

河川における汚染化学物質の生態系リスク評価に関する研究

- 1章 はじめに
- 2章 絶滅リスク推定の理論的背景
- 3章 ミジンコによる生命表評価試験
- 4章 生命表毒性データのメタ解析
- 5章 絶滅リスク評価
- 6章 不確実性解析
- 7章 内分泌搅乱物質の生態毒性
- 8章 考察とまとめ
- 引用文献

横浜国立大学 環境科学研究センター
・科学技術振興事業団

田中嘉成

横浜国立大学 環境科学研究センター

東海明宏
中西準子
浦野紘平

1章 はじめに

環境汚染が生態系を搅乱している効果を予測することは、有害化学物質の適切な管理に欠かせないことがある (Bartell et al. 1992)。本研究では、有害化学物質の河川などの水系生態系への影響を生態学的な方法で解析する理論的手法を研究した。さらに、水系生態系にとって重要な水棲生物であるミジンコ (*Daphnia galeata*) やメダカ (*Oryzias latipes*) に対する生態毒性実験を実施し、実証的なデータから生態リスクを推定する方法を考案した。生態系への効果をより有効に評価するためには、環境汚染物質の生物個体群への影響を推定する必要がある。そこで本研究では、従来の急性毒性試験ではなく、長期の慢性毒性試験を行い、個体群の増殖力（内的自然増加率）への効果を推定する試験法を採用した。

さらに、環境汚染物質による内的自然増加率の低下分から、個体群の絶滅リスクを推定する解析法を考案し、多くの生態毒性データに適用した (Tanaka and Nakanishi 2000)。個体群ひいては種の絶滅確率に基づく生態リスク評価は、絶滅危惧種のリスク評価の手法として保全生物学で定着しつつある。これらの解析方法は、河川環境の汚染のリスク推定にも応用できると考えられる。ここでは、本研究によって得られた絶滅リスク推定の解析的方法および生態毒性実験の結果を報告する。

2章 絶滅リスク推定の理論的背景

生物集団の絶滅の原因是主に環境変動によるものと遺伝的要因によるものにわけられる。このうち環境変動による絶滅は、実際に野外で起こる絶滅の要因として最も重要で、生態リスクを考える上でも中心となる。個体群が何かの原因で非常に小さくなったりとき、個体群は潜在的な増殖力によって個体数を最大レベル（環境収容力 K ）に回復しようとする。その回復の様子を表す式をロジスティック方程式といい、次の微分方程式として与えられている。

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K}\right) \quad (1a)$$

個体数 N (t は時間) は、個体数が少ないときはおおむね内的自然増加率 r を指數とする指数関数的に増殖するが、個体数が K に近づくにつれて増殖率が低下し、結局個体数は K に収束する。自然界に生息している生物集団が上のロジスティック成長式の通りに増えるとしたら、集団や種の絶滅は起こらない。時間が経てば個体数は環境収容力に達し、そのままいつまでも変化しないからである。しかし実際には、ほとんどすべての生物種は変動する環境の中で生息している。気温や降水量も年次変動を示す。植食性の動物であれば、食物となる木の実や新芽にも大きな年次変動があるかもしれない。このように自然界では環境が良くなったり悪くなったりし、それが個体数の変動を引き起す。個体数の変動がある限り、個体群はある一定の絶滅確率を持つ。環境による変動を数学的に表すためには、物理学で白色ノイズと言われる変数 ε をロジスティック式に加えればよい。 ε は時間とともに 0 の周りをランダムに大きくなったり小さくなったりする誤差の変数である。

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K}\right) + \varepsilon \quad (1b)$$

上の式に基づく絶滅時間は、拡散方程式という熱伝導などを研究する物理学で使われる偏微分方程式として解かれている。解析解に関する理論生態学的研究は非常に多いが、共通した結果は比較的単純である。つまり、平均絶滅時間は内的自然増加率、環境収容力、環境変動の大きさによって決まる。絶滅時間は、内的自然増加率や環境収容力が大きいほど長くなり、環境変動が大きいほど短くなる (Lande 1993; Foley 1994)。

平均絶滅時間と生態学的なパラメータとの関係は、近似的に

$$T \propto K^{2r/v-1} \quad (2)$$

となることが知られている (Lande 1998; 表1参照)。有害化学物質による絶滅リスクは、内的自然増加率や環境収容力の減少による平均絶滅時間の減少分として評価することができる。

表1 曝露濃度－内的自然増加率曲線の数学的モデル

Model	Equations
Power function	$r(x) = \gamma \left[-\left(\frac{x}{\alpha}\right)^{\beta} + 1 \right]$
Weibull function	$r(x) = \gamma \left[-\exp\{(\alpha x)^{\beta}\} + 2 \right]$
Quadratic function	$r(x) = \gamma (1 - \alpha x - \beta x^2)$

3章 ミジンコによる生命表評価試験

有害化学物質の個体群レベル効果を評価するために、カブトミジンコ *D. galeata* を対象生物種として、生命表評価試験 (life table evaluation test) を実施した (Winner et al. 1977; Bertram and Hart 1979; Daniels and Allan 1981; Allan and Daniels 1982; Gentile et al. 1982, 1983; Van Leeuwen et al. 1985)。生態毒性を評価した対象物質は、ドデシルベンゼンスルホン酸 (LAS₁₂)、p-ノニルフェノール、ダイアジノン、フェニトロチオン、希硫酸である。

実験に供したミジンコは、神奈川県相模湖より 1997 年 8 月に採集した。採集した数十個体から 10 個体をランダムにサンプルし、同雌系統 (isofemale line) を作成し、経代維持した。実験に際しては、自然な変異性を再現するためにこれらの系統から何個体かを任意に選んで混合し、実験用系統を作成した。生存および繁殖の測定のためには、脱塩素水道水およびクロレラ (*Chlorella vulgaris*) を入れたガラス製容器 (200mL) に生後 24 時間以内の仔虫を移し、週 3 回ガラス容器ごと換水しながら約 3 週間飼育した。試験個体が成熟後生んだ後代は計数した後取り除いた。このような実験区を、対象試験および各濃度に原則として 2 つずつ設置した。

化学物質は標準溶液を実験開始前に作成しておき、換水の際に設定濃度となる定量を飼育水に添加した。

生命表評価実験は、定濃度曝露条件下で生命表データ、すなわち齢別の生存率と繁殖（産仔数）を測定する。これらのデータから、齢構成および個体数が変化していない定常的な個体群の内的自然増加率 r をオイラー・ロトカ方程式 ($\sum_t l_t m_t e^{-rt} = 1$ t は齢、 l_t 、 m_t は齢別生存率および産仔数) によって算出した。推定された内的自然増加率と曝露濃度の関数関係は、次のべき関数モデルによって近似した (田中・中西 1998; Tanaka and Nakanishi 2000)。

$$r(x) = r_{\max} [1 - (x/\alpha)^{\beta}] \quad (3)$$

ここで、 x は曝露濃度、 r_{\max} は無曝露における最大内的自然増加率、 α および β はモデルのパラメータである (田中・中西 1998 参照)。データのべき関数モデルへの当てはめは、最小 χ^2 適合法 (Levenberg-Marquardt アルゴリズム、Press et al. 1992) によって行った。測定された内的自然増加率の反応データを、図 1 から図 5 に示す。

