、両生類や爬虫類に対するデータを試験要求項目に組み込もうとする動きもある[28)]。

最近の内分泌撹乱化学物質に関する規制動向では、米国で化学物質の内分泌撹乱（ED）作用の有無を見極めるため内分泌撹乱化学物質スクリーニングプログラムEDSP（Endocrine Disruptor Screening Program）が本格稼動し、その一環であるTier-1スクリーニングデータ要求が2009年に発効され進行中である[29)]。EDSPでは、エストロゲン、アンドロゲンあるいは甲状腺ホルモンに関する機能に対する影響評価を主体として、Tier-1スクリーニングとTier-2テストの2段階の試験体制を採用している。Tier-1スクリーニングは、生物の内分泌系に対する化学物質の作用の検出を目的とした5種類の試験管内（*in vitro*）試験と6種類の動物（*in vivo*）試験より構成され、Tier-2テストは、化学物質の生物に対する有害な影響を確認する為の試験で、現在その妥当性検証が実施されている。これらの中で甲状腺機能への影響を高感度に検出できる系はヒト健康影響試験としても限られ、環境生物のカエルを用いた両生類変態試験（Amphibian metamorphosis assay）がTier-1スクリーニングに組み込まれている。その評価項目の特殊性のみならず、陸域生態系で重要な位置づけの両生類への影響を評価する観点から、カエルを用いた当該試験の重要性が増している。また、陸域生物の影響評価手法として鳥類2世代繁殖性試験法がTier-2テストとして開発中である[30)]。

一方、EUに於いては、生態系に対し潜在的に残留性・生物濃縮性・ED作用など深刻な影響を及ぼす化合物の上市と使用を禁止する一律の基準（cut-off criteria）を農薬登録規則に導入する法律が発効され[31)]、上述の定量的影響評価とは別の新たな基準として配慮が必要になっている。

陸域生態影響評価における高次試験、新たな取り組みなどの具体例

1. 高次試験の具体例

農薬としての本来の生物活性あるいは環境挙動から、当社の一部の農薬についても陸域生態系への影響が懸念された。しかし、野外圃場を用いた精緻な高次試験を実施する事で、その安全性を示す事ができたEUでの具体例を以下に紹介する。

(1) ピリプロキシフェンのミツバチ野外試験

殺虫剤ピリプロキシフェンのミツバチ成虫に対する急性毒性は非常に弱く（セイヨウミツバチ、LD_{50} = 74～＞100 µg/bee）、また、ピリプロキシフェン濃度が25 ppmになるよう人工飼料（花粉）に添加しコロニー（蜂群）に給餌した実験に於いても幼虫羽化に対しては無影響であった[32]。ただ、当剤が昆虫幼若ホルモン類縁体に分類される昆虫成長調節剤である事から、実際の場面を想定したミツバチ幼虫の発育および変態に及ぼす影響の有無をより精緻に確認しておく必要があると考えられた。その場合、社会性昆虫であるミツバチの特性、すなわち、コロニーにおける女王蜂と働き蜂が各種内役や外役を分業し、規則性のある幼虫発育を呈し、更に餌である蜜や花粉を複雑かつ上手くエネルギー循環させる[33–36]などの特異な生態を考慮する必要がある。また、実際の使用場面では、作物やその生育状態などによってミツバチの蜜源の有無や作物への嗜好性も異なる為、その点への配慮も必要となる。一方で、ミツバチ幼虫の発育に焦点を当てた野外試験の詳細なテストガイドラインがない事から、ミツバチに関する国際的な標準試験法[37,38]を参考に試験デザインを考案した。すなわち、ミツバチの嗜好性が高い標準植物*Phacelia tanacetifolia*を用い、その満開期にコロニーを用いた野外影響評価試験を実施し、当剤の影響を調査する事とした（Table 4、Fig. 4、Fig. 5）。

Table 4 Outline of the honeybee field test for pyriproxyfen focusing on brood and colony health

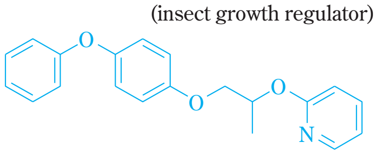
Test Organism:	Honeybee (*Apis mellifera*)
Test Unit:	Colony (ca. 60,000 – 80,000 worker bees)
Field site:	Germany, 0.5 ha/group, 3 km distance full flowering *Phacelia tanacetifolia* (bee attractive)
Test substance:	Pyriproxyfen 10%EC, active substance: Pyriproxyfen (insect growth regulator) 
Test group:	treatment (75 g a.s./ha) and control, 4 colonies/group
Observation:	bee flight activity, foraging intensity, dead bees (hive and field), brood development, frame conditions, hive weight

Fig. 4 Photograph of the test substance treatment to the testing field

Fig. 5 Photograph of the honeybee hives set aside the testing field with dead bee traps in front of their entrances

