

コガタシマトビケラ 成長段階別毒性試験法 マニュアル



農研機構 農業環境変動研究センター

2020年3月

技術マニュアル

コガタシマトビケラ成長段階別
毒性試験法マニュアル

2020年3月

農研機構 農業環境変動研究センター

はじめに

農薬は安定した農業生産に必要な資材であるが、病虫害や雑草の防除を目的としているため高い生理活性を持っている。このような農薬が農耕地から系外へ流出した場合、非標的生物に対して何らかの影響を与える可能性があるため、農薬使用に伴う生態リスク評価を適切に行う必要がある。我が国では、2003年に「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準」（現水産動植物の被害防止に係る農薬登録基準）が改定された際に、水産動植物の保護の観点から、試験生物種として魚類（コイまたはメダカ）、オオミジンコ、緑藻（ムレミカヅキモ）などが加えられ、これらの毒性試験結果に基づく急性影響濃度と環境中予測濃度を比較するリスク評価手法が農薬登録制度に導入された。一方で、日本の主要な陸水である河川を代表する試験生物種およびその評価手法が確立されておらず、河川生態系への影響を適切に評価できないことが懸念された。そこで、2003年から2007年に農林水産省技術会議事務局の委託プロジェクト「農林水産生態系における有害化学物質の総合管理技術の開発」において、河川に生息する生物に着目した農薬等化学物質の影響評価法の開発が取り組まれた。その一環として、独立行政法人農業環境技術研究所（現 農研機構 農業環境変動研究センター）では、水生昆虫の一種であるコガタシマトビケラ（*Cheumatopsyche brevilineata*）の試験生物種としての有効性を確認するとともに、完全室内累代飼育法を確立し、2008年3月に「コガタシマトビケラの室内飼育法マニュアル」および「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」を公開した。これらの成果の一部は、農薬に対する感受性の生物種間差の解明に活用され、その後の農薬の生態リスク評価の拡充（2016年の一部殺虫剤に対するユスリカ急性遊泳阻害試験実施の義務化）に貢献している。2018年には農薬取締法が改正され、農薬の生態リスク評価の対象が陸域を含む生活環境動植物に広げられた（2020年4月1日以降）。水生生物では藻類とは農薬に対する感受性が異なる「水草」が新たに試験生物に追加された。このように我が国においては、その都度、科学的な知見に基づいて試験生物種を拡大し感受性の生物種間差を把握することにより、より適切な評価に向けて生態リスク評価制度の変革が図られてきた。

その一方で、近年開発されている選択性の高い一部の農薬については、生物種間の感受性差が大きいばかりでなく、成長段階の違いによっても感受性が大きく変動することが示唆されている。現行の生態影響評価では、特定の成長段階・個体サイズの試験個体を用いた毒性試験が実施されており、それらの成長段階は一般的に化学物質に対する感受性が高く、比較的安全側にたった評価を行っていると言われている。しかし、農薬に対する感受性が試験個体の成長に伴ってどのように変動していくのかに関する知見は少なく、必ずしも感受性が高い成長段階で試験をしているとは限らない。そこで、成長に伴う感受性の変動を把握する手法として、前述のコガタシマトビケラを活用し、卵から5齢幼虫までの成長段階別毒性試験法を開発した。本マニュアルはその試験法の手順や要点を解説したものである。

試験生物種を大幅に拡充した現行の農薬登録制度は、かつてに比べれば適切な生態リスク評価が実施されている。しかし、複雑な系で構成される環境中でどのような生態影響が出るのかを完全に把握し、評価することは困難であるため、上市後の状況によっては一部の農薬で追加のリスク管理措置が必要になる可能性を排除できない。迅速かつ適切なリスク管理措置を実施するためには、農薬の生態影響について様々な視点から予め知見を蓄えておくことが重要である。本研究で開発した成長段階別毒性試験法は、個体の成長という時間軸の観点から感受性のバラツキを把握することによってより適切に生態影響を把握し、上市後の適切なリスク管理措置の一助になると考えられる。本マニュアルは、農薬に関わる行政や試験研究機関に対し生態影響に関する今後の理解の深化に繋がるものと期待される。

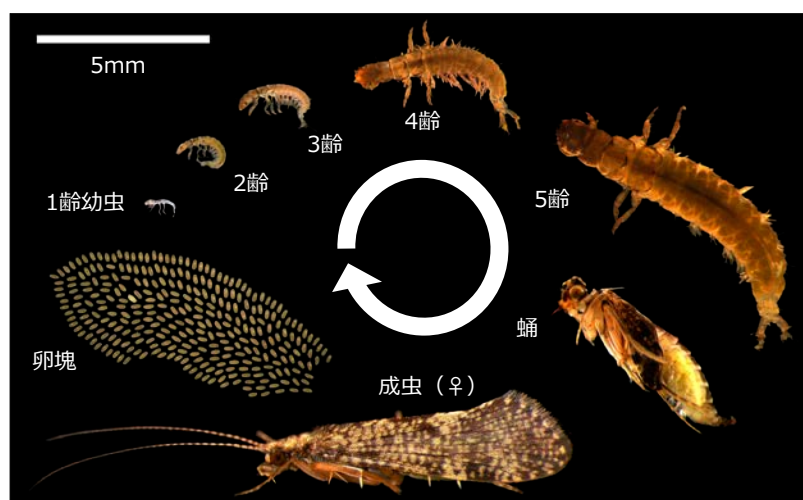
コガタシマトビケラについて

トビケラ目 (Trichoptera) シマトビケラ科 (Hydropsychidae) に属するコガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) は比較的小型のトビケラで、本州・四国・九州および沿海州に広く分布している。幼虫は平地河川の上流域から下流域にかけて生息し、流況が安定していれば細流や農業用水路等にも生息する。その生息域と農耕地の分布の重なりを考えると、農業生産活動が本種に何らかの影響を与えている可能性がある。

コガタシマトビケラを含むシマトビケラ科の幼虫は造網型 (net-spinners) と呼ばれる生活型に区分され、河床の礫などに固着巣をつくり、その入り口に捕獲網を展開して流下してくる食物粒子を捕捉・摂食する濾過摂食者 (filter-feeder) である。河川の底生動物群集は流況が安定すると造網型優占群集に遷移する傾向があり、シマトビケラ科幼虫は個体数・現存量ともに大きくなる。コガタシマトビケラ幼虫も高密度で優占することがあり、河川生態系において重要な生物種の一つである。

コガタシマトビケラは完全変態する昆虫で (下図参照)、卵ー幼虫ー蛹の期間を河川水中で生活し、成虫は陸上生活を送る。成虫の羽化期は4~10月で年2化以上する。幼虫の成長にバラツキがあるため完全にコホートは分かれていない。つまり、農薬が使用される時期は、水中生活期のすべての成長段階 (卵・幼虫・蛹) が存在し、成長段階のそれぞれで農薬から何らかの影響を受ける可能性があることを意味している。幼虫の状態越冬するが休眠はしないので、暖かい室内環境に幼虫を移すと活発に摂餌し成長する。室内の定常環境で安定的に飼育すると年中羽化し産卵するようになる。

以上のように、コガタシマトビケラは生態学的に重要な水生昆虫であり、定常環境では安定して繁殖する性質を持ち、成長段階の判別がしやすいため成長段階別毒性試験法の試験生物に適した生物種である。



マニュアルの概要

第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法

水生昆虫類は河川生態系の物質循環において重要な役割を担っており、古くから生態学者の研究対象となってきた。しかし、その生態学的重要性にもかかわらず、流水環境に生息する水生昆虫の試験生物化に成功した事例は世界的にも多くない。試験生物の要件の一つとして、試験個体を安定供給できる生物種であることが挙げられる。言い換えれば、室内飼育が可能な生物種であることが求められる。流水性水生昆虫の試験生物化が進まないのは室内飼育が困難なことが多いためである。そのような状況のなか、2008年3月に独立行政法人農業環境技術研究所（現 農研機構 農業環境変動研究センター）は、流水性水生昆虫であるコガタシマトビケラの室内累代飼育法を確立し、「コガタシマトビケラの室内飼育法マニュアル」（以降、旧飼育法マニュアル）を公開した。「コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法」は、旧飼育法マニュアル公開以降に得られた新たな知見を加えて内容を大幅に拡充したものである。本マニュアルは、後述の成長段階別毒性試験用の試験個体を安定供給するために必須な飼育技術を詳細に解説している。コガタシマトビケラの入手法には、野外から採集する方法と農業環境変動研究センターから卵塊の状態入手する2つの方法がある。室内飼育法においては、特に試験個体の安定供給にとって重要な幼虫の飼育管理について、農業環境変動研究センターにおける飼育事例の具体的なデータを示しながら詳しく解説している。