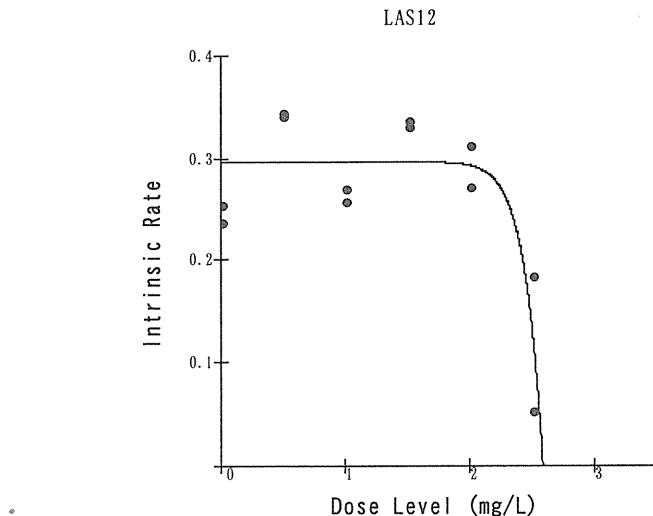


図 1 *D. galeata* における LAS₁₂ 曝露に対する内的自然増加率の反応

LAS12 に対する内的自然増加率の反応は非線形性が高く、 β 値は 17.2 と推定された (β 値は 1 のとき反応は線形となる)。内的自然増加率が 0 となる α 値は 2.6 mg/L と推定され、ミジンコ類で推定されている LAS12 の急性毒性値と一致していた (Tanaka and Nakanishi 投稿中 a)。

p-ノニルフェノールは内分泌搅乱効果が指摘されており、枝角亜目などの甲殻類に対しては、エクジステロイドを搅乱することによって個体発生に異常をもたらすという報告がある (Baldwin et al. 1995)。そこで、本研究は個体発生の効果を検定するために 2 世代にわたる連続曝露をおこない、生命表データを 2 世代間で比較した (図 2; Tanaka and Nakanishi 投稿中 b)。その結果、2 世代目では生活史に対する毒性効果が低下するという予想に反する結果が得られた。この結果をもたらした要因はいくつかが考えられる。2 世代目の個体は 1 世代目で生存と繁殖に成功した個体の後代なので、耐性の高い個体が選択され、遺伝的な耐性の変化によって 2 世代目には耐性が強くなった可能性がある。また、1 世代目の個体が産んだ仔虫には誕生直後もしくは発生過程で死亡したと考えられる個体が多く観察され、生理的に耐性の弱い個体は初期死亡の

段階で除かれた可能性がある。2世代目の生命表データはこれらの初期死亡は考慮されていないので、データ解析の見かけ上、リサージェント効果が観察されたと考えられる。これらの、p-ノニルフェノールで特異的に観察された発生過程における死亡（初期死亡）と内分泌搅乱効果との因果関係は明らかでない。

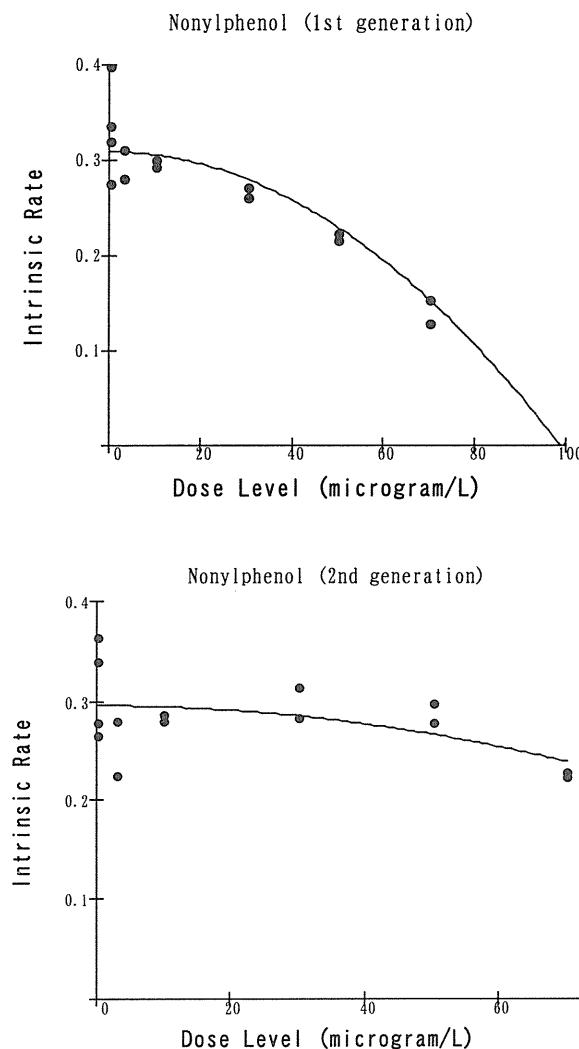


図2 *D. galeata* におけるp-ノニルフェノール曝露に対する内的自然増加率の反応
(1世代目：上，2世代目：下)

日本の土壤はバッファー効果が高いため、湖沼の酸性化はヨーロッパに比べて軽度である。ただし、降雨の酸化は進んでおり、将来、湖沼の酸化が危惧される。酸ストレスの個体群レベルへの影響を推定するためには、希硫酸の生命表評価試験を行った（図3； Tanaka and Nakanishi 投稿中c）。

内的自然増加率の反応は、希硫酸濃度に対してとともに、実測した水素イオン濃度（pH）の減少分に対してもプロットした。飼育水の水素イオン濃度は、日によって変動が大きく、実験的に制御することが困難だったので、換水の際に毎回測定し、その平均値を指標として用いた。内的自然増加率は希硫酸の濃度に対しては非線形に低下し、10mg/Lを超えると急に増加率が低下した（ $\alpha=12.5$, $\beta=7.3$ ）。一方、曝露濃度をpHのスケールに直すと、内的自然増加率の反応はほとんど線形となった（ $\alpha=3.0$, $\beta=1.2$ ）。希硫酸の濃度を対数目盛に変換しても内的自然増加率の反応は線形にならないので、pH値が水素イオン濃度の対数スケールで

あることはこの違いを説明できない。中間的な水素イオン濃度の設定が出来なかつたことと、水素イオン濃度の制御が不正確であったことから、明確な結論を下すことが出来ないが、希硫酸に対する反応が溶解している水素イオン濃度とより線形な関係にあったことは、毒性影響が水素イオンを介する酸ストレスによってもたらされたためと推察される。

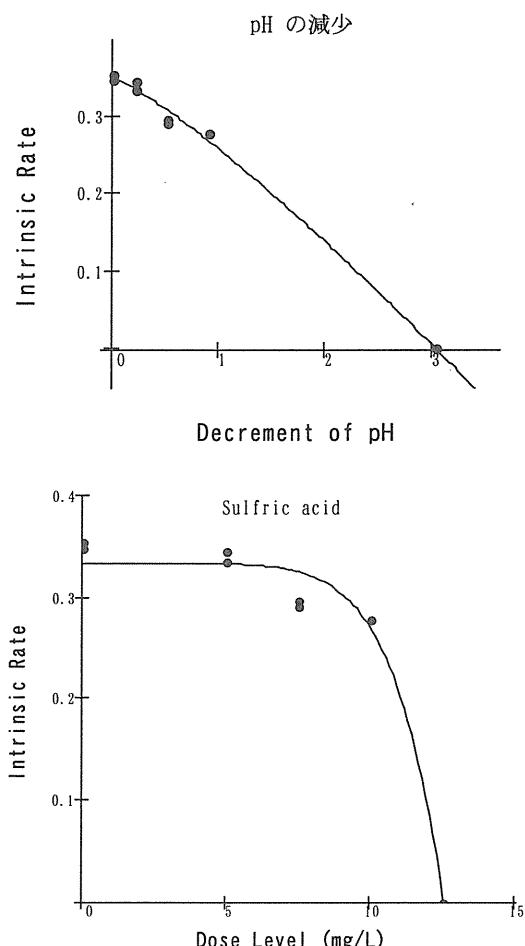


図3 *D. galeata* における酸ストレス（上）および希硫酸（下）の内的自然増加率に対する効果

ダイアジノンとフェニトロチオニンはどちらも代表的な殺虫剤でありながら、内的自然増加率に対する作用の様式には大きな違いがあることが示唆された（図4、5）。ダイアジノンの曝露に対する内的自然増加率の反応はきわめて非線形性が高く、ミジンコが繁殖を停止して内的自然増加率が0に減少する直前の1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 程度まで、有害反応は見られなかった（ $\alpha=1.5\ \mu\text{g}/\text{L}$, $\beta=28.0$ ）。このことは、ダイアジノンの毒性効果には閾値が存在し、閾値を越えた曝露濃度では急に慢性毒性を発揮することを示している。これとは対照的に、フェニトロチオニンには明確な作用閾値は存在せず、内的自然増加率の減少は比較的低濃度から観測された（ $\alpha=0.96\ \text{mg}/\text{L}$, $\beta=1.41$ ）。

