# ユスリカ幼虫を用いた生態影響試験について

住化テクノサービス株式会社 環境科学センター 環境生態部

> 原 立 花 明 子 萩 野 哲







## はじめに

化学物質が環境生物に及ぼす影響を調べる試験を 生態影響試験と呼んでいる。化学物質のうち野外で 使用されるもの、例えば農薬では流亡、溶脱等によ り、最終的に水系に入ることが予想されるため、水 中の生物の食物連鎖を踏まえた魚類、甲殻類および 藻類を対象としたいわゆる3点セット試験が主要な試 験となっている。しかし、化学物質に対する生物の 感受性が種間で大きく異なる場合があり、3生物のみ では影響評価が不十分との考えから、次の段階とし て様々な生物群の評価手法の整備がすすめられた。 水系の底質に生息する生物(底生生物)の試験も対 象とされたことから、OECD(経済協力開発機構) はユスリカを供試生物とした急性試験、および被験 物質を底質または上層水に施用する羽化試験につい てのガイドラインを作成している1)-3)。わが国でも、 OECD同様の急性試験ガイドラインが作成されてお り4)、新たに登録申請する殺虫剤および登録済みの一 部の農薬については、上記のガイドラインによる試 験データの提出を要求されることとなった。

住化テクノサービス株式会社ではこれらの試験を 2002年度の環境省リングテストに参画して以来、 GLP対象でも実施した経験があるので、それらの試 験について解説する。

### ユスリカとは

ユスリカはハエ目ユスリカ科に属する昆虫であり、日本産の種は2,000種ともいわれている<sup>5)</sup>。様々な環境に対応した水系環境の類型化や汚染の指標生物として、また魚類等の餌料生物として、更には大量に羽化した成虫の不快害虫としての一面もある、底生生物の主要な一群として位置づけられている。その生活環は、成虫のみ陸生であり、卵、幼虫および蛹は水生である。卵はゼラチン状の保護物質に包まれ

た卵塊として水中に産出され、数日後に孵化した幼 虫は1~4齢までの4齢期を経て蛹となる。蛹は自ら遊 泳して水面に達し、羽化して成虫となる。この幼虫 期が底生生物に相当する。前述の試験ガイドライン ではChironomus属のC. riparius (ドブユスリカ)、 C. tentansおよびC. yoshimatsui (セスジユスリカ) などが挙げられている。セスジユスリカの場合、約 500卵を含む、長さ約2~3 cmの卵塊を水中に産出し、 その一端は水面から約5 mm上部の基質に固着され る。卵は2~4日で孵化し、1齢幼虫が水中に遊出す る。最初は正の走光性がありアルファ状の遊泳を行 うが、やがて負の走光性に転じて着底し、底生生活 を開始する。蛹化までの期間は水温や餌条件によっ て左右されるが、通常2~4週間程度であり、メスの 方がオスよりやや長い。蛹の期間は2日程度であり、 蛹殻の中に成虫の体ができると、自ら遊泳、あるいは 蛹内部に発生したガスによって水面に達する。蛹には 背中に呼吸器官と呼ばれる1対の構造があり、これら が表面張力により水面に展開して水と空気の結界と なる。その後、蛹の背中が割れ、虫体が真上に伸び、 成虫が飛翔する。一連の羽化は数十秒で完了する。 成虫の寿命は短く、数日である。オスはいわゆる蚊 柱を形成し、そこにメスが飛び込んで交尾が行われ る。以上の生活環をFig. 1に示す。ユスリカは蚊に似 た形態をしているが、蚊のように刺すことはなく、 英語でもあえてnon-biting midgeと呼ばれている。

## ユスリカを用いた試験法の概要

## 1. ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験

以下に、セスジユスリカを用いた場合を例に試験 法の概要を記す。

ユスリカ急性遊泳阻害試験はOECDガイドライン 235「ユスリカ属、急性遊泳阻害試験」<sup>1)</sup>に基づいてお り、元々ミジンコ遊泳阻害試験<sup>6)</sup>を参考に作成されて