第2章 卵を用いた毒性試験法

一部の農薬は昆虫卵に対し毒性が高いことが知られているが、水生生物を用いた既存の生態影響試験法では、水生昆虫類の卵期の影響を評価する手法が提案されていなかった。本章では、これまで考慮されてこなかった卵期における毒性評価を可能とする新しいコンセプトの試験法について解説している。コガタシマトビケラの卵期は適度に長く（20℃で約10日間）、卵塊の形態は平面1層で卵殻が半透明なので胚の観察が容易であり、胚発生が斉一的に進むなど、毒性試験の操作性上の長所がある。卵を用いた毒性試験では、卵を一定期間農薬に曝露したのち洗浄してふ化まで蓄養する。ふ化率とふ化個体の健全性を調べることで卵に対する毒性を評価する。農薬の種類によっては胚発生やふ化個体の形態に特徴的な異状が観察されるので、いくつかの症例を附属資料に提示している。また、本試験法を活用する際の参考として、リングテストによる試験法の妥当性検証と殺虫剤への適用事例について、[第6章 資料編](#)に掲載している。

第 3 章 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法

本章では、ふ化 24 時間以内の 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法を解説している。特殊な作用機作を持つ農薬の場合は例外もあるが、一般的に化学物質に対する感受性は、ふ化以降の後胚期に限ってみれば、体サイズの小さい成長段階の方が高い傾向にある。そのような観点からも、成長段階別毒性試験法の中で最も汎用性が高い試験法といえる。本マニュアルは、2008 年 3 月に独立行政法人農業環境技術研究所（当時）によって公開された「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」を骨子とし、影響の判定に関する資料を大幅に拡充したものである。

ふ化直後の幼虫は他の齢期に比べ遊泳性が高く、試験系に底質や流水環境を必要としないため、流水性昆虫であるにも関わらず止水環境で試験を実施できる。ふ化 24 時間以内の 1 齢幼虫を被験物質に 48 時間曝露し、影響の有無を実体顕微鏡で観察して判定する。試験中は正の走光性を利用して試験容器底面から連続光を照射することにより試験個体の水面への浮上を防止する。影響の判定について具体的な事例を動画等で掲載しており、本種を用いた毒性試験の経験がない試験者でも実施しやすいようなマニュアルの構成となっている。また、本試験法についてはリングテストによる妥当性の検証が行われている（第 6 章 資料編を参照のこと）。

第 4 章 2 齢・3 齢幼虫を用いた急性毒性試験法

本章では、2 齢もしくは 3 齢幼虫を用いた急性毒性試験法を解説している。遊泳性の高い 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法を改良し、2 齢・3 齢幼虫に適用した試験法である。2 齢と 3 齢では体サイズが異なるので試験容器や試験水量など細部の試験条件は異なるが、試験の骨子は共通している。2 齢以降の幼虫は、ふ化直後の 1 齢幼虫に比べると遊泳性が低下し営巣する傾向が強くなる。これは、流水環境に適応した濾過摂食者としての性質が表れたことを示している。本試験法では、止水環境によるストレスを回避するため曝露期間中試験水を回転攪拌して擬似的な流水環境を再現する。幼虫を被験物質に 48 時間曝露し影響の有無を実体顕微鏡で観察して判定する。影響の判定について具体的な事例を動画等で掲載しており、本種を用いた毒性試験の経験がない試験者でも実施しやすいようなマニュアルの構成となっている。

第5章 4齢・5齢幼虫を用いた急性毒性試験法

本章では、4齢もしくは5齢幼虫を用いた急性毒性試験法を解説している。体サイズが大きい幼虫を用いる本試験法は目視による試験観察が可能である。本試験法は、スターラーを用いて試験水を回転攪拌することによって流水環境を擬似的に再現し、試験個体に底質を与えて営巣させることで、より河川環境に近い状態で急性毒性評価が可能となっている。試験前日に試験容器に幼虫を投入し馴化・営巣させたのち、被験物質に48時間曝露して影響の有無を目視観察で判定する。若齢幼虫試験に比べより河川環境に近い状態で試験を実施するので、濾過摂食者としての摂餌行動の有無も影響の判定基準の一つとなっている。影響の判定については、具体的な事例を動画等で掲載しており、本種を用いた毒性試験の経験がない試験者でも実施しやすいようなマニュアルの構成となっている。

第6章 資料編

本章では、成長段階別毒性試験の実施事例を掲載している。まず、成長段階別毒性試験法の妥当性を検証するため、「卵を用いた毒性試験法」および「1齢幼虫を用いた急性毒性試験法」について外部機関で実施されたリングテスト結果を掲載している。リングテストの参加機関数は少なかったものの再現性の高い試験結果となり、試験法の妥当性が示唆された。次に、水生昆虫の卵期に注目した新しいコンセプトの試験法である卵を用いた毒性試験について、試験法の活用を促進するために様々な作用機作の農薬に対する適用事例を概説している。最後に、3種類の農薬について卵から5齢幼虫までの成長段階別毒性試験法を実施した事例を紹介している。農薬の作用機作により感受性の高い成長段階が異なることが示唆されている。

もくじ

はじめに.....	1
コガタシマトビケラについて	3
マニュアルの概要.....	4
第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法.....	4
第2章 卵を用いた毒性試験法.....	4
第3章 1齢幼虫を用いた急性毒性試験法.....	5
第4章 2齢・3齢幼虫を用いた急性毒性試験法.....	5
第5章 4齢・5齢幼虫を用いた急性毒性試験法.....	6
第6章 資料編.....	6
第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法	1-1
1-1. 入手法.....	1-2
(1) 野外からの入手.....	1-2
(2) 室内飼育系統の卵塊の入手.....	1-11
1-2. 室内飼育法.....	1-13
(1) 室内飼育の基本的な環境条件と設備.....	1-13
(2) 卵塊の蓄養.....	1-15
(3) 幼虫の飼育.....	1-18
(4) 成虫の飼育と採卵.....	1-37
(5) 飼育の規模とタイムスケジュール.....	1-44
(6) おかしいな、と思ったら.....	1-47
1-3. 引用文献.....	1-48
1-4. 附属資料.....	1-49
第2章 卵を用いた毒性試験法.....	2-1
2-1. 試験概要.....	2-1
2-2. 被験物質.....	2-2
2-3. 基準物質.....	2-2
2-4. 試験の妥当性.....	2-2
2-5. 試験方法.....	2-2
(1) 主な使用機器・器具類.....	2-2
(2) 供試生物.....	2-4
(3) 曝露方法.....	2-10
(4) 曝露期間.....	2-10
(5) 試験生物数および試験区の設定.....	2-10
(6) 試験水の調製.....	2-11
(7) 曝露の開始と曝露試験条件.....	2-11
(8) 曝露の完了と試験卵の洗浄.....	2-13
(9) 洗浄した試験卵の蓄養条件.....	2-13