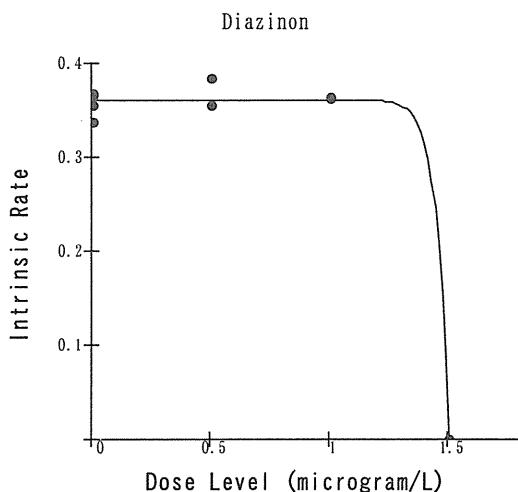


図4 *D. galeata* におけるダイアジノン曝露に対する内的自然増加率の反応

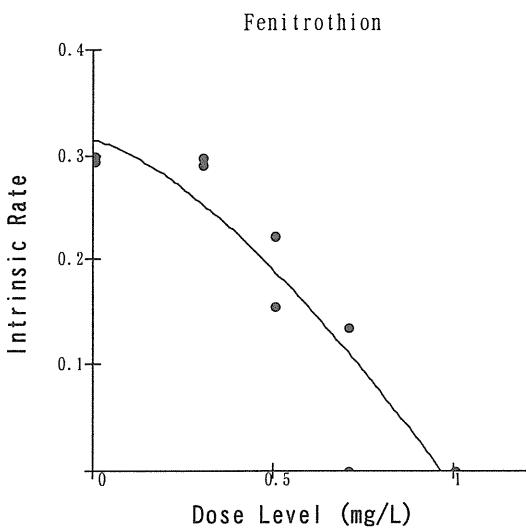


図5 *D. galeata* におけるフェニトロチオン曝露に対する内的自然増加率の反応

4章 生命表毒性データのメタ解析

内的自然増加率が環境汚染物質の曝露によってどう減少するかは、生物種や物質に依存する。しかし、そのような種特異性や物質特異性を無視したときに、内的自然増加率の反応をもっとうまく近似する数学的なモデルと、最適なパラメータ値を推定することは、包括的なリスク評価手法を発展させる上で重要であろう。本研究では、文献検索によって得られた生命表評価実験のデータをベースとして、最適な数学的モデルと、反応曲線の線形性に関するパラメータ値を推定した (Tanaka and Nakanishi 2001)。データ・ソースは付表に示してある。適合させた数学的モデルは、べき関数モデル、二次関数モデル、ワイブルモデルである。これらの関数を選択した理由は、内的自然増加率は負の無限小で定義され、曝露濃度に対して逆S字曲線を描かないからである。

各データセット（1化学物質に対して1試験生物種で行った生命表データのセット）に対して、3つの数学的モデルを最小 χ^2 適合法（least χ^2 fitting）によって最適なパラメータ値を決定した。さらに、モデル

がデータに適合している相対的な度合いを評価するために、次のモデル選択基準(model selection criterion, MSC)によってデータのモデルへの適合度を個々に計算した。MSCの値が高いほど、数学的モデルはデータに良く適合していることを示す。

$$MSC = \ln \left[\sum_{i=1}^n w_i (x_i - \bar{x})^2 \Big/ \sum_{i=1}^n w_i (\tilde{x}_i - \bar{x})^2 \right] - \frac{2p}{n} \quad (4)$$

ここで、 x_i はデータ、 \tilde{x}_i はモデルの予測値、 \bar{x} はデータの平均値、 w_i は重み、 p および n はそれぞれパラメータおよびデータの数である。

図6は、データセットごとに計算されたモデル選択基準(MSC)の頻度分布を3つの数学的モデルについてそれぞれ示してある。MSCの平均値と標準偏差はそれぞれ、べき関数モデルで 3.08 ± 2.28 、二次関数モデルで 2.58 ± 2.02 、ワイブルモデルで 2.97 ± 2.28 と推定され、べき関数モデルの値が他の2つより有意に高かった([べき関数]>[ワイブル]: $p<0.05$, [べき関数]>[二次関数]: $p<0.001$, [ワイブル]>[二次関数]: $p<0.05$, Wilcoxon検定)。

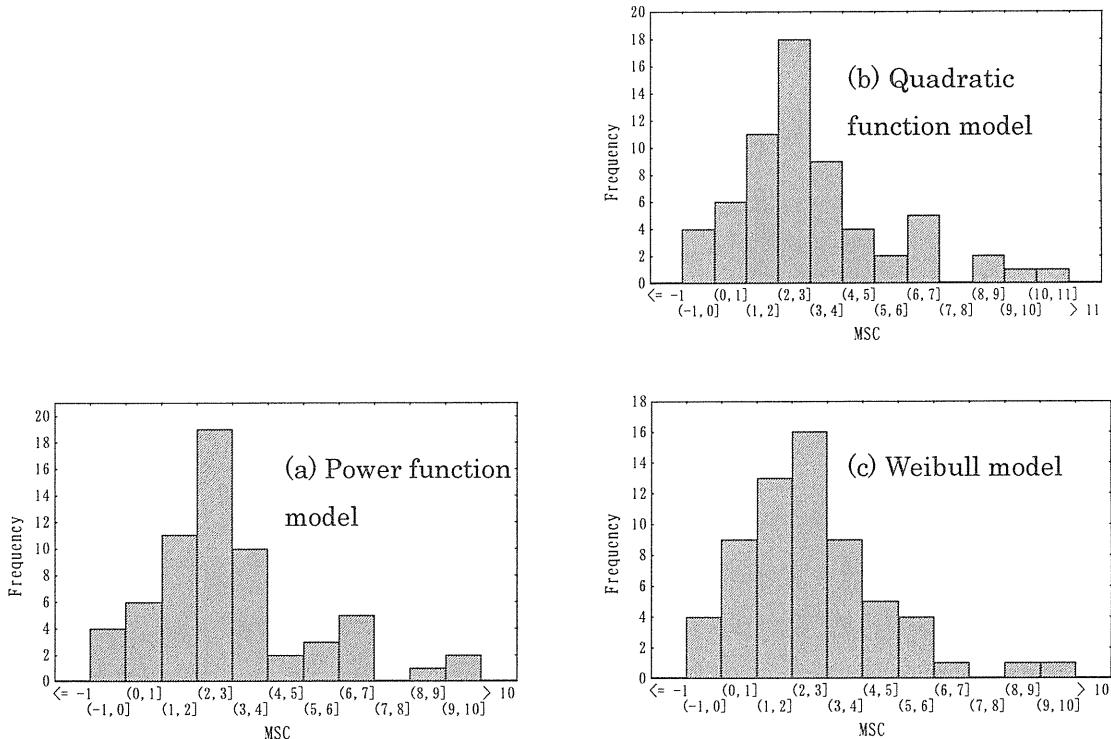


図6 各数学的モデルにおけるモデル選択基準(MSC)の頻度分布

最も適合度の高いべき関数モデルに関して、内的自然増加率の汚染物質曝露に対する反応の全般的な傾向を推定するために次の解析を行った。不確実なデータを除去するためにMSCが5未満、8より大きいデータセットを除去し、選択されたデータを変数変換によって最大内的自然増加率を1、 α 値を1に基準化した($z=x/\alpha$, $y=r(x)/r_{\max}$; z, y は基準化した反応および曝露濃度)。基準化されたデータセットを1つにフルし、べき関数モデルを最小 χ^2 法で適合させた。