評価期間はピリプロキシフェンの作用ポテンシャル、コロニー内での複雑なエネルギー循環および野外試験の不安定さなども踏まえ、標準的な野外試験法の1～2週間[37,39]よりも期間を延長した薬剤処理後2ヶ月間とし、その間の外役蜂の訪花、収穫活性および死亡個体数、並びに幼虫発育サイクルを観察する事でコロニー状態および幼虫発育を評価した。ミツバチコロニーは働き蜂により恒温に保たれ、卵は一定期間で羽化する。女王蜂の産卵した娘蜂の卵は3日間で孵化し、孵化幼虫は内役蜂に給餌され6日後に蛹化すると共に幼虫を収容・養育するセル（巣房）は有蓋化され、その12日後に羽化する[35]事が知られている。この発育サイクルを踏まえ、巣板中の卵あるいは幼虫の収容されているセルの領域を予め虫ピンを用いて特定し（Fig. 6）、個別セル中の幼虫の発育を2サイクル観察する事で、幼虫の発育への影響を精緻に評価した。

その結果、巣板中で特定した卵および幼虫とも、ピリプロキシフェン処理区は対照区と同様に健全に成虫に発育する事が確認された（Fig. 7）。一例として、ピ

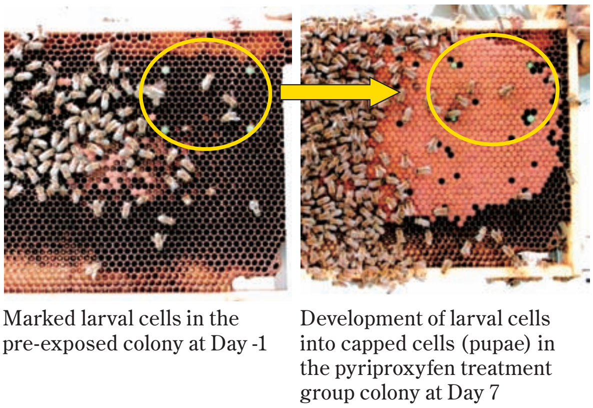


Fig. 6 Photograph of the individual monitoring of honeybee brood development by marking cells in the comb

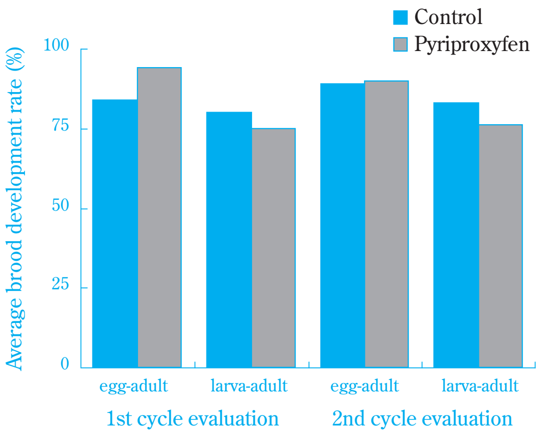


Fig. 7 Honeybee brood development monitored by individual cells in the field test for pyriproxyfen

リプロキシフェン処理区における散布直前から翌週にかけての幼虫収容セルの変化を**Fig. 6**に示す。当初幼虫が観察されていたセルは翌週には予定通り蛹に変態した事を示すセルの有蓋化が確認できた。

また、ミツバチの習性としてコロニー内での死亡個体は羽化不全幼虫なども含めて巣箱入口から外に排除されるが[37), 39)]、コロニーが移設など環境の変化に敏感に反応して、移設直後に一過性に巣箱入口付近で死亡個体が多くみられる事も知られている[37)]。そこで、そのようなストレス要因の試験評価への悪影響を除く為、巣箱の試験圃場への移設後数日以上馴化させた後に薬剤散布する試験デザインを採用すると共に、確認のため巣箱入口にdead bee trap（巣箱から排除された死亡個体を回収できる装置：**Fig. 5**の赤いコンテナー部分）を設置し、死亡個体数を観察した。トラップを継続的にモニタリングして得られたピリプロキシフェン処理後のコロニーの平均死亡個体数は、処理前（馴化中）よりも明確に低レベルで、かつ、無処理区と同様であり、コロニーへのストレス負荷のない状況下でピリプロキシフェン処理による死亡個体の増加がない事が確かめられた。

更に、経時的に測定した巣箱重量に於いても、ピリプロキシフェン処理区と無処理区に差は全くみられず、健全に季節的な重量増加が認められた（**Fig. 8**）。

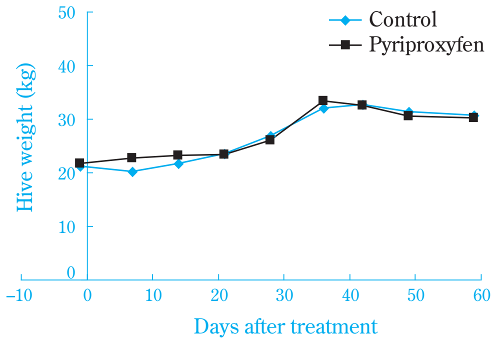


Fig. 8 Hive weight changes monitored during the field test for pyriproxyfen

これらの結果から、野外の現実的な曝露条件下でもピリプロキシフェンはミツバチ幼虫の発育およびコロニーに対して影響を及ぼす可能性は低い事が実証できた。

(2) エスフェンバレレートの非標的節足動物野外試験

圃場環境は自然環境とは異なり、植生は偏り密度も調整され、除草や施肥などの人為作業も行われ、これらの要因が圃場に生息する節足動物の個体群の変動に影響を及ぼしうると考えられる。これに関連し、EUの非標的節足動物の影響評価における許容評価基準は、前述したように直接農薬が散布される圃場内（in-field）と圃場内の生物の移入源であり農薬のドリフトにより微量であるが曝露されうる圃場周辺（off-field）とで異なり、前者は1年以内の回復性、後者は生態学的に許容できる期間内での回復性と規定されている[9), 18)]。