住友化学 2018 77

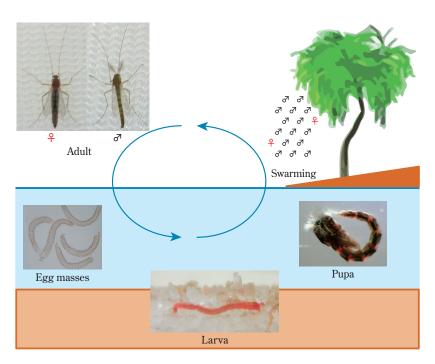


Fig. 1 Life cycle of *Chironomus yoshimatsui* 

いるため、試験系もよく似ている(Fig. 2)。わが国 の農水省ガイドライン2-7-6「ユスリカ幼虫急性遊泳 阻害試験」4はOECDガイドライン1のほぼ翻訳版であ る。暴露期間は48時間でミジンコと同様であるが、 ミジンコでは産出24時間以内の幼体から暴露を開始 するのに対し、ユスリカでは孵化後数日の1齢幼虫が 使用される。ガイドラインでは産卵直後から4~5日 で試験に使用することになっており、卵は25℃では ほぼ2日で孵化するので、1齢幼虫になってから既に2 ~3日を経過している。1齢幼虫か否かは、頭幅を確 認して判断する。1齢の場合は頭幅100 μm程度で、2 齢(170 µm)の半分程度であり、2齢になると胸部、 腹部の幅とほぼ同じになるので、比較的低倍率での 観察でも判断が容易である (Fig. 3)。頭のようなキ チン質が硬化した部分は脱皮により急激にサイズを 増すが、胸部、腹部のような柔らかい部分は脱皮に よってもそれほどサイズを増さないことから、体長 は齢の判断には使用できない。幼虫は卵塊毎に飼育 し、孵化直後より給餌を開始する。暴露開始にあ たって、ピペットによる軽い水流刺激で威勢よく遊 泳する個体を使用する。2齢幼虫が発生し始めている 群は使用しない。

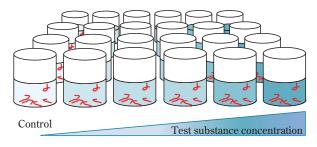


Fig. 2 Summarized diagram of acute immobilisation test using Chironomid larvae

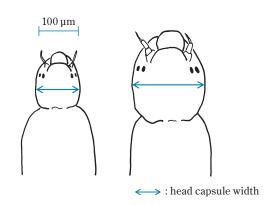


Fig. 3 Identification of 1st and 2nd instar larvae of *Chironomus yoshimatsui* left: 1st instar; right: 2nd instar

78 住友化学 2018

試験系は、ガイドラインによると止水式、半止水式または連続流水式とされているが、体長1 mmもない細長い虫を使用する試験で、連続流水式は現実的ではないと思われる。標準的には試験区毎に20個体を4連に分けて実施するのも、ミジンコ試験同様である。水温は23~25℃、照明時間は16時間が望ましく、暴露中は給餌しない。

ユスリカの影響指標は「遊泳阻害率」であり、こ れもミジンコと同じで、ピペットによる緩やかな水 流や試験容器を軽く振とうするなどの物理的な刺激 に対し、「遊泳やほふくなど自発的な運動によって15 秒間位置を変えない場合」を「遊泳阻害」と判定す る。そして、各濃度における遊泳阻害率から半数遊 泳阻害濃度(EC50値)を算定する。ミジンコの場合 は水中を遊泳しているのが常態であり、肉眼的にも 観察が容易であるが、ユスリカの場合は実体顕微鏡 が必須である。ここで、「遊泳阻害」とは英語の 「immobilisation」を意訳した用語であり、直訳すれ ば「不動」となるが、最初に普及したミジンコ試験 の症状の翻訳に引きずられて、ユスリカの場合も 「遊泳阻害」とされている。本来、試験に用いる齢期 は負の走光性に転じた後のため、底生生物に「遊泳 阻害」を使用するのは奇異である。同様に底生生物 として供試されるトビケラのガイドライン<sup>7)</sup>では正し く「不動」の訳語が使用されている。

試験の妥当性基準としては下記の2項目が挙げられている。

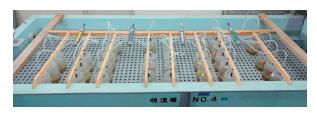
- ●暴露終了時に対照区の遊泳阻害率が15%を超えないこと
- 暴露期間中の溶存酸素濃度 (DO) が3 mg/Lを下 回らないこと

## 2. 水一底質系のユスリカ羽化試験

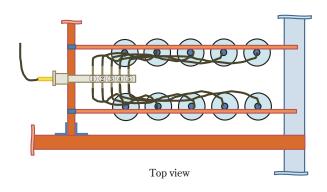
OECDガイドライン218「底質添加による水-底質系ユスリカ毒性試験」<sup>2)</sup>と219「水添加による水-底質系ユスリカ毒性試験」<sup>3)</sup>とがある。どちらの試験も、タイトルに示されているように底質と上層水を備える系で構成されている。上層水の制約は特にないが、底質はミミズの試験に用いる人工土壌とほぼ同一の成分で、細破された4~5%の微粉末状ピート、20%のカオリン粘土、および75~76%の石英砂の混合物(いずれも乾燥重量として)であり、炭酸カルシウムでpHを7.0±0.5に調整する。実際の調製に当たっては、

まずはピートの処理のみで3日を要すること、次に別の成分を混合し、これを試験容器に入れた後、底質が舞い上がらないよう水を加え、更に2日以上試験系の状態を安定化するため調整するなど、暴露開始までに(結構な)準備期間を要する。給餌については、都度行う場合と一括の場合がある。一括給餌は分配係数log Kowが5より大きい被験物質の場合に採用し、底質の調製時に必要量の餌を練り込む。一括給餌の場合は植物の乾燥粉末等を用いるが、ガイドラインで規定された量では十分な羽化が見られない場合があり、試験の妥当性を満たすために十分かつ適切な量にアレンジする必要がある。