その結果、反応の線形性を示すべき関数モデルの β 値は1.84と推定され(図7)、全般的には二次関数よりもやや線形性の高い反応を示した。

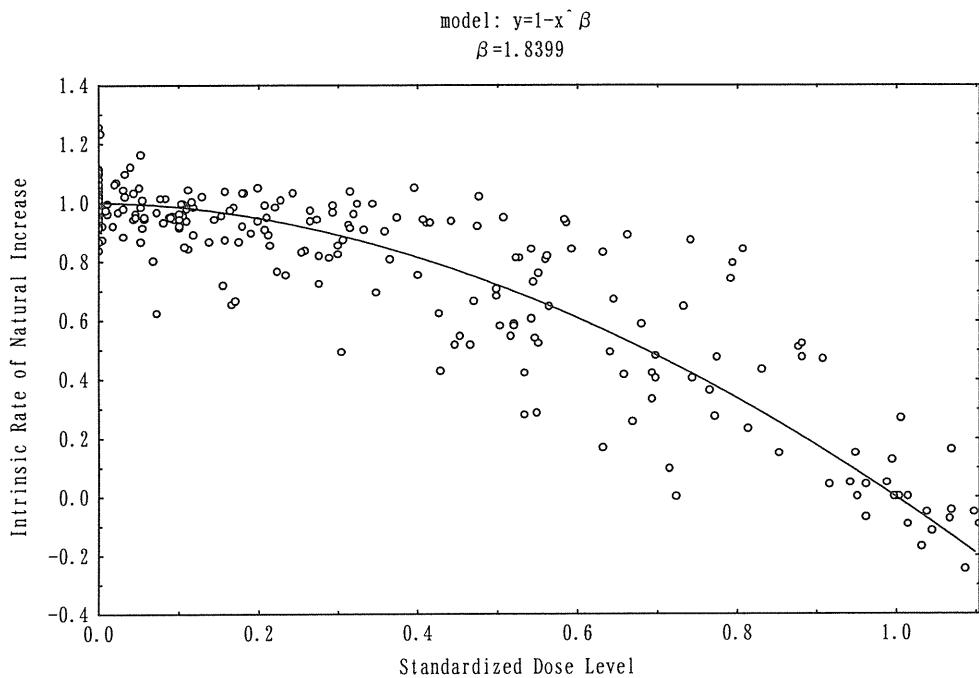


図 7 基準化した全データに対するべき関数モデルのあてはめ

また、別のデータ・ソースから急性毒性値 (LC_{50} 半数致死濃度) が推定されているデータセットを選択し、べき関数モデルの α 値の半数致死濃度に対する回帰式を推定した。このような回帰式は、生命表評価データがない場合に、内的自然増加率の反応を急性毒性値から外挿（急性-慢性外挿）することを可能にする。

図 8 は、 α 値の LC_{50} 値に対するプロットと回帰直線を両対数軸で示したものである。回帰モデル、 $[\alpha] = c[LC_{50}]^b$ に対して、 $b=0.843$ 、 $c=1.562$ と推定され、 α 値と LC_{50} 値は高い相関関係にあることから急性-慢性外挿がある程度可能であることが示唆された。

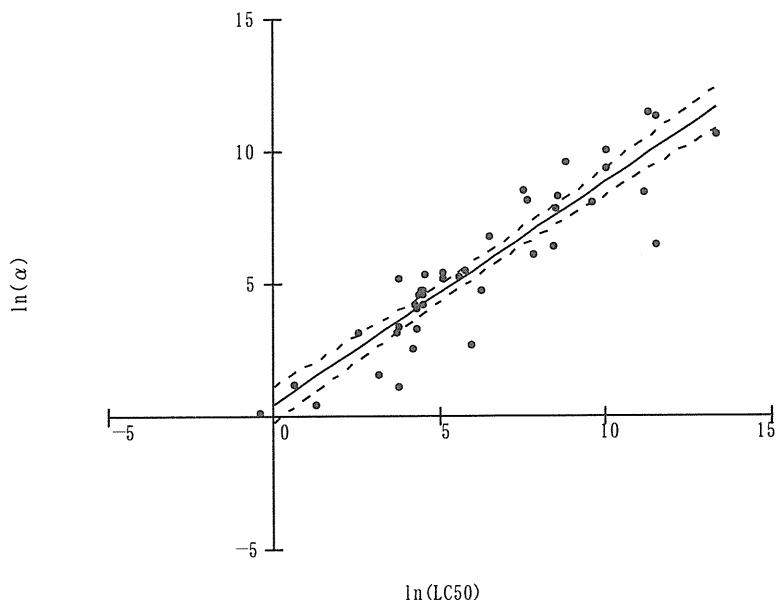


図 8 急性-慢性外挿による半数致死濃度 LC_{50} から α 値の推定

5章 絶滅リスク評価

個体数の変動が定常的であって、長期的な減少傾向になければ、絶滅確率（瞬間絶滅頻度）はどの時点でも一定で、近似的に平均絶滅時間の逆数となる。簡単な台数計算によって、絶滅確率を P と書くとき、環境汚染などのストレスによるその増加分 ΔP は

$$\Delta P = P_0 \left(10^{-\Delta \log T} - 1 \right) \quad (5)$$

となる。 P_0 はストレスのない定常状態における絶滅確率である。いわば、絶滅リスクのバックグラウンド値であり、ここでは絶滅確率の初期値と呼ぶことにする。内的自然増加率が 0 になったときの絶滅確率を 1、すなわち平均絶滅時間を 1 と仮定すると、絶滅確率の初期値は、

$$P_0 \cong 10^{-(r/v)\log K} \quad (6)$$

と定義できる。以下の絶滅リスクの計算には、この初期値を 10^{-6} と仮定した。その根拠は次の通りである。*Daphnia brachyurum* の霞ヶ浦における個体群動態の研究から、平均内的自然増加率は約 0.015、分散は約 0.03 と推定された (Hanazato and Yasuno 1985)。また、霞ヶ浦における調査から、*D. galeata* の個体密度は水深 10m にわたりおよそ 5 匹/L であり、霞ヶ浦の表面積は約 200km² なので、全容積における総個体数はおよそ 10^{13} と推定される。季節変動や霞ヶ浦が大型な湖であることを考慮して、 $K=10^{12}$ とおき、これらのパラメータを上式に代入すると $P_0=10^{-6}$ と推定される。

α 値を 10、 β 値を 1.84 と仮定したときの曝露濃度-絶滅リスク曲線を図 9 に示す。点線は毒性データの標本誤差に基づく 95% 信頼区間の上限値である。

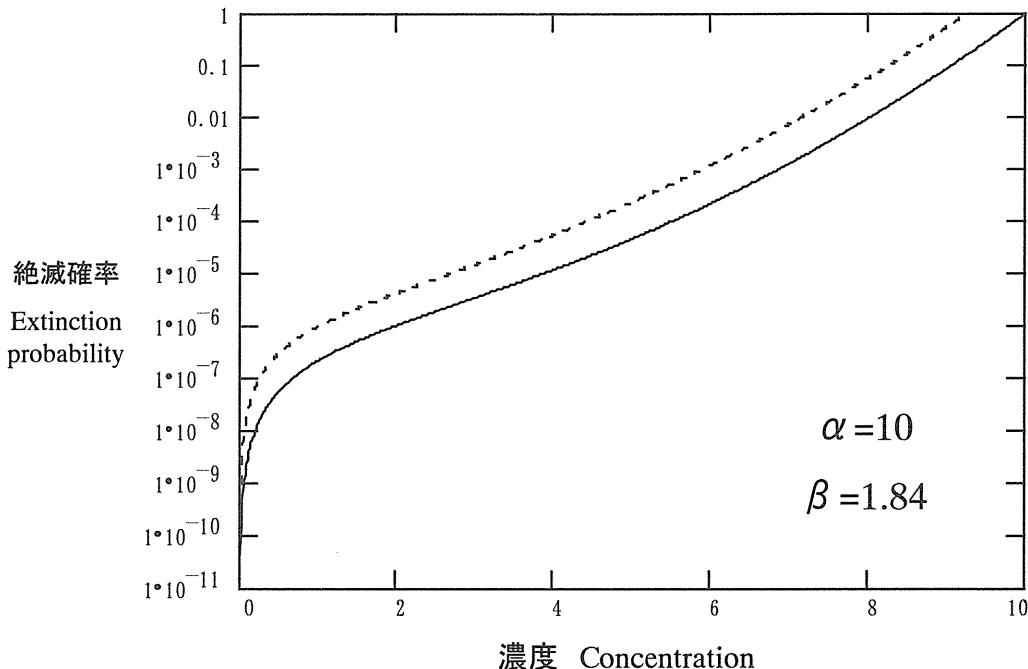


図 9 化学物質曝露濃度と絶滅確率との関係

いくつかの代表的な有害化学物質で報告されているミジンコ (*Daphnia* 属) 急性毒性値と環境中濃度のデータから試算した絶滅リスクを表 2 に列記した。内的自然増加率は、前記の急性-慢性毒性の回帰式から求めた α 値と $\beta = 1.84$ から計算した。環境中曝露濃度は実測最大濃度濃度の 50% 濃度を使用した。絶滅リスクの大きさの順位は、従来生態リスク評価に用いられてきた生態リスク指數 (EHQ) と変わらない。