(10) ふ化個体の確認	2-16
(11) 観察と判定	2-17
2-6. 限度試験	2-18
2-7. 結果の処理法	2-18
2-8. 報告事項	2-19
2-9. 用語の定義	2-20
2-10. 参考文献	2-21
2-11. 附属資料	2-22
第3章 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法	3-1
3-1. 試験概要	3-1
3-2. 被験物質	3-2
3-3. 基準物質	3-2
3-4. 試験の妥当性	3-2
3-5. 試験方法	3-2
(1) 主な使用機器・器具類	3-2
(2) 供試生物	3-4
(3) 曝露方法	3-7
(4) 曝露期間	3-7
(5) 試験生物数および試験区の設定	3-7
(6) 試験水の調製	3-8
(7) 曝露の開始と試験条件	3-8
(8) 観察と測定	3-11
3-6. 限度試験	3-12
3-7. 結果の処理法	3-12
3-8. 報告事項	3-13
3-9. 用語の定義	3-14
3-10. 参考文献	3-15
3-11. 附属資料	3-16
第4章 2 齢・3 齢幼虫を用いた急性毒性試験法	4-1
4-1. 試験概要	4-1
4-2. 被験物質	4-2
4-3. 基準物質	4-2
4-4. 試験の妥当性	4-2
4-5. 試験方法	4-2
(1) 主な使用機器・器具類	4-2
(2) 供試生物	4-4
(3) 曝露方法	4-7
(4) 曝露期間	4-7
(5) 試験生物数および試験区の設定	4-7
(6) 試験水の調製	4-8
(7) 曝露の開始と試験条件	4-9
(8) 観察と測定	4-12
4-6. 限度試験	4-14
4-7. 結果の処理法	4-14
4-8. 報告事項	4-14

4-9. 用語の定義.....	4-16
4-10. 参考文献.....	4-17
4-11. 附属資料.....	4-18
第5章 4齢・5齢幼虫を用いた急性毒性試験法	5-1
5-1. 試験概要.....	5-1
5-2. 被験物質.....	5-2
5-3. 基準物質.....	5-2
5-4. 試験の妥当性.....	5-2
5-5. 試験方法.....	5-2
(1) 主な使用機器・器具類.....	5-2
(2) 供試生物.....	5-4
(3) 曝露方法.....	5-8
(4) 曝露期間.....	5-8
(5) 試験生物数および試験区の設定.....	5-8
(6) 試験個体の馴化.....	5-9
(7) 曝露の開始（試験水の調製）.....	5-11
(8) 試験条件.....	5-11
(9) 観察と測定.....	5-13
5-6. 限度試験.....	5-15
5-7. 結果の処理法.....	5-15
5-8. 報告事項.....	5-16
5-9. 用語の定義.....	5-17
5-10. 参考文献.....	5-18
5-11. 附属資料.....	5-19
第6章 資料編	6-1
6-1. リングテスト結果.....	6-1
(1) 卵を用いた毒性試験法のリングテスト結果.....	6-2
(2) 1齢幼虫を用いた急性毒性試験法のリングテスト結果.....	6-9
6-2. 卵を用いた毒性試験における殺虫剤の適用事例.....	6-13
6-3. 成長段階別毒性試験の事例.....	6-15
(1) ジフルベンズロンの試験結果.....	6-15
(2) クロチアニジンの試験結果.....	6-19
(3) クロラントラニリプロールの試験結果.....	6-22

第1章 コガタシマトビケラの 入手法・室内飼育法

流水性の水生昆虫であるコガタシマトビケラの野外からの入手法および試験個体を供給するための室内飼育法を解説する。本マニュアルは、2008年に独立行政法人農業環境技術研究所（当時）が公開した「コガタシマトビケラの飼育法マニュアル」を改訂したものである。

毒性試験のためのコガタシマトビケラは、野外で採集した個体を室内で繁殖させるか、農業環境変動研究センターから卵塊の状態で購入することができる。室内では飼育水の回転攪拌と掛け流しにより水質・流水環境を維持し、幼虫を効率的に飼育する。これにより、各成長段階の試験個体を安定的に確保できる。本種は室内環境で交尾・産卵をするので、室内累代飼育が可能な数少ない流水性水生昆虫である。

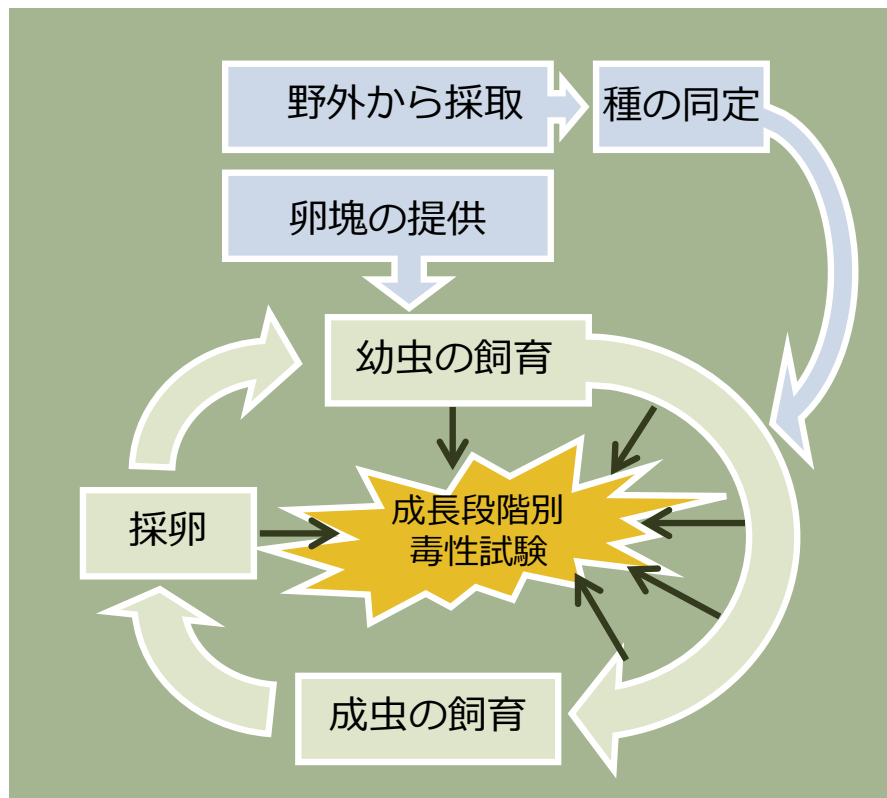


図 1-1 コガタシマトビケラの入手・室内飼育の流れ

1-1. 入手法

コガタシマトビケラを入手する方法を解説する。コガタシマトビケラの入手には、河川から幼虫を生きのまま採集し室内で繁殖させて毒性試験用の試験個体を得る方法と、既に確立している室内飼育系統の卵塊を農業環境変動研究センターから入手し繁殖させる方法がある。

(1) 野外からの入手

1) 注意事項

野外からの入手にあたっては、以下の事項に十分留意すること。

■ 安全を確保する

河川での作業は重大な水難事故につながる可能性がある。救命胴衣等適切な装備を身につけて注意深く作業する。河床の礫表面には付着藻類が繁茂し滑りやすくなっており、足を取られやすい。水の流れがある河川で転倒すると非常に危険である。一人での作業中に水難事故に遭うと発見が遅れるため、作業は複数人で行う。

また、天候の変化にも注意する。作業地点で降雨がない場合でも上流で降った雨により急激に増水することがある。水が濁る等の異状が確認される場合は、直ちに川から離れる等、適切な行動に心がける。

■ 法令等を遵守する

河川での作業にあたっては、各種法令等に留意すること。留意すべき法令等については、参考文献1を参照されたい。

■ 飼育の準備を整えておく

河川から生きのままコガタシマトビケラ幼虫を持ち帰り、速やかに室内環境で飼育を開始するために、事前に飼育器具等を準備しておく(2) 主な使用器具類を参照)。

2) 主な使用器具類

参考として農業環境変動研究センターで使用している器具類を以下に記載するが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。また、文献1および文献2に河川で底生動物を調査する際の装備・器具類の記載があるので参考されたい。

<採集器具等>

装 備：救命胴衣、長靴、ウェーダー、手袋等

採 集 用：Dフレームネット、サーバーネット

ソーティング用：先端が丸くバネ（腰）が柔らかいピンセット（ルーツピンセット、昆虫ピンセットなど）

プラスチックバット（白色）、ジョッキ

<運搬用器具等>

採集したコガタシマトビケラ幼虫を生きのまま持ち帰るため、溶存酸素濃度および水温を適切に維持できる運搬容器を使用する。バケツ式とポリ袋式の2つのタイプがある（図1-2）。目的・状況に合わせてタイプを選択する（表1-1）。運搬容器の準備については、[附属資料1-A 運搬容器について](#)を参照のこと。

