

水生植物影響試験としてのウキクサ 生長阻害試験

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
農業検査部

石原 悟

はじめに

水圏で光合成を行う一次生産者は、酸素の供給、餌資源、甲殻類や魚類など高次捕食者の生息場や産卵場を提供するなど水圏生態系で重要な役割を担っている（環境省 2018a）。

農業の水圏生態系での環境影響評価は、生態系を構成している代表的生物を用いた影響試験から求められる影響指標（LC₅₀ や EC₅₀ など）とばく露濃度を比較して行われることが一般的である。

水圏の一次生産者に関する影響試験については、国際的には藻類（藍藻類、珪藻類、緑藻類）（OECD 2011）、*Lemna* 属ウキクサ（OECD 2006）やホザキノフサモ（*Myriophyllum spicatum*）（OECD 2014a, OECD 2014b）などの水生植物について試験方法が定められている。これらの試験は欧米における除草剤や植物成長調整剤の環境影響評価スキームに既に組み込まれている（EFSA 2013；U.S.EPA 2012a）。

日本ではこれまで農業の一次生産者に対する評価では藻類（単細胞緑藻）のみが活用されていたが、現在、環境省により水草の生態学的重要性を考慮し、農業の環境影響評価スキームに緑藻以外の藻類や *Lemna* 属ウキクサを評価対象生物として追加する方向で検討が進められている（環境省 2018b）。

本稿では、我が国の農業の環境影響

評価スキームへの導入が検討されている *Lemna* 属ウキクサを試験生物とした生長阻害試験について、試験方法を概説するとともに試験生物である *Lemna* 属ウキクサの生態や形態および培養する際の留意点について解説したい。また、より簡易な試験法としてミジンコウキクサを試験生物とした生長阻害試験について紹介したい。

ウキクサの生態

湖沼、ため池、河川などの水圏に生活する植物を我々は水草と呼んでいる。広義には湿地や湿原に生育する植物（湿性植物）までを含めて水草と呼ぶこともあるが、通常は水中で生活する植物群のことを示している。水草はその生育様式により、抽水植物、浮葉植物、沈水植物および浮遊植物の四つの生育形に分類される（表-1）。このうち浮遊植物は培養に底質を必要としないため、根が水底に固着する他の水草と比較すると室内培養が容易である。特に増殖力が強く植物体のサイズが小さいウキクサ科の植物は、実験生

物としての適性が高く、花芽形成の研究材料など植物生理学の分野で古くから使用されている。

日本水草図鑑（角野 1994）によると、単子葉類のウキクサ科（Lemnaceae 科）の植物は世界に 4 属、日本には帰化種を含め 3 属（*Spirodela* 属、*Lemna* 属、*Wolffia* 属）が生息するとされている（図-1）。農業等化学物質に関する影響評価では主に *Lemna* 属の種が利用されており、U.S.EPA（米国環境保護庁）や OECD（経済協力開発機構）が定める生長阻害試験の試験方法では、コウキクサ（*L. minor*）とイボウキクサ（*L. gibba*）が試験生物に採用されている。

日本に分布するウキクサ科の植物としては、水稲水田の環境に適応し一年草の生活史をとるアオウキクサ（*L. aoukikusa*；種子で越冬）とウキクサ（*S. polyrrhiza*；殖芽で越冬）が最も広範囲に生息する普通種といえる。一方、葉状体のまま越冬するコウキクサやイボウキクサは蓮田やため池など通年湛水している限られた場所で生息が認められる。

Lemna 属ウキクサの外観は、葉状体

表-1 水草の生育形による分類

生育形	特徴	例
1. 抽水植物	根が水底に固着する 植物体の一部が水面上に突き出る	ヨシ、ガマ、オモダカなど
2. 浮葉植物	根が水底に固着する 水面に浮く葉（浮葉）を展開する	ヒシ、ヒルムシロなど
3. 沈水植物	根が水底に固着する 植物体全体が水中に沈む	ホザキノフサモ、クロモ、エビモなど
4. 浮遊植物	根が水底に固着せずに浮遊する	ウキクサ 、サンショウモ、イチョウウキゴケなど