表 2 代表的な有害化学物質の *Daphnia* 属に対する絶滅リスク評価の算出例

Table 2 Examples of extinction risk estimations of several important pollutant chemicals to *Daphnia* populations

化学物質	chemicals	MEEC	EEC	LC50	Δp	Δp^*	EHQ
LAS	LAS	3000	1500	5700	4.00×10^{-4}	5.60×10^{-3}	26.3
ピリダフェンチオン	pyridaphenthion	12	6	38	7.35×10^{-7}	3.75×10^{-6}	15.8
マラソン	malathion	4.5	2.24	13	5.91×10^{-7}	3.03×10^{-6}	17.2
ダイアジノン	diazinon	2	1	7.8	2.58×10^{-7}	1.34×10^{-6}	12.8
ノニルフェノール	nonylphenol	7.1	3.5	75	7.59×10^{-8}	4.13×10^{-7}	4.67
フェノカルブ	fenocarb	12	6	320	2.09×10^{-8}	1.30×10^{-7}	1.88
フェニトロチオン	fenitrothion	0.2	0.1	9.2	2.58×10^{-9}	1.99×10^{-8}	1.09
ベンチオカーブ	benthiocarb	7	3.5	750	2.04×10^{-9}	1.60×10^{-8}	0.467
メフェナセット	mefenaset	8	4	1840	6.46×10^{-10}	5.57×10^{-9}	0.217
フェンチオン	fenthion	0.05	0.03	5.5	4.41×10^{-10}	3.95×10^{-9}	0.455
モリネート	molinate	24	12	40000	3.86×10^{-11}	4.13×10^{-10}	0.03
シメトリン	simetryn	9	4.5	27000	1.18×10^{-11}	1.36×10^{-10}	0.017
プレチラクロール	pretyrachlor	6	3	26500	6.33×10^{-12}	7.58×10^{-11}	0.011
ブタクロール	butachlor	2	1	25000	8.38×10^{-13}	1.13×10^{-11}	0.004

MEEC: 環境中最大濃度 (ppb) Maximum environmental concentration (ppb)

EEC: 環境中濃度(最大濃度 * 0.5) Environmental exposure concentration (maximum×0.5)

LC50: 急性毒性値 (ppb) Acute toxicity

Δp : 絶滅確率 Extinction probability

Δp^* : 絶滅確率(上限値) Extinction probability (upper bound)

EHQ: $(\text{EEC}/\text{LC50}) \times 100$

それはどちらの指標も、急性毒性値と環境中濃度の相対値に基づいて算出されるからである。しかし、リスクの相対的な大きさの点では、2つの指標は大きく異なる結論を示している。たとえば、主要な界面活性剤である LAS の生態リスクは、EHQ ではピリダフェンチオン、マラソン、ダイアジノンといった水田農薬の高々倍であるが、絶滅リスクの指標では、3 衍も大きく、より集中的な対策が求められる。

6 章 不確実性解析

このようにして計算した生態リスクの推定値は、解析で要求された仮定がすべて満たされているとしても、多くの要因によって大きな誤差が生じることに注意しなければならない。リスクの不確実性解析は、このようなリスクの推定誤差を要因ごとに推定するものであり、いくつかの実用上のメリットがある。まず、推定誤差に大きく寄与する要因を特定することによって、その要因の効果を小さくする改善法に導くことが出来

る。また、リスクの推定値の不確実性そのものをリスクの確率的な予測の枠組みに取り入れることによって、より正確なリスク評価を可能にすると考えられる。

ここでは、前節で推定した個体群の絶滅リスクの不確実性を、毒性データの不確実性によるものと、環境中曝露予測の不確実性によるものに大別し、定量的な評価を試みた。有害化学物質の曝露による水棲生物（動植物プランクトン）の個体群レベル効果は内的自然増加率の減少として現れ、内的自然増加率の反応は上述のべき関数モデルに従うと仮定する。すると、内的自然増加率の減少率はべき関数モデルの α と β だけで表されるので、毒性データの不確実性は α もしくは β の推定誤差としてまとめることが出来る。もし、生命表データが無い場合は、急性毒性 LC50 から、4 節の回帰式による急性-慢性外挿によって α を推定する。急性-慢性外挿を行った場合は、外挿による誤差が α の不確実性に加算される。

曝露濃度と内的自然増加率の関係を示すべき関数モデルが正しいと仮定すると、平均絶滅時間の推定値の推定誤差分散は、べき関数モデルのパラメータ α および β の推定誤差による成分と曝露濃度 x の測定誤差による成分に分割される。

$$Var(T) = \left(\frac{\partial f}{\partial \alpha} \right)^2 V_\alpha + \left(\frac{\partial f}{\partial \beta} \right)^2 V_\beta + \left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)^2 V_x \quad (7)$$

ここで f は平均絶滅時間の α 、 β 、 x に対する関数 ($T=f(\alpha, \beta, x)$) である。関数 f はべき関数モデル（式[3]）と平均絶滅時間のスケール則（式[2]）から合成して作り、偏微分係数はそれぞれのパラメータの関数として数値的に評価した。 V_α 、 V_β 、 V_x はそれぞれ、 α 値、 β 値、曝露濃度の推定誤差分散である。 V_α と V_β は毒性データの不確実性を、 V_x は曝露濃度推定の誤差分散を表す。 α 値を急性-慢性外挿によって推定した場合は、 V_α にさらに外挿による不確実性が加算されることになる。偏微分係数の項は、それらのパラメータの推定誤差がどれだけ平均絶滅時間の推定値に影響を与えるかを意味する。

V_α および V_β は、前記の基準化した全データセット（図 7）から、ブートストラップ・シミュレーションによる無作為抽出を多数繰り返すことによって得られたパラメータの経験分布として推定した。ブートストラップ法によるパラメータの経験分布は、純粋に標本抽出誤差を示す。急性切慢性外挿による不確実性は、(値の LC50 値に対する回帰直線からの標準誤差から推定した。

図 10 はその結果を、環境中曝露濃度の推定誤差が 20 パーセントの場合と 100 パーセントの場合について示したものである。縦軸は対数スケールにおける平均絶滅時間の増加分の標準誤差を、各要因に分けて示す。不確実性による分散は環境中曝露濃度に依存するので、それらの不確実性による標準誤差を環境中曝露濃度（横軸）に対する関数として数値的に解いた。