運 搬 容 器：バケツ式（33 Lクーラーボックスに2つ収容可能）

ポリ袋式（33 Lクーラーボックスに10袋収容可能）

保 温 容 器：クーラーボックス（33 L容量）

温 度 確 認：おんどとり Jr.（RTR-52, T and D社）（温度データロガー）

<飼育用器具類>（詳細は1-2. 室内飼育法（3）幼虫の飼育を参照）

幼虫飼育水槽：ガラス製大型シャーレ、アクリル製円形水槽（直径30 cm）¹

スターラー²：防水性電磁スターラー（Mixdrive1, 2mag社）、40 mm回転子

底 質：小石（庭園用資材白玉砂利、1~3 cm）

ガラスビーズ（粒径0.6 mm、分量は適宜）

給 気：エアーコンプレッサー（電動エアーポンプでも可）、シリコンチューブ、エアストーン

飼 育 水：脱塩素した上水（掛け流しができる環境が望ましい）

エ サ：テトラフィン粉末（大）、ブラインシュリンプ（補助食として）

藻類懸濁液（調達が可能な場合。[附属資料1-F 補助食としての藻類のバイオフィルム](#)の培養を参照）

¹ 投入する5齢幼虫が~200個体程度の場合。個体数が少ない時は小さなサイズの容器を用いても良い。

² マグネチックスターラーも利用できる。防水性が望ましい。

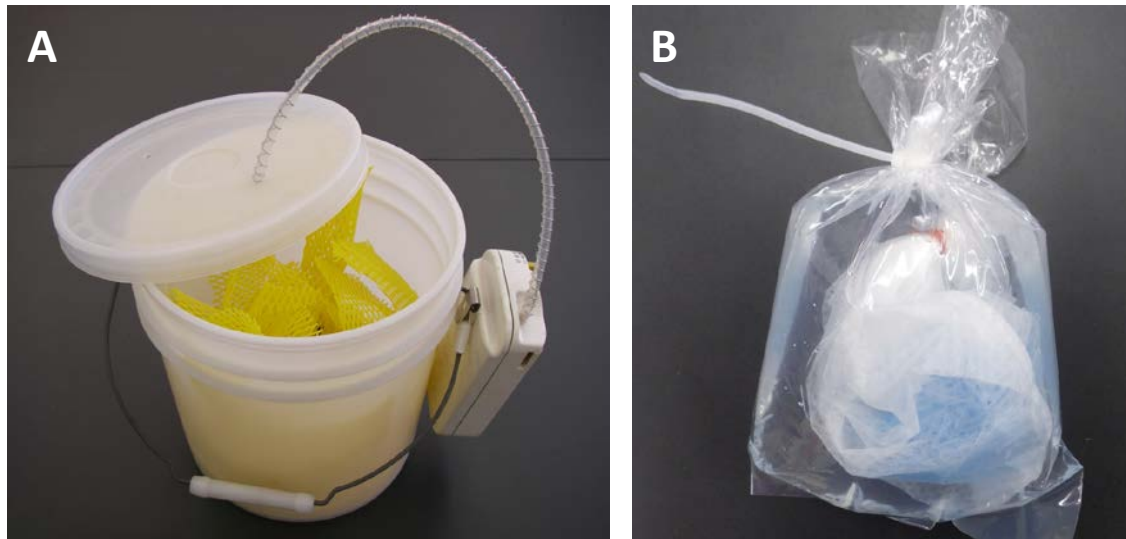


図 1-2 幼虫運搬用容器

- A : バケツ式. 乾電池式エアポンプで酸素を供給する. 幼虫の足場として, 市販のセフティーネットを入れる.
- B : ポリ袋式. 河川水と酸素ガス(スポーツ用)を封入する. 幼虫の足場として, 三角コーナー用の水切りネット(不織布タイプとPE製ネットタイプ)を入れる.

表 1-1 運搬容器の特徴・目安

タイプ	収容個体数	運搬時間	留意点	使用事例
バケツ式	~500 個体	~1 日程度	エアポンプによる給気が必要	近隣の単一地点から大量の幼虫を採集する場合
ポリ袋式	~100 個体	~4 日程度	酸素ガスを充填する必要	長期の調査日程で、複数地点から採集する場合

3) 採集地点の選定

コガタシマトビケラ属幼虫は日本全国に広く分布し、平地河川の上流域から下流域かけて生息する。流況が安定していれば細流や農業用水路等にも生息する(図1-3)。砂礫底の河床のほか、3面コンクリートの水路にも砂粒や植物片を用いて高密度で営巣することがある(図1-4)。



図1-3 コガタシマトビケラ属幼虫が生息している水路・河川

A: 農業用水路. B: 農耕地から隔離された公園等の水路. C: 河川中流域の平瀬.

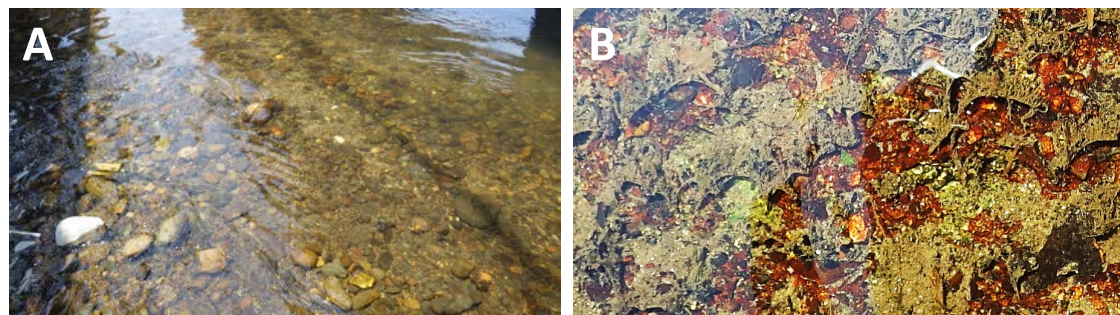


図1-4 コガタシマトビケラ属幼虫が生息している河床

A: 砂礫底. B: コンクリート底(捕獲網がアーチ状に開口している).

採集地点の選定にあたっては、環境省の「全国水生生物調査のページ」(<https://water-pub.env.go.jp/water-pub/mizu-site/mizu/suisei/>)や、国土交通省の河川水辺の国勢調査の結果が掲載されている河川環境データベース(<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/>)、河川底生動物調査の文献等を参考にする。

野外から入手したコガタシマトビケラを農薬の生態影響評価に用いる場合は、採集地点によってコガタシマトビケラの農薬に対する感受性が異なる可能性があることに留意する(附属資料1-B 野外個体群のコガタシマトビケラ属幼虫のフェニトロチオン感受性)。西本(2001)は、有機リン系殺虫剤フェニトロチオンに対するコガタシマトビケラ5齢幼虫の感受性と河川水中の有機リン系殺虫剤の濃度レベルの関連性を指摘し、河川水中濃度が高い地点の幼虫は感受性が低いことを報告している(文献3)。

4) 現場での作業

■ 採集

比較的個体数の多い地点では、河床の礫をバット上に拾い上げ、固着巣から這い出してきた5齢幼虫をピンセットで優しく摘まんで採集する(図1-5A)。現場では正確な同定が難しいので、同定に不慣れな人は取りあえず、シマトビケラ科幼虫を採集しておく(コガタシマトビケラ属幼虫を目視で区別できる人はこの限りではない)。科レベルの判定は文献4が役に立つ。採集した幼虫は河川水の入った運搬容器に入れる(図1-5C, D)。

上記採集法は幼虫を傷つけにくいですが、個体数が少ない現場では必要な個体数を確保するのに時間がかかりすぎる。その場合は、Dフレームネットやサーバーネットを用いてキックスイープ法により採集する(文献1, 2)。これは上流側の河床を蹴る等して攪乱し、流下する底生動物を下流側のDフレームネットで採集する方法である。ネットに十分な底生動物がたまるまで作業を行う。ネットの中身をバットにあけて目的の幼虫を選別し(図1-5B)、河川水の入った運搬容器に移す。