- ウキクサ科(Lemnaceae)
- アオウキクサ属(*Lemna*): 根が1本
 - ・アオウキクサ(*L. aoukikusa* Beppu et Murata)
 - ・ホクリクアオウキクサ(*L. aoukikusa* Beppu et Murata subsp. *hokurikuensis* Beppu et Murata)
 - ・ナンゴクアオウキクサ(*L. aequinoctialis* Welw)
 - ・コウキクサ(*L. minor* L. (s.l.))
 - ・イボウキクサ(*L. gibba* L.)
 - ・ヒナウキクサ(*L. miniscula* Herter)
 - ・ヒンジモ(*L. trisulca* L.)
 - ウキクサ属(*Spirodela*): 根が2本以上
 - ・ウキクサ(*S. polyrhiza* (L.) Schleid.)
 - ・ヒメウキクサ(*S. punctata* (G.F.W.) Thompson)
 - ミジンコウキクサ属(*Wolffia*): 根がない(0本)
 - ・ミジンコウキクサ(*Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas)

図-1 日本に生息するウキクサ科の植物
下線:OECDの試験方法(TG221)における試験生物

(葉に似ているが形態的には茎に相当する)が主体をなしており、柄で連なって群体をつくるヒンジモ (*L. trisulca*)を除きよく似ている(図-2)。特に室内培養環境では浮囊の発達や着色など種の特徴が認められなくなる傾向にあるため、種の判別はより困難となる。試験条件下における培養では *Lemna* 属ウキクサは栄養繁殖(葉状体から新しい葉状体が出芽する)により増殖している。種類および環境条件により異なるが、通常2~5個の葉状体で1植物体(コロニー)を構成する(図-2)。

Lemna 属ウキクサはいずれも小型で

あること、微細藻類の培養と同じ水準の滅菌操作が必要でないこと等の理由から、他の試験生物と比較して室内での維持が容易な生物といえる。

生長阻害試験の概要

Lemna 属ウキクサを試験生物とした生長阻害試験の試験方法は、ASTM International (ASTM Int. 2012), U.S.EPA (U.S.EPA 2012b), OECD (OECD 2006) 等から示されているが、基本的な内容に相違はない。ここでは OECD の試験方法(TG221)に

基づき試験の概要を解説したい。

(1) 試験生物

Lemna 属ウキクサを試験生物とした生長阻害試験は、欧州でコウキクサ、米国でイボウキクサが主に使用されている。当該2種については最適な環境条件や薬剤感受性等の基礎的な知見が集積しており、TG221ではコウキクサとイボウキクサが試験生物として採用されている。試験には試験と同条件で7~10日間培養した増殖が盛んな時期の個体を用いる。

(2) 培養方法と環境条件

使用する培地の種類を除きコウキクサとイボウキクサを培養する環境条件および試験条件は同じである(表-2)。培地はコウキクサで改良 SIS 培地、イボウキクサで 20X AAP 培地の使用が推奨されている。*Lemna* 属ウキクサは種により培地の適性が異なり、イボウキクサと改良 SIS 培地の相性は良くない(図-3)。また、アオウキクサについて培地の適性を確認したところ、改良 SIS 培地で正常な増殖が認められたが 20X AAP 培地との相性は極めて悪かった(図-3)。*Lemna* 属ウキクサを室内で培養する際には培地の選択に留意が必要である。

ウキクサの室内培養では微細藻類の培養と同じ水準の滅菌操作は必要としないが、培養系に微細藻類(特に緑藻)が混入すると株の維持が困難となる。そのため、培地、培養容器や移植に用いる器具については滅菌する必要がある。