ピレスロイド系殺虫剤のエスフェンバレレートは、その殺虫活性のためラボで行った高次試験に於いても一部の標準供試生物に対し影響を及ぼし、影響評価での許容基準に達しなかった事から、野外での影響評価試験を実施し、当剤の安全性を確かめる事とした。野外試験を行うにあたっては、EU登録申請上、散布回数および施用量ともに最悪条件と考えられた果樹施用条件下での非標的節足動物の影響を評価する事とし、更に許容基準の異なる圃場周辺での評価も的確に行う為に、施用量である15 g a.s./ha試験区に加えて飛散（ドリフト）を想定した7.5および1.5 g a.s./haの試験区を設けた。個体群の評価には有用節足動物である捕食性ダニ、アリマキ捕食昆虫類、寄生種およびその他の捕食者に加え、餌生物や標的生物であるハダニやアリマキも観

Table 5 Outline of the apple field test for esfenvalerate evaluating effects on non-target arthropods

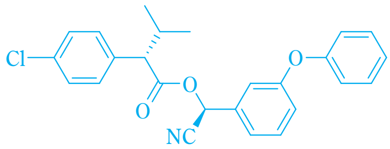
Test Organism:	Natural arthropods in orchard field
Field site:	France, apple field, ca. 81 m^2/ plot × 4 plots/group
Test substance:	Sumi-Alpha® 5EC, active substance: Esfenvalerate (pyrethroid insecticide) 
Test group:	treatment (1.5, 7.5, 15 g a.s./ha) and control, triplicate treatments (2 weeks interval)
Observation:	abundance of arthropods by appropriate methods (leaf sampling, beating tray, visual check); predatory mite & their eggs, aphid predators (e.g. lacewing, ladybird beetle, predatory bug), parasitic wasps, other predators (e.g. spider), prey (i.e. spider mites & aphids)

Fig. 9 Photograph of the test substance treatment by hand-held sprayer to the apple field

察項目に組み込み、餌不足による間接影響の評価も考慮した（Table 5、Fig. 9）。

観察された生物種の一例をFig. 10に示す。

捕食性ダニの個体数は無処理区の季節的な変動に比べて散布直後から7.5および15 g a.s./ha区では僅かな低下が認められたものの1月以内に無処理区と同レベルの個体数に回復し、1.5 g a.s./ha試験区では観察期間を通じて影響は認められなかった（Fig. 11）。また、同時に観察した捕食性ダニの卵数も十分に計数されており、継続的な繁殖能力により個体数が回復する事が確認できた。

クサカゲロウなどのアリマキ捕食者の個体群も捕食性ダニと同様に、7.5および15 g a.s./ha区で散布直後に無処理区に比べて明確な個体数低下が認められたが、真夏には無処理区も含め季節性の変化で低個体数となった後、無処理区との比較に於いて違いが消失して