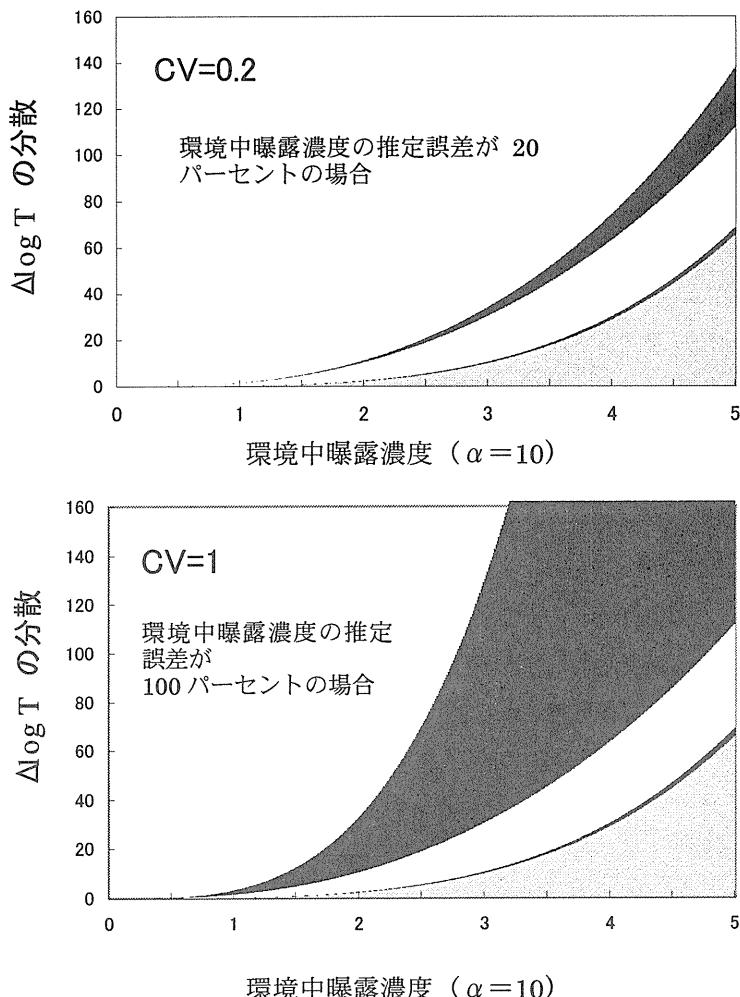


図 10 各要因による平均絶滅時間（対数値）推定における不確実性の大きさ

環境中曝露濃度の標準誤差が 20 パーセントのときは、環境中曝露濃度の推定誤差が絶滅リスク推定の主な要因ではないが、100 パーセントの場合は、リスク推定誤差の大部分を説明することがわかる。また、 α 値の推定誤差による寄与は少ないが、 β 値の推定誤差と急性一慢性外挿による寄与は非常に大きいことがわかる。このことは、内的自然増加率の反応と曝露濃度の曲率を個々のデータセットから推定した結果に基づいて、絶滅リスクの推定をすることには限界があることを示唆している。

7 章 内分泌搅乱物質の生態毒性

内分泌搅乱物質は、生物の内分泌系を搅乱することによって微量でも生物の繁殖力に大きな影響を与える危険性が指摘されている（コルボーン他 1997）。従来の環境汚染物質とは異なる内分泌搅乱効果の特徴は、微量でも個体の発生過程における二次性徴の発達などに障害をもたらし、成体に成長した後の繁殖能力に不可逆的な悪影響を与えると考えられていることである（コルボーン他 1997）。これらの特徴により、従来の毒性試験では内分泌搅乱物質の生態系への影響を十分に評価できない可能性がある。なぜなら、成体に成長

した個体の繁殖への影響を推定しても、個体発生段階における非可逆的な繁殖阻害効果を予測できない可能性があるからである。

そのような従来の急性毒性試験または繁殖試験の欠点を補うには、個体発生の初期段階にも有害化学物質を曝露し、性成熟する齢に達した成体に対して繁殖試験（メスの産卵数、オスの受精能力）を行うことである（生活史繁殖試験）。本研究では、我が国の河川で最も実測濃度が高い内分泌搅乱物質の一つである p-ノニルフェノールに対して、メダカ (*Oryzias latipes*) を用いて生活史繁殖試験を行った。試験生物としてメダカを選んだ理由は、メダカは飼育法が確立している上、繁殖開始齢が約 8 週間と短く、生活史繁殖試験に向いていること、我が国の水系生態系における代表的な淡水魚でありながら個体数や生息地の激減によって絶滅が危惧されているからである。

実験の計画は、Arcan-Hoy and Benson (1998) を改変したものを探用した（図 11 参照）。正常な成魚のペアを小型ステンレス製のバット（1L）で、餌（ブラウンシュリンプ）を十分に与えながら繁殖条件（水温 25°C、16 時間明 : 8 時間暗光周期）で飼育した。p-ノニルフェノールの標準液の作成はミジンコ (*D. galeata*) の生命表試験に準じた。上のペアを 6 組作成し、助剤としてジメチルスルホキシドに溶解させた p-ノニルフェノールをそれぞれ、0 μg/L、3 μg/L、10 μg/L、30 μg/L、100 μg/L、300 μg/L の曝露濃度になるように加えた。飼育水は毎日全量交換するが、その際にも p-ノニルフェノールを添加した。これらすべての曝露濃度で、ほとんどすべての個体は繁殖に成功した。採取した卵は、水洗した後、5 パーセントのメチレンブルー水溶液中でシャーレの中で p-ノニルフェノールを曝露させながら孵化させた。メチレンブルー水溶液はほとんど毎日交換した。p-ノニルフェノールの曝露濃度は成魚の曝露濃度と同じになるように添加量を調整した。孵化した仔魚は、流水式曝露によって、連続的に p-ノニルフェノールに曝露させながら 4 週間飼育した（図 11 参照）。餌としてテトラフィンを 1 日 4 回与え、平日はさらにブラウンシュリンプを 1 日 2 回与えた。孵化後 4 週間において、各濃度区の個体を 2 つのグループに分け、片方の集団（約 10 匹ずつ）はそのまま連続曝露条件下で飼育し、他方の集団は大型水槽（サイズ）に移し、曝露させない条件で性成熟まで飼育した。前者の集団を「連続曝露集団」、後者の集団を「不連続曝露集団」と呼ぶ。