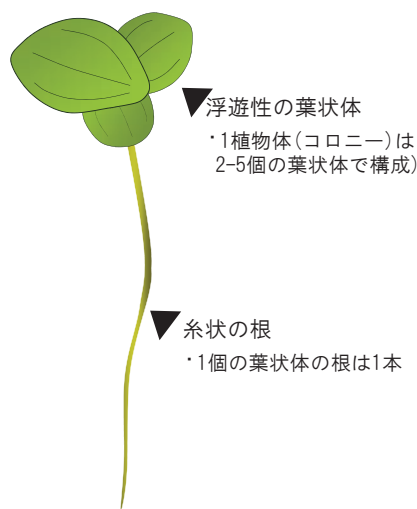


図-2 *Lemna* 属ウキクサの外観
右側の写真は室内で培養した
主な *Lemna* 属ウキクサを上部から撮影したもの

表-2 *Lemna* 属ウキクサ生長阻害試験 (TG221) の主な試験条件

試験生物	コウキクサ (<i>L. minor</i>)	イボウキクサ (<i>L. gibba</i>)
推奨培地	改良SIS培地	20X AAP培地
温度	24±2 °C	
光条件	24時間明期, 光強度: 85~135 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (通常の白色光で照度: 6,500~10,000 luxに相当)	
試験容器(推奨)	水深: ≥ 20 mm, 培地量: ≥ 100 mL	
前培養	試験と同条件で7~10日培養した個体を試験に用いる	
試験開始時の生物数	9~12個の葉状体 (2~4個の葉状体で構成されるコロニーを使用)	
連数、公比(推奨)	連数: 3連以上, 公比: 3.2を超えないことが望ましい	
試験期間 (ばく露期間)	7日間	
測定項目	葉状体の数および以下の項目のうち一つ (葉状体の総面積, 乾重量, 湿重量)	
影響指標	EC ₅₀ , ECx, NOECなど	

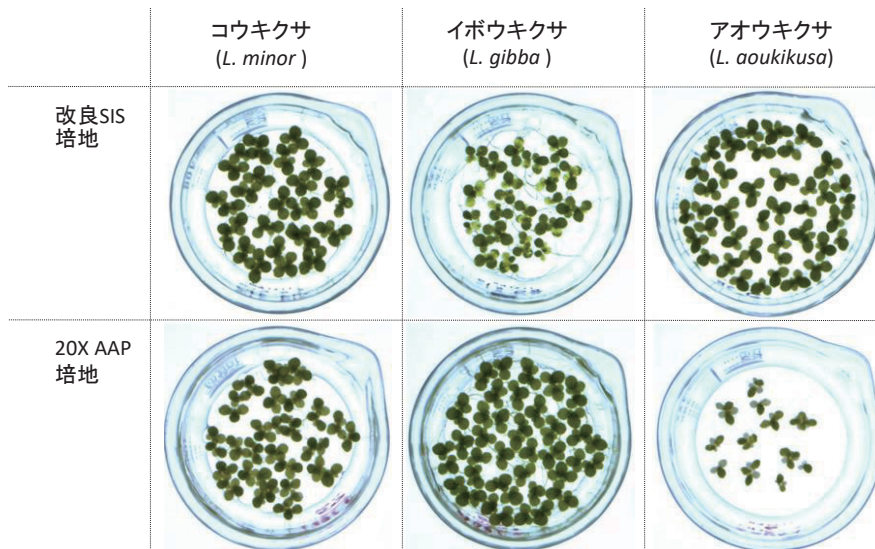


図-3 *Lemna* 属ウキクサの培地適性
3コロニー/容器 (100 mL ビーカー) を試験条件で7日間培養した結果

が、葉状体の形状に影響を及ぼす被験物質の試験では、総面積の測定が困難となる場合があるため重量の測定が必要となる。

(4) 基準物質と影響指標

基準物質としては国際リングテストで用いられた二クロム酸カリウムや3,5-ジクロロフェノールがよく使用されている。影響指標については藻類の試験と同様、EC₅₀、NOECを求めることが一般的である。二クロム酸カリウムに対する感受性については、EC₅₀はコウキクサとイボウキクサでそれぞれ2~4 mg/Lおよび8~30 mg/Lという報告がある(日本環境毒性学会 2013)。また、3,5-ジクロロフェノールに対する感受性については、EC₅₀はコウキクサとイボウキクサでそれぞれ2.7~3.4 mg/Lおよび6.0~7.0 mg/Lという報告がある(日本環境毒性学会 2013)。なお、我々が3,5-ジクロロフェノールを被験物質として試験した結果EC₅₀はコウキクサとイボウキクサでそれぞれ3.0~