試験系をFig. 4に示す。エアレーションはガイドライン上、通気管の位置が底質から3~4 cm、勢いが「1~数個の泡/秒」と、大変微妙な調整が必要となっ



Bird's-eye view



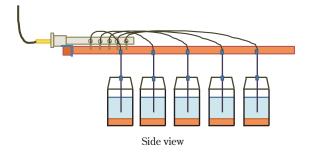


Fig. 4 Test equipment and schematic diagram of sediment-water chironomid toxicity test

住友化学 2018 79

ているので、各試験区各連でこれを均一化するよう 工夫している。通気管は試験容器に被せた蓋の中央 から通しており、蓋に取り付けたストッパーによっ てその位置を固定する。

暴露開始時の幼虫の選択法は急性遊泳阻害試験と同じである。試験容器への幼虫導入後1日間、エアレーションを止めて幼虫の着底を促す。暴露中の個々の幼虫の症状観察は、正常な場合はほとんど不可能である。ただし、幼虫が活発に活動していれば試験液が濁るため、試験系の外観において影響のある区とない区で差が生じることがあり、注意して観察する必要がある。

ユスリカの羽化は早ければ暴露12日後あたりから始まるので、各試験容器の観察時に羽化個体を発見した場合は、試験容器と蓋の隙間から、逃亡しないように注意して吸虫管で回収する(Fig. 5)。全個体を回収後、蓋をはずして通常は水面に浮いている蛹の殻を回収する。回収した成虫と蛹殻の両方から羽化数を確認できる。雌雄の判別は、触角の形状を観察するのが最も簡単である(Fig. 6)。すなわち、オ





Fig. 5 Pooter and emerged adult midges collected

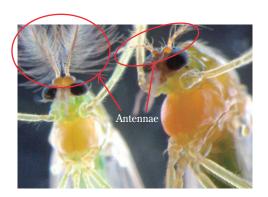


Fig. 6 Adult stage of *Chironomus yoshimatsui* left: male, right: female

スでは触角の各節に長い毛が生えて全体として羽毛 状であるのに対し、メスでは毛の長さが短く数も少ない。

暴露期間は最長28日であり、少なくとも対照区の 羽化はそれまでに終息する。影響指標は「羽化個体 数」および「development rate(発生率、変態速度な どと翻訳される)」であり、いずれも雌雄毎に集計・ 算出する。もし雌雄間で感受性差が見られた場合は、 個別の影響評価が必要である。

試験の妥当性基準は下記の4項目である。

- ●対照区の羽化率≥70%(試験終了時)
- ●対照区の羽化がユスリカ収容後12~23日に起こること
- ■試験終了時に各試験容器のpHおよびDOを測定すること。全容器でDO>飽和の60%、pHは6~9であること
- ●水温は±1.0℃以上変動しないこと

## ユスリカ継代飼育の試み

ユスリカ試験の供試生物については、その使用頻度が極めて低かったことから、ある程度の自家繁殖の試みを実施したものの、当初は主に国立研究開発法人国立環境研究所からの分譲に頼っていた。しかし、輸送中の温度条件や所要時間に起因すると思われる供試生物の質の問題もあり、試験の頻度が高くなるとともに、効率の良い自家繁殖の手法の検討を行い、現在では全て自家繁殖生物を使用している。現在、当社で使用している自家繁殖装置はFig. 7のとおりで、交尾に必要な空間の確保、交尾を誘導する



Fig. 7 Multi-generation rearing system for *Chironomus yoshimatsui* 

80 住友化学 2018

光条件、産卵基質、適切な密度を維持するための系 の更新等が工夫されている。

## 今後の展開

農薬等、化学物質の環境に対する影響評価はますます厳しくなっており、試験を高精度で実施できる試験機関が求められている。ユスリカに限らず、特殊あるいは長期の試験法に対応する必要のある局面が増加しているので、住化テクノサービス株式会社はお客様の要請に対して質の高い試験を実施することにより、期待に応えて行きたいと考えている。

#### 引用文献

- 1) OECD, "Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS" (2011).
- 2) OECD, "Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS" (2004).

- OECD, "Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water, OECD GUIDE-LINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS" (2004).
- 4) 農林水産省,"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),別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」",「ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験(2-7-6)」.
- 5) 日本ユスリカ研究会編, "図説 日本のユスリカ", 文 一総合出版 (2010).
- 6) OECD, "Test No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS" (2004).
- 7) (独) 農業環境技術研究所, "コガタシマトビケラ1齢 幼虫を用いた農薬の急性毒性試験法マニュアル バージョン1.0" (2008).

住友化学 2018 81