生態毒性実験のシェマ

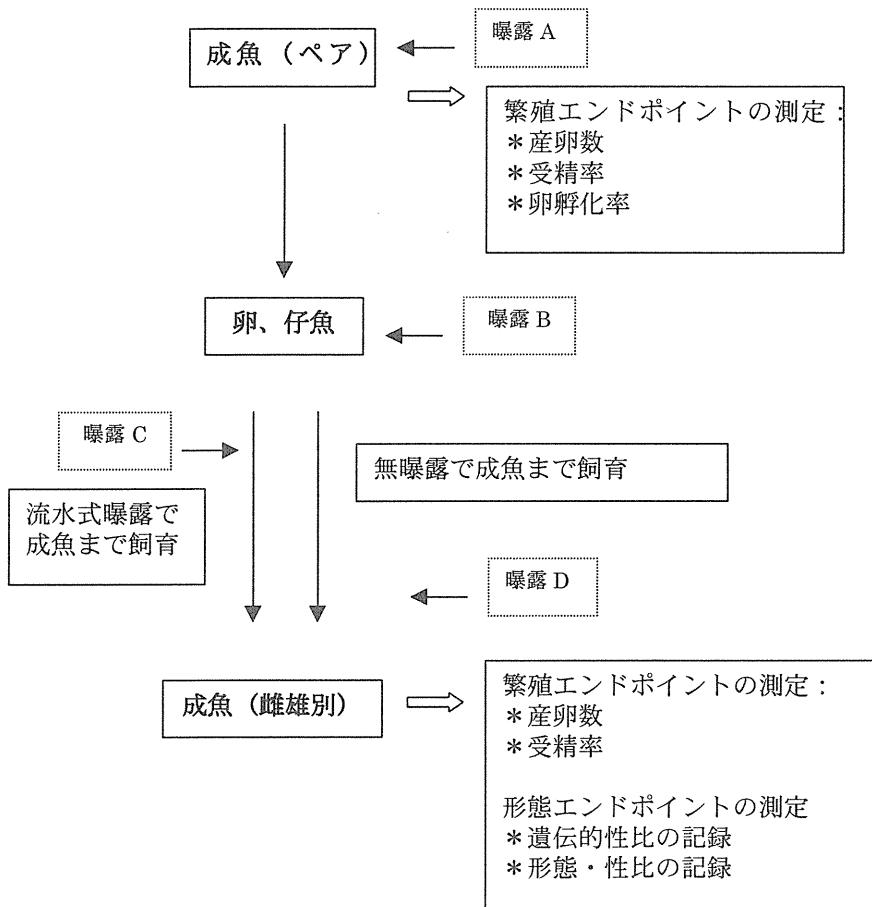


図 11 メダカ (*Oryzias latipes*) による内分泌搅乱物質 (p-ノニルフェノール) の生活史繁殖試験の概念図

孵化後約 6 ヶ月間飼育した後、不連続曝露集団の全個体に対して繁殖試験（メスの産卵数、オスの受精率に対する効果）を行った。曝露試験を行っていない正常に繁殖をしているヒメダカと各濃度区の試験個体の雌雄ペアを一組ずつステンレス製バット（1L）内で繁殖条件（水温 25°C、16 時間明：8 時間暗光周期）で飼育した。繁殖開始前と繁殖開始後 7 日間は無曝露条件で飼育し、メスに対しては産卵数、オスに対しては卵の受精率を毎日記録した。卵の受精は、採卵後 6 時間後までに卵殻の硬化が見られるかどうかによって判断した。繁殖開始 8 日目から 14 日目までは、p-ノニルフェノールを再曝露し、繁殖への効果を同様に記録した。p-ノニルフェノールの曝露濃度は卵および仔魚期の曝露濃度に準じる。連続曝露個体は 3 ヶ月間流水式の曝露を行った後、大型水槽に移し、無曝露条件下で約 6 ヶ月齢まで飼育した。その後、形態の測定のために生体のままデジタルカメラで撮影した後、ホルマリンで固定、保存した。

連続曝露の個体には、脊柱の湾曲、眼球の発育不良など、形態発生の障害が観察された。図 12 には、脊柱が腹側に湾曲する角度を個体ごとに計測した平均値を濃度区ごとに示してある。p-ノニルフェノールへの曝露を仔魚期までしか行わない不連続曝露集団では、脊柱の湾曲は見られなかったが、連続曝露集団では、曝露濃度が増加するほど脊柱が湾曲する傾向が見られた。

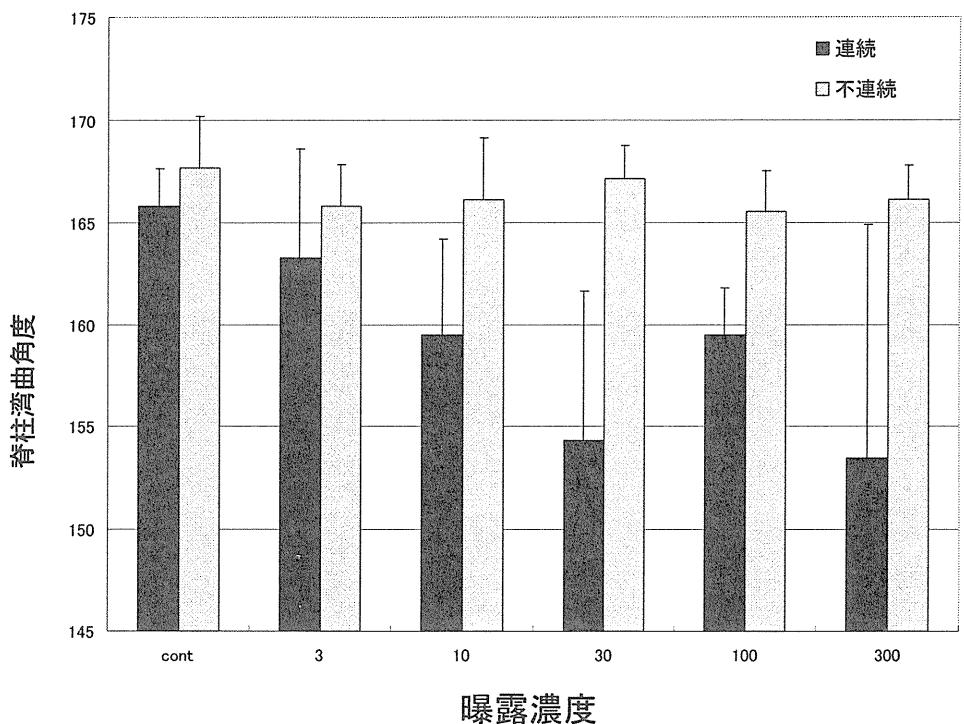


図 12 p-ノニルフェノールの連続曝露によるメダカの形態発生異常（脊柱湾曲）

メスの産卵数は $3\mu\text{g}/\text{L}$ の低い曝露濃度から減少傾向がみられた。p-ノニルフェノールの名目濃度と平均産卵数とのスピアマン順位相関は $r = -0.485$ と推定され、5 パーセント有意に近い値が得られた（図 13）。オスの受精能力に関しては、明らかな反応は見られなかった（図 14）。

子世代（生後3ヶ月曝露）の再曝露期間（14日間）における平均産卵数

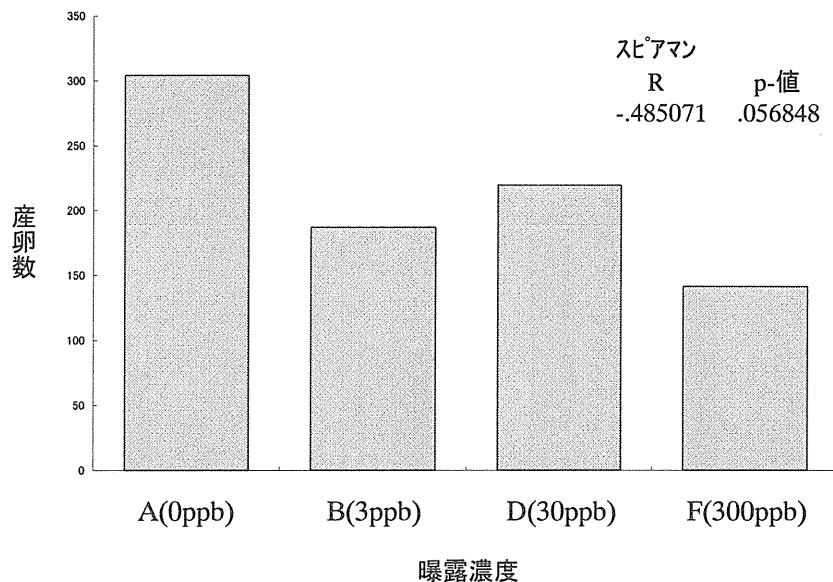


図13 p-ノニルフェノールに生後1ヶ月曝露されていたメス個体の6ヶ月齢における平均産卵数

子世代（生後3ヶ月曝露）の再曝露期間（14日間）における受精率

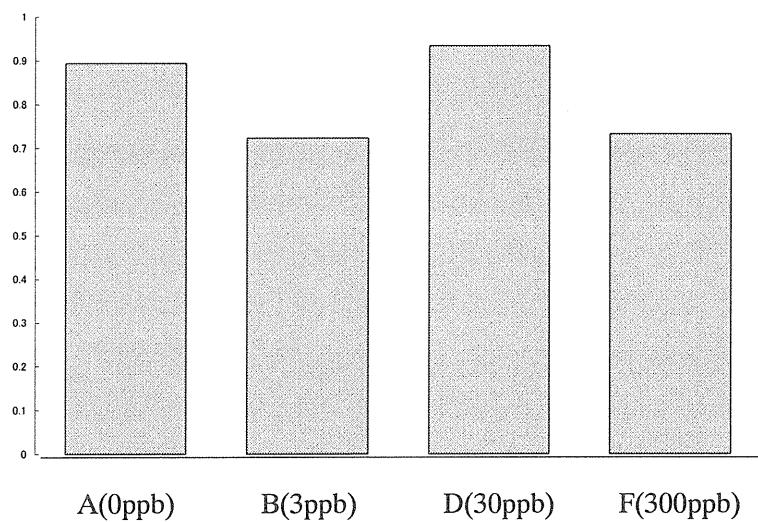


図14 p-ノニルフェノールに生後1ヶ月曝露されていたオス個体の6ヶ月齢における平均受精率

8章 考察とまとめ

環境汚染の生態系への影響を評価においては、化学物質の生物集団に対する個体群レベル効果の推定が基礎となる (Suter 1993)。本研究では、個体群レベル効果を個体群の内的自然増加率の減少分として定量化するデータ解析法を考案し、さらに個体群の絶滅リスクを予測する方法を提案した。提案された生態リスク評価法は、生物の個体群の存続能力に対する効果を評価する点で、従来の生態リスク評価手法にくらべてより