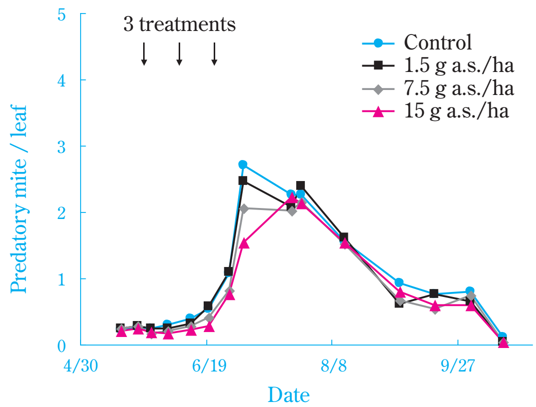


Fig. 11 Number of predatory mites during the apple field test for esfenvalerate

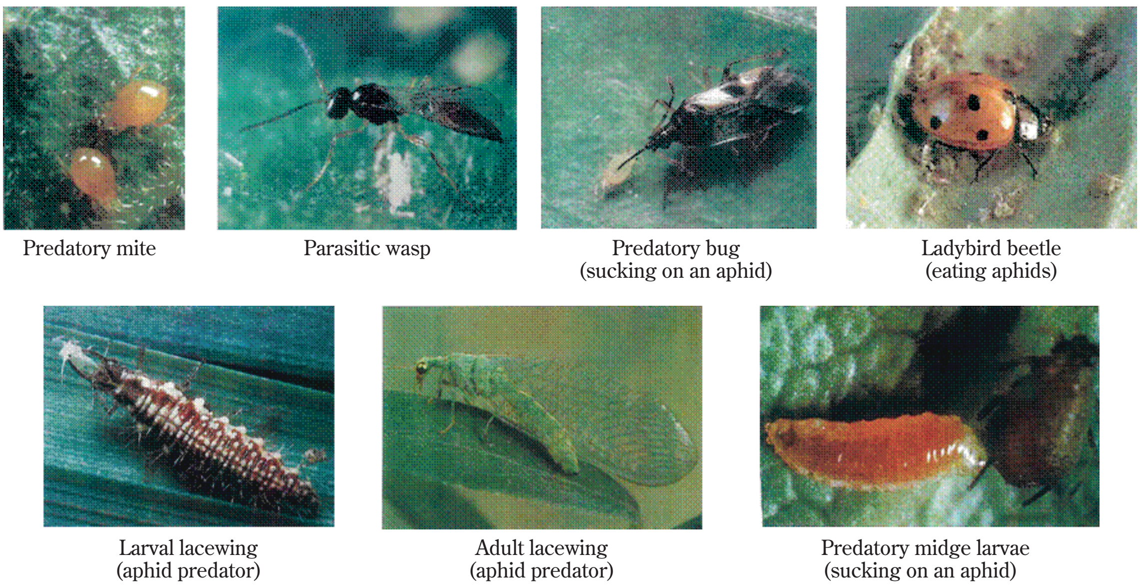


Fig. 10 Photographs of the typical arthropods observed in the apple field test for esfenvalerate

おり、散布後1ヶ月程度で個体数の回復性が確認できた（**Fig. 12**）。また、その推移は餌生物であり標的害虫であるアリマキ個体数の低下とも一致しており、別途実施の半野外試験におけるクサカゲロウの低毒性のデータなども踏まえると、アリマキ捕食者の散布直後の個体数低下はエスフェンバレレート処理の直接影響ではなく、餌（害虫のアリマキ）不足による間接影響の可能性が示唆された。

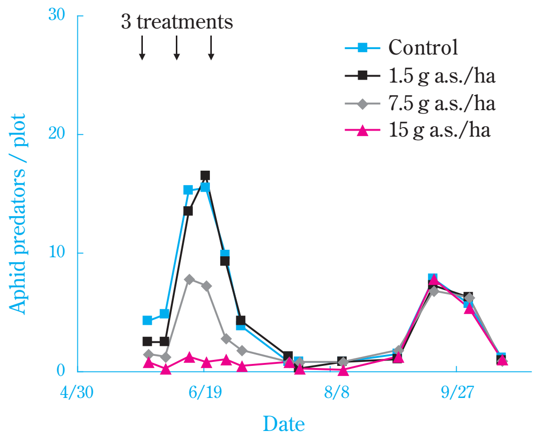


Fig. 12 Number of aphid predators during the apple field test for esfenvalerate

Table 6に示した通り、各種生物種の評価結果から、圃場周辺のドリフトでの曝露を想定した1.5 g a.s./ha試験区は無影響であり、EUにおける使用上の最悪条件での散布量および散布回数である15 g a.s./haの3回散布でも、いずれの生物群も１ヶ月以内の回復が確かめられ、非標的節足動物に対する安全性を確認する事ができた。

Table 6 Summary results of non-target arthropods in the apple field test for esfenvalerate

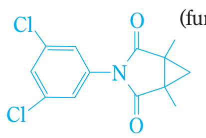
	Esfenvalerate treatment		
	1.5 g a.s./ha	7.5 g a.s./ha	15 g a.s./ha
Predatory mites	No effect	Recover within 1M	Recover within 1M
Spider mites	No effect	Recover within 1M	Recover within 1M
Aphid predators	No effect	Recover within 1M #	Recover within 1M #
Other predators	No effect	Recover within 1M #	Recover within 1M #
Parasitic wasps	No effect	Recover within 1M #	Recover within 1M #

M: month,　#: possibly indirect effect due to food limitation

(3) プロシミドンの土壌の有機物分解機能評価（Litter bag試験）

殺菌剤プロシミドンは標準の土壌生物ラボ試験では、いずれの生物群に対しても影響は弱く、シマミミズ14d-LC_{50} ＞ 1000 mg a.s./kg、56d-NOEC = 3.750 kg a.s./ha（5 mg a.s./kg相当）、土壌微生物25%影響レベル ＞ 10 mg a.s./kgの良好な結果が得られており、これらのデータを踏まえると土壌生物群に対する影響の懸念は低いと考えられた。また、実際の施用の年間散布回数も少なく、野外における土壌中DT_{90}も1年未満（349日、n = 3）の結果が得られていたが、土質によって土壌残留性が幾分か変動する可能性も示唆されていた事から、より確実な土壌生態系への安全性を確認しておく為、EU登録要件で高次試験として位置づけられ土壌での物質循環を評価するLitter bag試験と呼ばれる、文字通り藁入りの袋を用いる特殊な野外試験を実施した（**Table 7**）。

Table 7 Outline of the litter bag test for procymidone evaluating organic matter breakdown