(3) 試験期間と測定項目

生長阻害試験の試験期間は7日間とされている。試験の妥当性基準として、対照区における葉状体数の倍加時間は2.5日(60時間)未満と定められており、これは7日間で約7倍に増殖することに相当する。

測定項目は葉状体数の測定が基本と

されており、試験期間中少なくとも3日に1回(すなわち7日間の間で最低2回)と試験終了時に測定する必要がある。また、葉状体数の測定に加えて、葉状体の総面積、乾重量または湿重量のうちの一つ(あるいは複数)に与える被験物質の影響も評価しなければならない。測定項目は葉状体数と総面積の測定の組み合わせが一般的だ

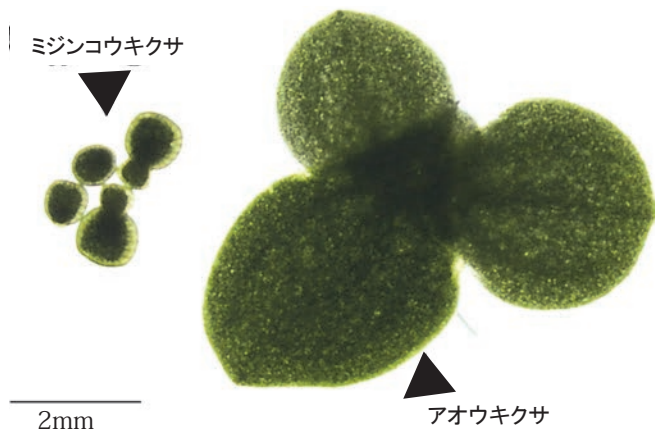


図-4 ミジンコウキクサ (*W.globosa*) およびアオウキクサ (*L.aoukikusa*)

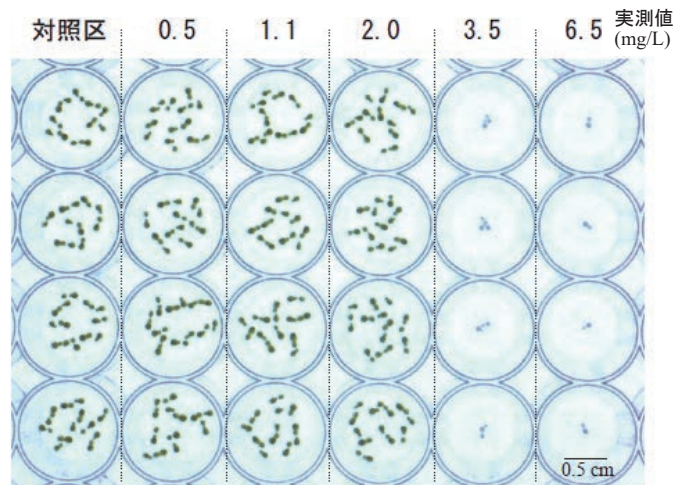


図-5 48wellのマルチディッシュプレートを試験容器としたミジンコウキクサ (*W.globosa*) の生長阻害試験例
被験物質: 3,5-ジクロロフェノール, 試験終了時(7日後)の状態