生態影響を正確に反映するだろうと考えられる。ただし、提案された方法はいくつかの仮定に基づいており、限界があることにも注意しなくてはならない。

本研究で採用した絶滅リスク予測の数理理論は個体変数の拡散近似に基づいているため、個体群が定常的な状態にあり、個体数は平衡値の周辺をランダムに変動していると仮定されている。しかし、実際の多くの個体群では、生息地の破壊など、他の搅乱要因のために個体数が減衰する傾向にある。このような場合は本研究が採った拡散近似解の利用は困難で、レスリー行列モデルなどによるシミュレーションが有効であろう。

また、本研究の絶滅リスクの推定は、単一の個体群ないし種の存続可能性の予測に基づいている。しかし、実際の生態系では、生物は種間相互作用を持った生物群集を形成し、有害化学物質の生態影響も種間相互作用を介した間接的なものが無視できないと考えられている (Bartell et al. 1992)。種間相互作用を介する間接効果を生態リスク評価に取り入れ、より現実的な生態影響評価を行うためには、食う食われる関係、競争関係などの種間相互作用を明示的に取り入れた群集動態モデルを適用する必要があるだろう。

引用文献

Allan, J.D. and R.E. Daniels 1982. Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. *Marine Biology* 66: 179-184.

Arcand-Hoy, L.D. and W.H. Benson 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 49-57.

Baldwin, W.S., Milam, D.L. and G.A. LeBlanc 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 945-952

Bartell, S. M., Gardner, R. H. and R.V. O'Neill 1992. *Ecological Risk Estimation*, 252 pp., Lewis Publishers.

Bertram, P.E. and H.A. Hart 1979. Longevity and reproduction of *Daphnia pulex* (de Geer) exposed to cadmium-contaminated food or water. *Environ Pollut* 19: 295-305.

コルボーン, T., ダマノスキ, D., マイヤーズ, J. 1997. 奪われし未来. (長尾力訳) 翔泳社.

Daniels RE, Allan JD. 1981. Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Can J Fish Aqua Sci* 38: 485-494.

Foley, P. 1994. Predicting extinction times from environmental stochasticity and carrying capacity. *Conservation Biology* 8: 124-137.

Gentile, J.H., Gentile, S.M., Hairston, N.G. and B.K. Sullivan 1982. The use of life-tables for evaluating the chronic toxicity of

pollutants to *Mysidopsis bahia*. *Hydrobiologia* 93:179-187.

Gentile, J.H., Gentile, S.M., Hoffman, G., Heltshe, J.F. and N.Hairston 1983. The effects of a chronic mercury exposure on survival, reproduction and population dynamics of *Mysidopsis bahia*. *Environ Toxicol Chem* 2: 61-68.

Lande, R. 1993. Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *American Naturalist* 142: 911-927.

Lande, R. 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Res Popul Ecol* 40: 259-269.

Suter, G. W., 1993. *Ecological Risk Assessment*. 538 pp., Lewis Publishers.

田中嘉成・中西準子 1998. 慢性毒性の生命表評価法と生態リスク分析. 水環境学会誌 21 : 589-595.

Tanaka, Y. and J.Nakanishi. 2000. Mean extinction time of populations under toxicant stress and ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2856-2862.

Tanaka , Y. and J.Nakanishi (印刷中) Model selection and parameterization of the concentration-response functions for population-level effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Tanaka, Y. and J.Nakanishi (投稿中 a) Effect of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Population Growth of *Daphnia galeata*: A Life Table Evaluation. *Environmental Toxicology*.

Tanaka, Y. and J.Nakanishi (投稿中 b) Chronic effects of p-nonylphenol on survival and reproduction of *Daphnia galeata*: multi-generational life table experiment. *Environmental Toxicology*.

Tanaka, Y. and J.Nakanishi (投稿中 c) Life table toxicity of sulfuric acid on *Daphnia galeata*: A manipulation of acid stress. *Japanese Journal of Environmental Toxicology*.

Van Leeuwen, C.J., Luttmer, W.J. and P.S.Griffion 1985. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. *Ecotoxicol Environ Safety* 9: 26-39.

Winner, R.W., Keeling, T., Yeager, R., and M.P.Farrell 1977. Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwater Biology* 7: 343-349.

付表 生命表評価試験および個体群増殖試験のリスト

著者	雑誌	年
1 Fernandez-Casalderrey,A., Ferrando, M. D. and E. Andreu-Moliner	Comp.Biochem.Physiol.	1993
2 Coniglio, L., and R. Baudo	Hydrobiologia	1989
3 Gentile, J. H., S. M. Gentile, G. Hoffman, J. F. Heltshe and N. Hairston, Jr	Env.Toxicol.Chem.	1983
4 Marshall, J. S.	J.Fish.Res.Board Can.	1978
5 Winner, R. W. and M. P. Farrell	J.Fish.Res.Board Can.	1976
6 Marshall, J. S.	Ecology	1962
7 Walton, W. E., S. M. Compton, J.D. Allan and R. E. Daniels	Can.J.Zool.	1982
8 Hummon, W. D.	Amer.Mid.Natur.	1973
9 Daniels, R. E. and J. D. Allan	Can.J.Fish.Aqua.Sci.	1981
10 Gentile, J. H., S. M. Gentile, N. G. Hairston, Jr., and B. K. Sullivan	Hydrobiologia	1982
11 Allan, J. D. and R. E. Daniels	Marine Biology	1982
12 Winner, R. W., T. Keeling, R. Yeager and M. P. Farrell	Freshwater Biology	1977
13 Day, K. and N. K. Kaushik	Environmental Pollution	1987
14 Bertram, P. E. and H. A. Hart	Environmental Pollution	1979
15 Holman, W. F. and K. J. Macek	Transactions of the Amer	1980
16 Maki, A. W.	J.Fish.Res.Board Can.	1979
17 Ensorink, E. L., J. L. Maas-Diepeveen, and C. J. Van Leeuwen	Wat.Res	1991
18 Halbach, U., M. Siebert, M. Westermayer and C. Wissel	Ecotoxicol.Env.Saf.	1983
19 Marshall, J. S.	Ecology	1966
20 Francis, P. C., D. W. Grothe and J. C. Scheuring	Bull. Environ. Contam. T.	1986
21 Klass, E., D. W. Rowe and E. J. Massaro	Bull. Environ. Contam. T.	1974
22 Winner, R. W.	Environmental Pollution	1981
23 Gray, J. B. and R. J. Ventilla	Ambio	1973
24 Van Leeuwen, C. J., F. Mobergs and G. Niebeek	Aquatic Toxicology	1985
25 Van Leeuwen, C. J., W. J. Luttmer and P. S. Griffioen	Ecotoxicol.Env.Saf.	1985
26 Reish, D. J. and R. S. Carr	Marine Pollution Bulletin	1978
27 Van Leeuwen, C. J., M. Rijkeboer and G. Niebeek	Hydrobiologia	1986
28 Giga, D. P. and J. Canhao	African Entomology	1993
29 Walsh, G. E.	Aquatic Toxicology	1983
30 Chandini, T.	Environmental Pollution	1988
31 Krishnan, M. and S. Chockalingam	Environmental Pollution	1989
32 Weinberger, P. and M. S. Rea	Environmental and Exper	1982
33 Longstaff, B. C. and J. M. Desmarchelier	J.Store Prod.Res.	1983
34 Nimmo, D. R., L. H. Bahner, R. A. Rigby, J. M. Sheppard and A. J. Wilson,	Aquatic Toxicology and I	1977
35 Hatakeyama, S. and H. Shiraishi	Water Research	1991
36 Comber, M. H. I., T. D. Williams and K. M. Stewart	Water Research	1993
37 Ruzicki, E. M., Axler, R. P., Owen, C. J. and Martin, T. B.	Env.Toxicol.Chem.	1998
38 Hansen, F., V. E. Forbes and T. L. Forbes	Functional Ecology	1999