Test Unit:	Litter bags (4 g of dry wheat straw)
Field site & Season:	Switzerland, 25 ~ 30 m^2/plot × 4 plots/group, May ~ November
Test substance:	KIMONO® 50SC, active substance: Procymidone (fungicide) 
Test group:	treatment (3.752 kg a.s./ha, 2.5 times annual rate) and control
Treatment:	spray the litter bags on the test field, buried in the soil at 5 cm depth & marked the position
Measurement:	Ash free weight of dry residue of straw (1, 3 and 6 months after treatment)

土壌に埋設した藁束の分解に及ぼす影響を評価する試験で、圃場の土壌生物相の有機物分解の機能に着目したユニークな試験である。元々は1950年代から土壌生態学的な研究手法として始まり、落葉の種類や収容形態などを含めた条件比較などが様々な研究者から発表されている[40]。一般に、土壌における有機物の分解には、土壌微生物のみならずトビムシやダニといった中～大型土壌動物（体長0.2～2mm程度）や、ミミズやヤスデなどのさらに大型土壌動物（体長2～20mm程度）などが関与し、また、生物によっては直接的な分解だけでなくミミズのように土壌の耕耘・撹拌といった条件醸成による間接的な寄与など様々な要因が複雑に関係している[40]。そういった観点から、土壌における有機物分解性は生態系の二つの重要な指標である構造と機能の

うちの後者に着目した有用な評価と言える。Litter bag試験は、藁束を入れたナイロンメッシュの袋を土壌と共に薬剤スプレー処理した後に土中に埋設し（**Fig. 13**）、埋設した袋を経時的にサンプリングして、中の藁束の残存量を燃焼灰から定量し分解性を評価する[9), 41)]。

Fig. 13 Photograph of the test field preparing the nylon mesh bags containing litter

無処理区およびプロシミドン処理区の経時的な藁束の分解率は**Fig. 14**に示す通りで、両試験区に違いは認められず、土中埋設6月後には70%の良好な分解が得られ、実施用の圃場に於いても土壌生態系の機能維持に問題ない事が確認できた。

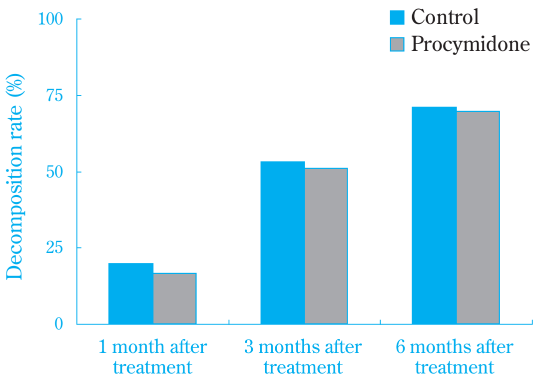


Fig. 14 Decomposition of straw in the litter bag test for procymidone

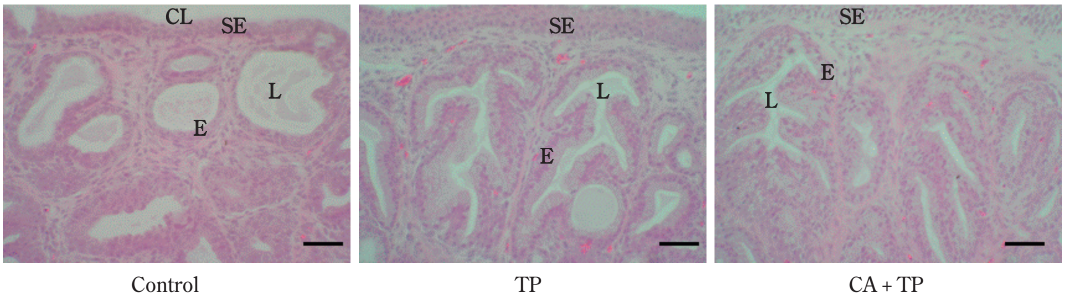
2. 新たな取り組みの具体例　～鳥類胚/ED作用簡易評価系の構築～

米国におけるEDSPの施行のほか、欧州における化学物質の登録・評価・許可および制限に関するREACH（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals）規則や農薬登録規則でのED作用の評価要求、国内でのSPEED98に端緒を発するED問題検討など、世界的にED作用に関する規制強化が図られている。このような状況の中、ED作用を的確に検出する為の各種毒性試験法の開発がOECD中心で進められ、その一環として鳥類の2世代繁殖性試験法の開発が継続されているが確立には至っていない。一方、鳥類の簡便評価系の開発も検討されているが、雌性ホルモン撹乱に関する評価系構築の報告に比べ、雄性ホルモン撹乱ポテンシャルを検出する系の報告例は非常に少ない。唯一の雄性ホルモン撹乱作用の評価手法は成熟動物を用いる*in vivo*法の為、飼育施設・設備の確保、特殊な実験操作、試験結果の変動など多くの問題点を有する。鳥類に対するED作用ポテンシャルの有無をより簡便かつ定量的に把握できる評価系があれば、剤の特性を開発早期に把握できED作用を見極める為の試験設計の一助とできる。そこで、鳥類における化学物質の雄性および抗雄性ホルモン作用の簡易評価系を検討する事とした。