3.3 mg/L および 6.2 ~ 6.7 mg/L であり、文献値と同様の傾向が認められた (石原ら 2010)。

ミジンコウキクサを試験生物とした生長阻害試験

Lemna 属ウキクサは小型の水生植物であるが、TG221の試験方法に従い試験を行うには多量の培地を調製する必要がある (例として 100 mL ビーカーを試験容器と使用した場合、1 試験当たり 5 L 程度必要)。また、試験には大型の照明付き恒温槽を必要とする。そこで我々は *Lemna* 属ウキクサと同じウキクサ科に属するより微少な生物であるミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) (図-4) に着目し、簡易な生長阻害試験法を検討した。

ミジンコウキクサは改良 SIS 培地で良好な生長 (7 日間の培養で約 10 倍) が認められた。試験容器として 48well のマルチディッシュプレートの使用も可能であり (図-5)、基準物質 (3,5-ジクロロフェノール) に対する感受性はコウキクサと同等 ($EC_{50} = 3.1 \text{ mg/L}$) であった (石原・近藤 2012)。また、ミジンコウキクサと *Lemna* 属ウキクサの一種であるアオ

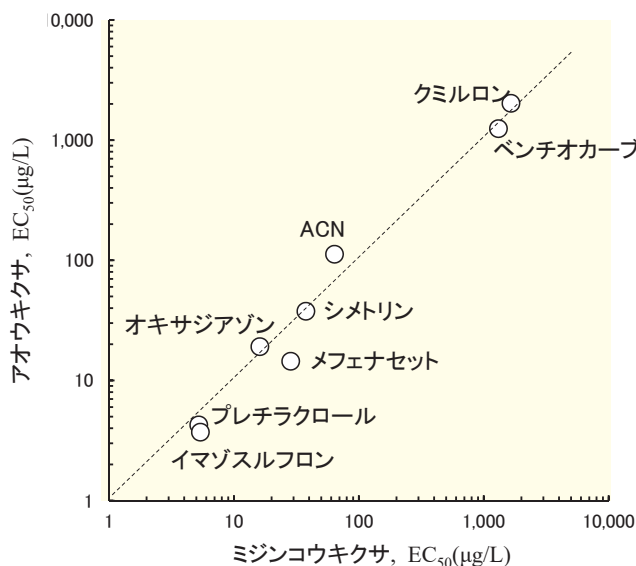


図-6 ミジンコウキクサ (*W.globosa*) とアオウキクサ (*L.aoukikusa*) の除草剤感受性の EC_{50} による比較

ウキクサの除草剤感受性を EC_{50} で比較した結果、感受性差は 0.5 ~ 1.8 倍と比較的狭い範囲内にあり、ミジンコウキクサの除草剤感受性がアオウキクサと同等であることが示唆された (図-6) (石原・佃 2012)。

ミジンコウキクサは個体のサイズが *Lemna* 属ウキクサと比較して極めて小さいことから (図-4)、より省スペースで生長阻害試験が実施できる。また、葉状体数の計測も容易であり、簡易・迅速に結果を得られることから、ミジンコウキクサを用いた生長阻害試験は

既存の *Lemna* 属ウキクサを試験生物とした生長阻害試験のスクリーニング試験としての利用が期待される。

おわりに

Lemna 属ウキクサを試験生物とした生長阻害試験について OECD の試験方法を例に解説した。*Lemna* 属ウキクサは実験生物としての適性が高く、室内で容易に維持・培養できる。同じ水生植物である藻類生長阻害試験を実施できる設備を有する機関であれば、容

易に試験が実施できると考えられる。

試験に用いる株としては、OECDのリングテストで用いられた系統のコウキクサを国立研究開発法人国立環境研究所が分譲しており、由来の明らかな株の入手が可能である。

農業の環境影響評価スキームに *Lemna* 属ウキクサが追加されることで、水圏の一次生産者に対するより精緻な影響評価が可能になることが期待される。

参考文献

ASTM International 2012. Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests With *Lemna gibba* G3.
EFSA 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in

edge-of-field surface waters. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3290>

OECD 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

OECD 2006. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test

OECD2014a. Test No. 238: Sediment-Free *Myriophyllum Spicatum* Toxicity Test.