採集する個体数は200個体程度で十分だが、別種も混在している可能性があるため多めに採集する。ただし、コガタシマトビケラは数個体でも室内飼育環境で増やすことができる場合があるので(文献5)、状況に応じて作業を切り上げる。4齢幼虫以下は同定が難しいため、採集対象は5齢幼虫(終齢幼虫)とする。採集作業中、運搬容器に直射日光があたって水温が上昇しないように留意し、採集作業が完了したら運搬容器をクーラーボックスに収容する。

■ 運搬

運搬時は水温の変化に留意する。採集地点の河川水温からおおきく外れないことが望ましいが、運搬に時間がかかる場合は、温度を低めに維持すると良い。特に暖かい季節では運搬容器の水温が上昇する可能性があるため、クーラーボックス内の温度をモニターし、適宜保冷剤等で冷却する。バケツ式の運搬容器を使用する際は、乾電池式エアープンプが停止していないか、チューブが折れて給気が止まっていないか確認する。運搬中に給気が止まった場合、運搬容器内で幼虫が大量に死亡し、生き残った幼虫の死亡率も室内飼育中に上昇する可能性がある。



図 1-5 採集風景

- A : 固着巣から這い出してきたコガタシマトビケラ幼虫。
 B : ソーティング。
 C : 幼虫が入ったバケツ式運搬容器。
 D : ポリ袋式運搬容器に幼虫を投入しているところ。

5) 種の同定

実験室に持ち帰った幼虫を運搬容器中の河川水ごとバットに移す。運搬用器内の基質にしがみついている幼虫をピンセットで優しく引きはがし、タッパーなどの一時プール容器に移す。体サイズ、体色等で大まかにグループ分けし、各グループの一部の幼虫についてアルコールで固定してから実体顕微鏡で観察・同定する。幼虫の同定は文献6を参考とする。我が国では、コガタシマトビケラ属は少なくとも下記の4種が生息している（文献6）。

コガタシマトビケラ *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata, 1927)

ナミコガタシマトビケラ *C. infascia* (Martynov, 1934)

サトコガタシマトビケラ *C. tanidai* (Oláh & Johanson, 2008)

ガロアシマトビケラ *C. galloisi* (Matsumura, 1931)

コガタシマトビケラ属の5齢幼虫の外観はかなり似ている(図1-6)。ナミコガタシマトビケラは腹部が緑色を呈することが多いが、体色は変異が大きいので目安にしかない。コガタシマトビケラ属幼虫の種レベルまでの同定は頭部の形態で行う。頭部前縁にくびれのないガロアシマトビケラと、頭部が明らかに縦長のナミコガタシマトビケラは他2種と容易に区別できる(図1-7B, D)。

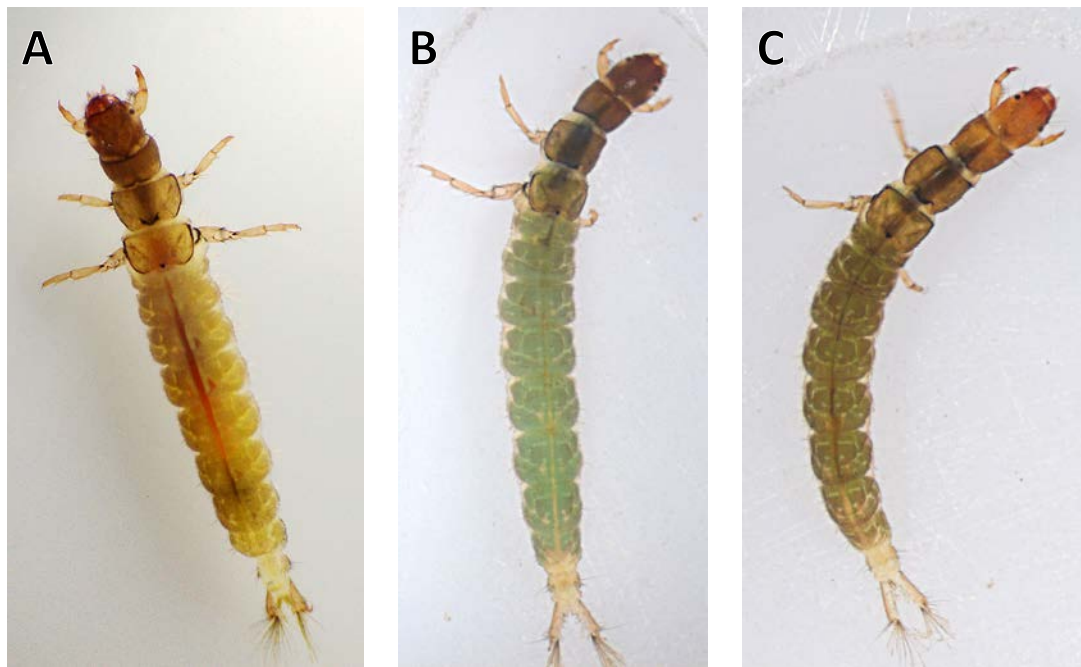


図1-6 コガタシマトビケラ属5齢幼虫

- A: コガタシマトビケラ(茨城県石岡市恋瀬川支流を起源とする室内飼育系統, 2019年)。
- B: ナミコガタシマトビケラ(茨城県常陸大宮市相川, 2013年採集)。
- C: ガロアシマトビケラ(茨城県常陸大宮市相川, 2013年採集)。

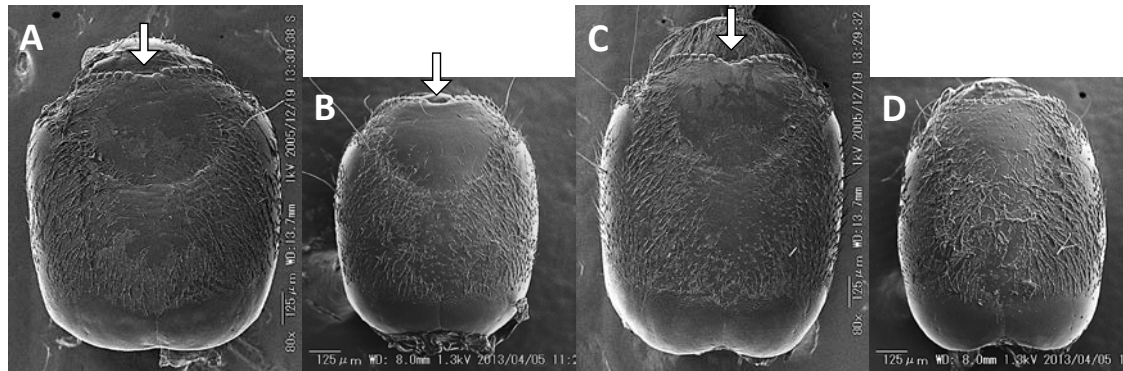


図 1-7 コガタシマトビケラ属 5 齢幼虫の頭部の走査型電子顕微鏡写真

- A : コガタシマトビケラ (愛知県春日井市大谷川, 2005 年採集) .
 B : ナミコガタシマトビケラ (茨城県常陸大宮市相川, 2013 年採集) .
 C : サトコガタシマトビケラと推測される頭部 (愛知県尾張旭市大広三池の上流, 2005 年採集) .
 D : ガロアシマトビケラ (茨城県常陸大宮市相川, 2013 年採集) .
 矢印 : 頭部前縁のくびれ (凹み) .