ニホンウズラ胚における雄性ホルモン関連作用に対する評価指標として、肛門部にある総排泄腔腺（クロアカ腺）の組織構造変化に着目し、ウズラの受精卵に雄性または抗雄性ホルモン様物質（各々プロピオン酸テストステロン（TP）、酢酸シプロテロン（CA））を投与した孵化直前の孵卵16日の胚を詳細に観察した。その結果、孵卵13日にTPを投与すると（TP区）、孵卵16日胚のクロアカ腺が対照区に比べ著しく変化し、腺細胞の丈と細胞質の粘液様物質の増加を伴う構造変化を呈した。一方、孵卵13日のTP投与の前日にCAを投与する（CA+TP区）ことで、TP単独投与で認められたクロアカ腺構造の変化がCAにより抑制される事が知られた（**Fig. 15**）。この変動する発達したクロアカ腺構造の出現割合を定量的に解析する事で、両作用物質の影響を評価できる事が分かった[42)]（**Fig. 16**）。

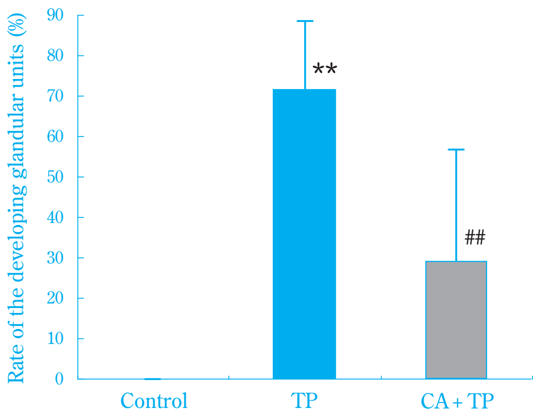
次に、クロアカ腺が成熟に伴い粘液多糖類を分泌する事に着目し、雄性ホルモンの刺激を受け発達したクロアカ腺細胞の細胞質中に、糖鎖との結合能を有するレクチンが陽性反応を示すかを検討した。十数種類のレクチンを用いてTP区およびCA+TP区の16日胚のクロアカ腺の組織化学検査を行った結果、TP区の発達したクロアカ腺細胞上皮に1種のレクチンが強く反応し、CA+TP区ではその陽性反応が抑えられる事を明らかにした（**Fig. 17**）。その反応の変動を活用し、クロアカ腺組織の単位面積当たりのレクチン陽性反応面積の割合を顕微鏡画像解析する事で、ウズラ胚における雄性および抗雄性ホルモン作用をより定量的に評価できる事を見出した[43)]（**Fig. 18**）。

これら評価系の汎用性の実証から、核内雄性ホルモン受容体を介する雄性および抗雄性ホルモン性内分泌撹乱作用を広範囲の化学物質の評価に適用できるものと考えている。また、従前の成熟動物を用いた方法に比べ、生体の術的処理を必要とせず、特別な飼育施設や設備も不要で、簡便な実験施設内で試験を行う事を可能にした。



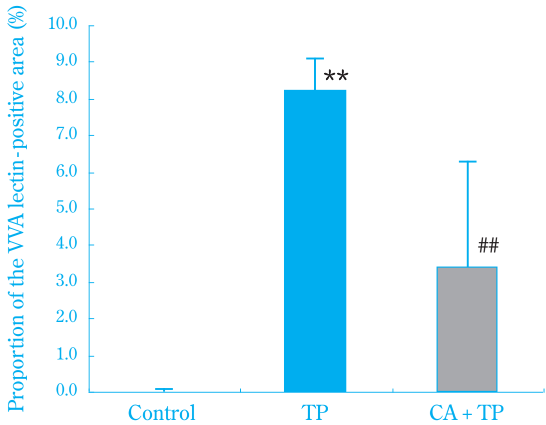
Hematoxylin and eosin staining. Scale bars = 30 μm.
CL = cloacal lumen, E = glandular epithelium, SE = surface epithelium, L = glandular lumen

Fig. 15 Sections of cloacal glands of Japanese quail embryo treated with corn oil (control), 300 μg of testosterone propionate (TP) or 75 μg cyproterone acetate and testosterone propionate (CA + TP)



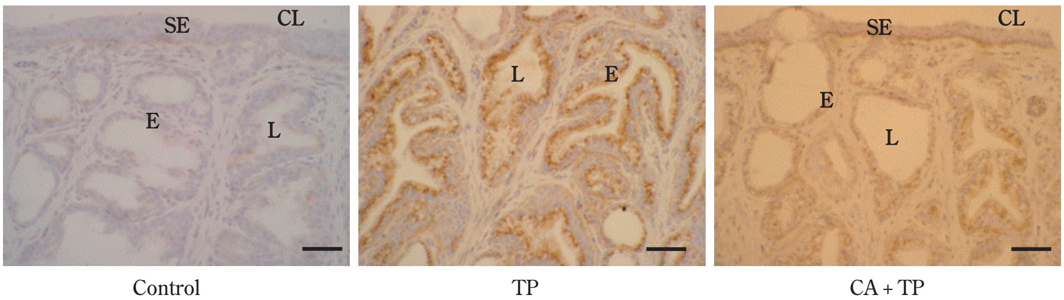
Values are mean ± SD (n = 10) of the ratio (%) of the number of developing glandular units to the total number of glandular units.
** : Significantly different from control (P < 0.01)
: Significantly different from TP group (P < 0.01)