OECD2014b. Test No. 239: Water-Sediment *Myriophyllum Spicatum* Toxicity Test.

U.S.EPA 2012a. 40 CFR 158 660 USEPA DATA REQUIREMENTS FOR PESTICIDES. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title40-vol25/pdf/CFR-2012-title40-vol25-part158.pdf>

<https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-70/siryou4.pdf>

U.S.EPA 2012b. OCSPP 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp.

石原悟ら 2010. アオウキクサ類を供試生物としたウキクサ生長阻害試験の試験条件. 環境毒性学会誌 13(2), 131-139.

石原悟・近藤美和 2012. ミジンコウキクサを試験生物とした生長阻害試験法の検討. 農業調査研究報告 (4), 1-4.

石原悟・佃美和 2012. ミジンコウキクサの除草剤感受性. 雑草研究 57(別号: 第51回講演会講演要旨), 131.

角野康郎 1994. 日本水草図鑑. 文一総合出版, 東京, pp72-77.

環境省 2018a. 平成 29 年度農業の水生物に対する影響調査業務 調査報告書. http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/ecol_risk/post_32.html

環境省 2018b. 農業登録基準の設定における藻類, 水草の取扱いについて(案)平成 30 年 9 月 6 日 中央環境審議会土壤農業部会農業小委員会(第 65 回)資料 4. <https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-70/siryou4.pdf>

日本環境毒性学会 2003. 生態影響試験ハンドブック. 朝倉書店, 東京, pp44-48.

田畑の草種

犬蓼・赤まんま・赤のまま (イヌタデ)

(公財)日本植物調節剤研究協会
兵庫試験地 須藤 健一

タデ科イヌタデ属の一年草。日本全国の水田, 畦畔, 休耕田, 道端などにごく普通に生える。茎は赤みを帯び根元から分枝し, 直立あるいは斜上し高さ 20 ~ 40cm。時に一面の群落を作ることもある。

日本在来で万葉人の目にも留まっていたが, 万葉人は「イヌタデ」, 「オオイヌタデ」, 「ヤナギタデ」を含めて「蓼」と認識していたようである。万葉集には, 穂蓼, 水蓼と詠んだ歌が 3 首。犬蓼が犬蓼として認識されるのはもう少し時代が下がり鎌倉時代になる。藤原定家の長男である藤原為家に犬蓼を読み込んだ歌がある。

からきかな かりもはやさぬ いぬ蓼の

穂になる程に 引く人のなき (夫木和歌抄)

情けないことだが, 刈って生やさないようにしていた犬蓼であるが, 今ではもう穂になってしまっていてそれを抜いてくれる人もいないことよ, と嘆くように詠う。

江戸時代になると, 歌や俳句に犬蓼が詠まれたしたが, まだ, 「蓼」が主であった。

近世に入ると犬蓼も市民権を得て, 多くの歌人や俳人が犬蓼

を読み込んだ。そんな中の 1 首。

犬蓼の 花さかりなる里川に

夕日ながれて あきつ飛ぶなり (落合直文)

里の川の岸辺には犬蓼が一面に広がっている。その赤い花と真っ赤な夕日が流れに映り, その川面を赤とんぼが飛び交う, なんとも幻想的な光景である。

一方で, 犬蓼は「赤まんま」とか「赤のまま」とも呼ばれ, 女の子たちのままごとには欠かせないものであった。犬蓼の花穂を扱いて器に入れ赤飯とするのである。赤飯は「ハレ」の食事の代表であるが, 女の子たちは「赤まんま」で遊びながら, 「ケ」の中に「ハレ」をみていたのかもしれない。

三ヶ島葎子にこんな歌があった。

たらずみて われは見にけり裏の人の

赤のまんまを 鉢に植ゑたり

家の裏に住む(女の)人, その人が犬蓼の花をとって鉢に植ゑるのを見た, というだけの歌であるが, たたずんでいた葎子は犬蓼(赤まんま)の実を鉢に植ゑるという(女人の)姿に何を思ったのだろうか。