林 (1998) は、コガタシマトビケラ、ナミコガタシマトビケラ、サトコガタシマトビケラについてはエステラーゼのザイモグラムで種を区別することが可能であると報告している (文献 7) 。また、5 齢幼虫の頭部比 (頭幅/頭長) により、ある程度の種の区別が可能であると考察している。林 (1998) の報告では、各種の平均頭部比は 0.94 (コガタ) 、0.82 (ナミコガタ) 、0.88 (サトコガタ) である (文献 7) ([附属資料 1-C コガタシマトビケラ属幼虫の頭部比 \(頭幅/頭長\) についても参考されたい](#)) 。

6) 飼育の開始

野外で採集されコガタシマトビケラと同定された 5 齢幼虫を室内環境で飼育する。ここでは、幼虫飼育水槽の準備～飼育の開始までを概説する。

- ▶ 幼虫飼育水槽をスターラー上に設置し中央に回転子を置く。底質として小石を均等かつ 1 層に敷き詰める³。回転子の回転を邪魔しないように中央部には底質を置かない。ガラスビーズは適宜投入する (投入しなくても飼育は可能) 。
- ▶ 幼虫飼育水槽に飼育水を満たす (水深 5~6 cm 程度) 。飼育水は掛け流しができる環境が望ましい。掛け流しが可能な場合は飼育水を掛け流し始める。

³ 5 齢幼虫は小石の間隙に営巣するので、スターラーの回転部を除き全体に敷き詰め間隙を増やす。ただし、小石が多層になると排泄物が溜まりやすく除去しにくいので 1 層に敷き詰める。

- ▶ 給気のためのエアーストーンをセットし、給気を開始する。
- ▶ スターラーを回転させ（600 rpm）、飼育水を攪拌する。
- ▶ ピンセットを用いて幼虫を投入する。投入個体数は～200 個体程度／直径 30 cm 容器を目安とする。多くの 5 齢幼虫は翌日までに営巣する（図 1-8）。死亡個体は毎日除去する。
- ▶ ユスリカ等の侵入防止および成虫の逃亡防止のため幼虫飼育水槽の上面を食品用ラップフィルムで覆う（図 1-34）。空気抜き穴をつけると良い。
- ▶ 幼虫投入翌日から給餌を開始する。

幼虫飼育について以下に概説する。具体的な飼育操作（例えば、飼育水槽の清掃方法など）や羽化個体の取り扱い等の飼育手順は [1-2. 室内飼育法の（3）幼虫の飼育](#) を参照のこと。

- ▶ テトラフィン粉末（大）の給餌量は投入した幼虫数に応じて適宜調整する。食べ残しが多い場合は幼虫飼育水槽を清掃し、翌日から給餌量を減らす。可能な場合は補助食としてブラインシュリンプを与える。生き餌は腐敗しやすいので与え過ぎに注意する。
- ▶ 給餌は平日毎日行う。幼虫飼育水槽の清掃も可能な限り毎日行うことが望ましい。
- ▶ 繭が確認されたら 1 週間程度で成虫が羽化してくる。繭の増加とともに給餌量を減らす。



図 1-8 野外から採集した 5 齢幼虫の飼育開始

- A：5 齢幼虫の移し替え。 B：幼虫飼育水槽（ガラス製大型シャーレ）の全景。
C：営巣した 5 齢幼虫。

以上の「野外からの入手」手順に基づき、農業環境変動研究センターではこれまでに、茨城県 2 カ所、神奈川県 1 カ所、青森県 1 カ所、長野県 1 カ所および愛知県 1 カ所から採集したコガタシマトビケラについて、最低でも F2 世代までの室内累代飼育に成功している。2019 年現在では、茨城県の 2 系統および神奈川県の 1 系統について 2004 年より室内環境で維持している。

しかしながら、コガタシマトビケラを除くその他の種のトビケラ幼虫については、近縁のナミコガタシマトビケラを含め、野外から採集した幼虫（P 世代）を羽化させることはできたが（[附属資料 1-D 野外から採集したシマトビケラ科幼虫の飼育結果について](#)）、[1-2. 室内飼育法の（4）成虫の飼育と採卵](#)に従い成虫に交尾・産卵させようとしたところ、いずれの種も成功しなかった。

(2) 室内飼育系統の卵塊の入手

1) 主な使用機器・器具類

参考として農業環境変動研究センターで使用している器具類を以下に記載するが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

<卵塊の状態の確認用>

蓄養容器：ポリスチレン製6穴マルチディッシュ (Nunc、平底ウェル)

飼育水：脱塩素した上水

光学顕微鏡：DMIRB (ライカマイクロシステムズ株式会社)

<飼育用器具類等> (詳細は1-2. 室内飼育法を参照)

幼虫飼育水槽：ガラス製大型シャーレ、アクリル製円形水槽 (直径 30 cm)

飼育水の攪拌⁴：防水性電磁スターラー (Mixdrive1, 2mag 社)、40 mm 回転子

底質：小石 20~30 個程度 (庭園用資材白玉砂利、1~3 cm)

ガラスビーズ 50g (直径 0.6 mm)

給気：エアーコンプレッサー (電動エアーポンプでも可)、シリコンチューブ、エアストーン

飼育水：脱塩素した上水を給水管で飼育室に供給 (掛け流しする)

エサ：テトラフィン粉末 (小) : 0.3 g、ZM 飼料ミシス用 : 0.2 g

2) 室内飼育系統の卵塊の入手

農業環境変動研究センターで維持している室内飼育系統の卵塊を希望する場合は、「コガタシマトビケラ成長段階別毒性試験法マニュアル」の巻末に記載されている連絡先に問い合わせる。必要な卵塊数、納期等について農業環境変動研究センターの担当者と事前に十分調整を行う。卵塊の配布等の手続き・費用等については、別途、農研機構の定めるところに従う。

■ 卵塊が届く前に準備すること

卵塊の到着日が決まったら、到着日に合わせて卵塊を幼虫飼育水槽に投入できるように予め準備しておく。幼虫飼育水槽の準備手順は1-2. 室内飼育法の(3) 幼虫の飼育を参照のこと。前述の(1) 野外からの入手で解説した手順とは異なるので注意する。

⁴ マグネチックスターラーも利用できる。防水性が望ましい。

■ 届いた卵塊の取り扱い

卵塊は飼育水とともにスクリー管瓶に封入され（図 1-9）、保温容器に梱包されて配送される。配布される卵塊の情報（系統、産卵された日、ふ化予定日⁵等）も添付される。

卵塊が到着したら直ちに開梱し、スクリー管瓶から6穴マルチディッシュ（飼育水を10 mL / 穴ずつ分注しておく）へ卵塊を移す。光学顕微鏡を用いて卵塊の発生段階や異常がないかを確認する。卵の発生段階については、[附属資料 1-E 卵塊の胚発生と幼虫飼育水槽の準備の目安](#)、[第2章 卵を用いた毒性試験法](#)および文献 8 が参考となる。コガタシマトビケラ卵のふ化所要日数は20℃の温度条件下で約10日間であるが、輸送時の温度等の環境が変化しているため、産卵日だけでふ化日を正確に予測することはできない。したがって、実際に卵塊の発生段階を観察して判断する。胚の大顎が赤褐色に呈色し、刺毛が顕在化している場合は翌日にはふ化するので、直ちに卵塊を幼虫飼育水槽へ投入する必要がある。



図 1-9 スクリー管瓶に封入された卵塊

（左）産卵用基質から剥がした卵塊。200～300 個の卵が1層に平たく並んでいる。
（右）1本のスクリー管瓶に1卵塊を封入してある。

■ 飼育の開始

1-2. 室内飼育法の（3）幼虫の飼育に基づいて飼育を行う。

⁵ ふ化予定日はあくまで目安であり、諸要因により2日程度の誤差がある。

1-2. 室内飼育法

河川等の流水環境に生息するコガタシマトビケラについて、室内で累代飼育する方法を解説する。幼虫期は流水環境を必要とし水質の変化に敏感であることから、ユスリカ等の既存の試験生物に比べ飼育操作が煩雑である。しかしながら、人工飼料のみでも生育し、狭い空間でも成虫が繁殖行動を行うなど、流水性水生昆虫にしては飼育しやすい面もあり、幼虫期飼育の要点を踏まえれば安定的に増殖させることができ、河川に生息する水生昆虫種の貴重な試験生物としてコガタシマトビケラを活用することができる。

(1) 室内飼育の基本的な環境条件と設備

全ての生活史段階（卵から成虫）の個体と同じ室内環境（飼育室）で同時に飼育することができる。大量飼育には、調節可能な空調・照明装置がある飼育室および飼育水を安定的に供給できる設備を必要とする。基本的な環境条件等を表 1-2 に示す。