Fig. 16 Effects on corn oil (control), 300 μg of testosterone propionate (TP) or 75 μg cyproterone acetate and testosterone propionate (CA + TP) on the development of the cloacal gland in Japanese quail embryo



Values are mean ± SD (n = 8) of the ratio (%) of the VVA lectin-positive area in the unit square of the cloacal gland.
** : Significantly different from control (P < 0.01)
: Significantly different from TP group (P < 0.01)

Fig. 18 Effects on corn oil (control), 300 μg of testosterone propionate (TP) or 75 μg cyproterone acetate and testosterone propionate (CA + TP) on the appearance of VVA lectin-positive substances in the cloacal glandular cells in Japanese quail embryo



Scale bars = 30 μm.
CL = cloacal lumen, E = glandular epithelium, SE = surface epithelium, L = glandular lumen

Fig. 17 Sections of cloacal glands of Japanese quail embryo treated with corn oil (control), 300 μg of testosterone propionate (TP) or 75 μg cyproterone acetate and testosterone propionate (CA + TP) stained by *Vicia villosa* (VVA) lectin

今後の展望

農薬の陸域生態系に対する影響評価は複雑かつ難解であり、詳細な生態影響評価が実施されている欧米規制当局に於いてでさえ科学の進歩に伴い大幅な改善が日々行われている。OECDテストガイドラインも生態影響試験は30手法に及び、現在もラボ標準試験の新たな試験種や試験法が検討されている。一方、国内の農薬規制に於いては、欧米を参考に毒性指標と曝露レベルとを比較するリスクベースの評価を陸域生態系評価に導入する動きがある[44),45)]。欧米における評価手法がその地域での生態系に立脚したものである事をよく理解し、科学的評価手法の適切な解釈と日本固有の生態系を反映した現実的な影響評価シナリオの構築が望まれる。

そのような状況の中、陸域生態影響評価の分野に於いて、世界的な関心の高まりからミツバチに対する影響のリスク評価は益々重要になっている。ミツバチの毒性発現の詳細な解析と共に、ミツバチが曝露されうる様々なルートや期間、濃度などを考慮し、最新の関連知見や規制当局の評価なども常に把握・駆使した総合的な影響評価が必要になってくる。また、規制動向を踏まえると、これまで陸域環境生物の指標種としてあげられなかった両生類、中でもカエルを用いた影響評価が重要になっており、その試験系の構築も今後の検討課題である。

新たな取り組みの一例として紹介した鳥類胚を用いた簡易評価系なども含めて、今後より一層のノウハウおよび技術の集積に努め、これらを駆使する事で、当社農薬の生態系への安全性を確認し、より環境にやさしい農薬の開発を行っていきたい。

謝辞

鳥類胚を用いたED作用簡易評価系の構築に当たって、終始ご懇篤なるご指導を賜った広島大学大学院・生物圏科学研究科/吉村 幸則 教授に深く感謝の意を表します。

引用文献

1) 宮本 貢, 田中 仁詞, 片木 敏行, 住友化学, **2008-I**, 26 (2008).
2) 内海 透, 日本農薬学会誌, **35**, 52 (2010).
3) 生物多様性条約（平成5年12月21日発行）: (http://www.biodic.go.jp/biolaw/jo_hon.html).
4) 河村 武, 岩城 英夫 編, “環境科学 自然環境系”, 初版, 朝倉書店 (1990).
5) 環境省, “図で見る環境白書”, (http://www.env.go.jp/policy/hakusyo/zu/h22/index.html#index).
6) M. Begon, J. L. Harper and C. R. Townsend, “生態学 個体・個体群・群集の科学”, (堀 道雄 監訳), 京都大学学術出版会 (2003).
7) 内田 亨, “谷津・内田 動物分類名辞典”, 中山書店 (1988).
8) European Commission: Commission Directive 96/12/EC of 8 March 1996 amending Council Directive 91/414/EEC (1996).
9) European Commission: Working Document Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC, SANCO/10329/2002 rev.2 (final) (2002).
10) European Food Safety Authority: Guidance Document on Risk Assessment for Birds and Mammals on request from EFSA, EFSA Journal 2009; 7 (12) : 1438 (2009).
11) U.S. Environmental Protection Agency, Federal Register, Vol. 72, No. 207 (2007).
12) U.S. Environmental Protection Agency, Code of Federal Regulations, 40 Part 158 (2008).
13) 農林水産省農産園芸局長, “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, 一部改正平成19年4月2日18消安第14851号）” (2007).
14) J. V. Tarazona and M. M. Vega, *Toxicol.*, **181–182**, 187 (2002).
15) European Commission: Council Directive 97/57/EC of 22 September 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC (1997).
16) UK Health and Safety Executive: Bird bible, (http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web_Assets/PSD/registration_guides/Birdbible.pdf).
17) UK Health and Safety Executive: Mammal bible, (http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web_Assets/PSD/registration_guides/MammBible.pdf).
18) M. P. Candolfi, K. L. Barrett, P. J. Campbell, R. Forster, N. Grandy, M. C. Huet, G. Lewis, P. A. Oomen, R. Schmuck and H. Vogt: “Guidance Document on Regulatory Testing and Risk Assessment Procedures for Plant Protection Products with Non-Target Arthropods”, ESCORT2 workshop (2000).
19) U.S. Environmental Protection Agency, “Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure Ecological Risk Assessment, EPA 540/9-85-001” (1986).
20) U.S. Environmental Protection Agency, “Pesticide Reregistration Rejection Rate Analysis Ecological Effect, EPA 738-R-94-035” (1994).