表 1-2 室内飼育の基本的な環境条件

環境条件等	設定など	農業環境変動研究センターで使用している設備
気温	・ 20℃程度	恒温室 (幅 2.6m×奥行 3.4m×高 2.4m)
光	・ 明期 12~16h ・ 波長、強度は特に指定しない	40W 白色蛍光灯などの 一般的な室内灯・飼育棚灯
給気	・ 生活史を通して常に供給	エアーコンプレッサー (飼育室に給気管で供給)
飼育水	・ 脱塩素水道水 ・ 水生生物の飼育に良好な天然水（地下水など） ・ 幼虫の飼育水は回転攪拌する	活性炭による上水の塩素除去設備 (飼育室に給水管で供給) スターラー

■ 温度条件

コガタシマトビケラ幼虫（4 齢～5 齢）は水温 11.1℃以上で成長し、高水温（～29℃）時には死亡率が増加する傾向があることが、Mochizuki ら（2007）により示されている（文献 9）。農業環境変動研究センターでは室温・水温ともに 20℃に設定した飼育室で室内飼育システムを維持し

ているが、目的によっては25℃程度まで設定温度を上げることができると考えられる。ただし、設定温度を高くすると成長速度も速くなるため給餌量等の調節が必要になる。

■ 光条件

シマトビケラ科のウルマーシマトビケラ (*Hydropsyche orientalis*) 幼虫は、水力発電の導水路（暗渠・隧道）で成長することが知られており（文献10）、幼虫の成長に光は必須ではないと考えられる。同様に、コガタシマトビケラ幼虫の成長も光条件により制御されない。ただし、成虫の繁殖行動は日長等の光条件が関連する可能性があるため、室内飼育における光条件は野外で成虫が確認される季節の日長を参考にして、明期12～16時間に設定する。光の質・強度は特に指定しない。

■ 給気条件

コガタシマトビケラ幼虫が生息している河川の平瀬では河川水中の溶存酸素濃度は高い傾向にある。特に卵～蛹までの水中生活期の溶存酸素の供給は重要である。したがって、室内飼育では卵の蓄養水、幼虫の飼育水および産卵水槽の水は常に給気し酸素を供給する。

■ 飼育水

飼育水は上水を活性炭処理もしくは十分曝気して脱塩素した水を用いる。または、水生生物の成育に良好な天然水（地下水など）を用いる。

幼虫は流水を利用して摂餌しているため、飼育水を回転攪拌し流水環境を擬似的に再現する必要がある。ただし、コガタシマトビケラの幼虫は湖沼沿岸にも分布するという報告（文献6）があるように、シマトビケラ属の幼虫に比べると緩流で飼育が可能であり、一般的なマグネチックスターラーなどで発生させることができる回転流で十分飼育することができる。



図1-10 農業環境変動研究センターにおける室内飼育環境の事例（大量飼育モード）

(2) 卵塊の蓄養

後述の(4)成虫の飼育と採卵にしたがって得た卵塊を蓄養する方法を解説する。卵塊の蓄養は、[第2章 卵を用いた毒性試験法](#)や[第3章 1齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)を実施するにあたり卵塊を試験個体として供給するまでの適切な管理と、室内飼育の新規参入個体として幼虫飼育水槽に投入するまでの維持を目的とする。幼虫期と異なり卵期は止水でも十分曝気すれば蓄養可能である。

1) 主な使用機器・器具類

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

蓄養容器	プラスチック製バット等(産卵用基質に産み付けられた卵塊が完全に水に浸かる深さの容器) ポリスチレン製6穴マルチディッシュ(Nunc, 平底)
給気	エアークンプレッサー(電動エアポンプでも可)、シリコンチューブ、エアーストーン
水温計	おんどとり Jr. (RTR-52, T and D 社)
光学顕微鏡	DMIRB(ライカマイクロシステムズ社) 卵塊観察用
飼育水	脱塩素した上水(卵塊の蓄養では掛け流しはしない)

2) 蓄養の手順

■ 注意事項

- 飼育水の蒸発による卵塊の乾燥に注意する。卵塊は乾燥に弱く、数分間空気中に露出しただけで死亡する可能性がある。
- 蓄養の水温を安定に保つ。特に、卵塊を試験個体として用いる場合は、温度によって発生の進み方が変わるので注意する。
- 卵塊を飼育に供する場合は、ふ化直前ではなくふ化の2~3日前に幼虫飼育水槽に移す。卵のふ化所要日数は20℃の温度条件下で約10日間であるが、雌成虫が産卵したタイミングは正確には分からないので1日程度の誤差がある。万が一、蓄養容器内でふ化が始まってしまうと後片付け等の労力がかかるため、早めに移した方が良い。

■ 産卵用基質とともに蓄養する場合

- 蓄養容器に飼育水を満たし十分に曝気する。卵塊を産卵用基質ごと蓄養する。卵塊が完全に水中にあることを確認する。また、産卵面がよく曝気されるように産卵用基質を配置する⁶ (図 1-11)。
- 蓄養中、蒸発による飼育水の減少に注意する。減少分は適宜飼育水を補充する。
- 飼育水の水温を測定し、逸脱がある場合は適切な対処を行う。
- 実体顕微鏡で卵塊の発生段階を確認し、所定の発生段階の卵塊を試験個体として用いる、もしくは幼虫飼育水槽に移す。卵の発生段階については、[附属資料 1-E 卵塊の胚発生と幼虫飼育水槽の準備の目安](#)、[第 2 章 卵を用いた毒性試験法](#)および文献 8 を参考されたい。
- 蓄養容器に藻類等が発生してきたら、新しい蓄養容器に産卵用基質を移す。

■ 卵塊のみを蓄養する場合

- ヘラを用いて卵塊を産卵用基質から剥離させる。ヘラは片刃のものを用いる。ステンレス製ミクロスパーテルのヘラの部分を研磨して作成する ([附属資料 1-G 卵塊剥離用の金属ヘラの作成](#))。産卵当日の卵塊は潰れやすいので、剥離させる場合は産卵から 1 日以上経過した卵塊とする。なお、ヘラを使用して卵塊を剥離させることができるのは、産卵用基質がレンガ・タイル・塩ビ板などの平面の場合であり、自然石の場合はミクロスパーテルの匙の部分で掻き取る。この場合卵が潰れることがある。
- 飼育水を満たした 6 穴マルチディッシュに 1 卵塊/穴ずつ投入する。
- 1 日 1 回、6 穴マルチディッシュを揺すって飼育水を攪拌する。蒸発による飼育水の減少に注意する。
- 光学顕微鏡で卵塊の発生段階を確認し⁷、所定の発生段階の卵塊を試験個体に用いる、もしくは幼虫飼育水槽に移す。

⁶ 産卵面に遮蔽物があると卵塊に酸素が行き渡らず発生の遅れや死亡の原因となるので、産卵用基質の配置に注意する。

⁷ 産卵用基質から剥離した卵塊は、発生速度が速くなる傾向があるので注意する。

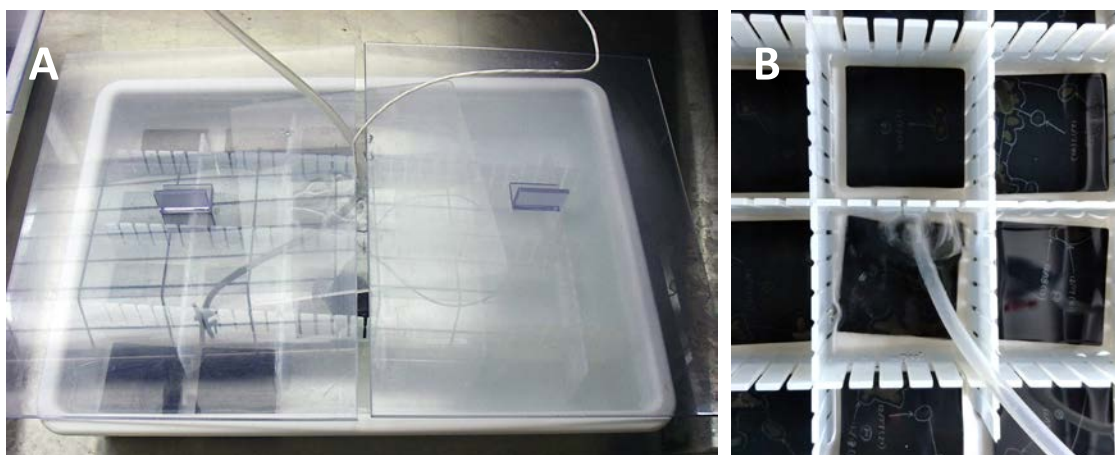


図 1-11 卵塊の蓄養

- A : 全景. 飼育水蒸発防止のため蓋をしている. 給気チューブと温度センサーが挿入されている.
- B : 容器内の様子. 産卵用基質 (黒色塩ビ板) 同士が重なりあって卵塊を遮蔽しないように間仕切りしてある. 間仕切りには隙間があり飼育水は水平移動できる.