21) U.S. Environmental Protection Agency, "Ecological Risk Assessment: Technical Overview", (http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/), Last updated on Friday, March 7th (2008).
22) U.S. Environmental Protection Agency, "ECOFRAM Terrestrial Draft Report", (http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/terrreport.pdf) (1999).
23) 農林水産省生産局生産資材課長, "「農薬の登録申請に係る試験成績について」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, 一部改正平成19年4月2日18消安第14852号)" (2007).
24) F.M.W. de Jong, F.M. Bakker, K. Brown, C.J.T.J. Jilesen, C.J.A.M.Posthuma-Doodeman, C.E. Smit, J.J.M. van der Steen, G.M.A. van Eekelen, "Guidance for summarising and evaluating field studies with non-target arthropods, A guidance document of the Dutch Platform for the Assessment of Higher Tier Studies" (http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601712006.pdf) (2010).
25) International Commission for Plant-Bee Relationships (ICPBR), (http://www.eppo.org/PPPRODUCTS/honeybees/honeybees.htm).
26) European Food Safety Authority: "Scientific report of EFSA on the PPR Stakeholder Workshop Improved Realism in Soil Risk Assessment (IRIS) – How will pesticide risk assessment in soil be tackled tomorrow ?", The EFSA Scientific Report, 2009, 338: 1-32 (2009).
27) European Food Safety Authority: "Report on the PPR stakeholder workshop Protection goals for environmental risk assessment of pesticide: What and where to protect ?", The EFSA Journal 2010; 8 (7): 1672, (http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/1672.pdf) (2010).
28) European Food Safety Authority: "Opinion of the Scientific Panel on Plant protection products and their residues (PPR) related to the revision of Annexes II and III to Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market - Ecotoxicological studies", The EFSA Journal, 461, pp. 1-44, (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620770071.htm), (2007).
29) U.S. Environmental Protection Agency, Federal Register. Vol. 74, No. 71, (2009).
30) OECD, Detailed review paper for avian two-generation toxicity test, OECD Series on Testing Assessment (2006).
31) European Union: Regulation (EC) No.1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC (2009).
32) 波多腰 信, 岸田 博, 川田 均, 大内 晴, 磯部 直彦, 萩野 哲, 住友化学, **1997-I**, 4 (1997).
33) トーマス.D.シーリー (長野 敬・松香 光夫 訳), "ミツバチの知恵", 青土社 (1998).
34) T.D.スィーレイ (大谷 剛 訳), "ミツバチの生態学", 文一総合出版 (1989).
35) K.V.フリッシュ (桑原 万寿太郎 訳), "ミツバチの生活から", 筑摩書房 (1975).
36) 坂上 昭一, "ミツバチの世界", 岩波書店 (1983).
37) EPPO, "Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products PP1/170(3): Side-effects on honeybees; EPPO Standards (updated with ICPBR-recommendations)", 19 (2000).
38) P. A. Oomen, A. De Ruijter, J. Van Der Steen, "Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides", Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **22**, 613 (1992).
39) Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Bundesrepublik Deutschland (BBA), "Guidelines for testing pesticides in registration procedures Part VI 23-1, EFFECTS OF PLANT PESTICIDES ON HONEY BEE" (1991).
40) 青木 淳一, "土壌動物学 –分類・生態・環境との関係を中心に–", 北隆館 (1973).
41) J. Römbke, F. Heimbach, S. Hoy, C. Kula, J. Scott-Fordsmand, P. Sousa, G. Stephenson G., J. Weeks, "Effects of Plant Protection Products on Functional Endpoints in Soil", EPFES workshop, Lisbon, April 2002 (2002).
42) T. Utsumi, and Y. Yoshimura, *Poult. Sci.*, **88**, 1052 (2009).
43) T. Utsumi, and Y. Yoshimura, *Poult. Sci.*, **90**, 168 (2011).
44) 環境省, "21世紀環境立国戦略 (平成19年6月1日)", (http://www.env.go.jp/guide/info/21c_ens/21c_strategy_070601.pdf).
45) 環境省, "平成20年度環境省予算(案)主要新規事業等の概要—農薬による陸域生態リスク評価手法確立調査", (http://www.env.go.jp/guide/budget/h20/h20-gaiyo-2/124.pdf).

PROFILE

内海　透
Toru U*TSUMI*

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員　農学博士
（現職：国際アグロ事業部）

片木　敏行
Toshiyuki K*ATAGI*

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
上席研究員　グループマネージャー
理学博士

宮本　貢
Mitsugu M*IYAMOTO*

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員