(3) 幼虫の飼育

試験個体を安定供給するためには幼虫期の飼育を良好に保つことが最も重要である。幼虫を室内で大量飼育するポイントは給餌、飼育水、底質の適切な管理である。特に飼育水の管理は独特であり、流水環境を室内で再現するためスターラー等で飼育水を回転攪拌し、水質を維持するために飼育水を掛け流しながら飼育する。

1) 主な使用機器・器具類

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。断りが無い限り、幼虫飼育水槽1個に必要な個数・分量を示す。

- 幼虫飼育水槽：アクリル製円形水槽（特注、掛け流し器具つき）1式
 なお、下記の容器も代替できる
 スチロール製円形水槽（特注、掛け流し器具つき）1式
 ガラス製大型シャーレ（市販、掛け流し器具は自作する）1式
- 給 気：エアーコンプレッサー（電動エアーポンプでも可）、
 シリコンチューブ、エアーストーン1式
- 飼育水供給：脱塩素した上水を給水管で飼育室に供給（掛け流しする）
- 排水処理：古い飼育水は沈殿・濾過層を経て下水に排水
- 飼育水の攪拌：防水性電磁スターラー（Mixdrive1, 2mag社）、1式
 防水性マグネチックスターラー（B1およびCB-4, アズワン）も可
 30～40 mm 回転子
- 底 質：小石 20～30 個程度（庭園用資材白玉砂利、1～3 cm）
 ガラスビーズ 50 g（粒径 0.6 mm）
- エ サ：テトラフィン金魚のえさ（スペクトラムブランドジャパン社）
 珪藻代替飼料 ZM 飼料ミシス用（株式会社ヒガシマル）
 ブラインシュリンプ（ベトナム産、株式会社藤本太陽堂）
 培養した藻類バイオフィーム
- 清掃用具類：ルーツェピンセット 1 個
 駒込ピペット（10 mL、先端を切断し広口にする）1 本
 灯油ポンプ（吸い込み口のパイプの長さを調節しておく）1 本
- その他：食品用ラップフィルム（幼虫飼育水槽の蓋）
 アルミホイル（幼虫飼育水槽の覆い）
 ビニールテープ
 小型の計量スプーン（給餌用）

■ 幼虫飼育水槽と掛け流し器具

スターラーにより飼育水を回転攪拌して流水環境を再現するため円形的水槽を用いる（図 1-12）。直径 20～30 cm の水槽を用いる。飼育水を掛け流すため飼育水槽に掛け流し器具を取り付ける。

掛け流し器具にはオーバーフロー式とサイフォン式がある（図 1-13）。樹脂製の円形水槽には穴をあけてオーバーフロー式の掛け流し器具を、ガラス製の円形水槽にはサイフォン式の掛け流し器具を取り付ける。サイフォン式はガラス管（外径 8 mm 程度）をバーナーで熱して曲げて自作することができる。

オーバーフロー式の場合、水位調節には掛け流し器具の固定ナットを緩め角度を調節するか、排水口のチューブの固定ナットを緩めて長さを調節する。サイフォン式の水位調節は排水口のシリコンチューブの長さを調節する。表 1-3 に各種幼虫飼育容器の仕様等を示す。

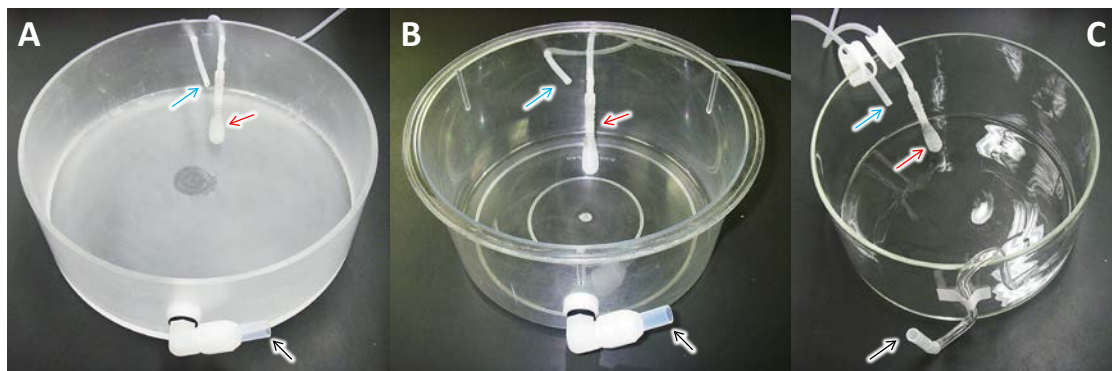


図 1-12 幼虫飼育水槽

A：アクリル製円形水槽（特注品、直径 30 cm）。

B：スチロール製円形水槽（特注品、直径 24 cm）。

C：ガラス製丸形水槽（市販品、直径 24 cm）。

黒矢印：掛け流し器具。水色矢印：給水チューブ。赤矢印：給気チューブ。

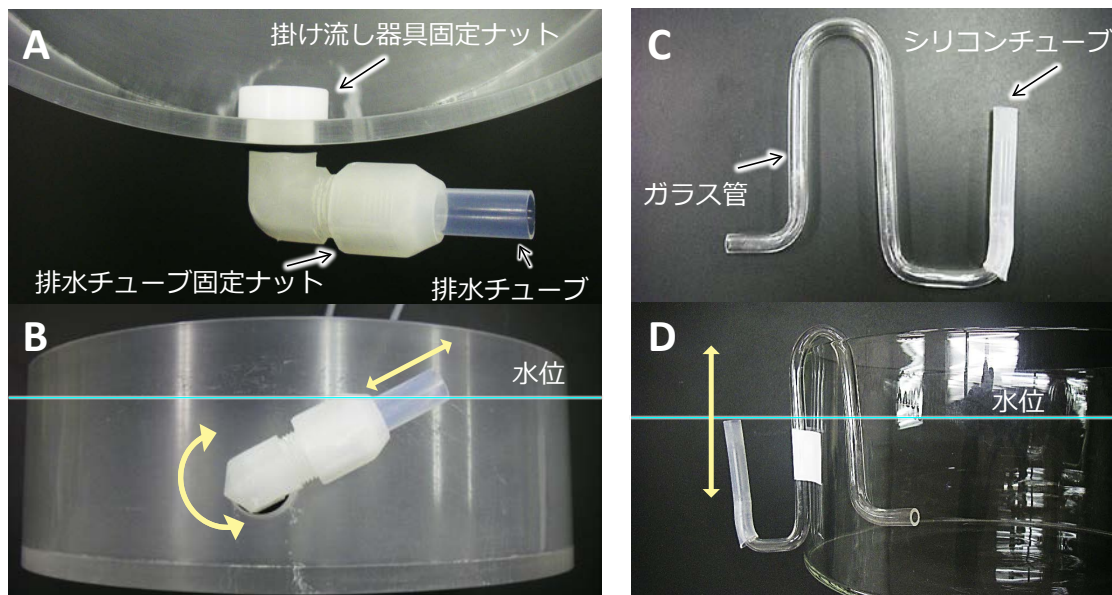


図 1-13 掛け流し器具

- A：オーバーフロー式（上面）． B：同（側面）．
 C：サイフォン式（側面）． ガラス管は外径 8 mm、内径 5 mm．
 D：サイフォン式の本体への取り付け（ビニールテープで固定）．

表 1-3 各種幼虫飼育水槽の仕様等

容器の種類	アクリル製円形水槽	スチロール製円形水槽	ガラス製 シャーレ・丸形水槽
大きさ	外径 30cm×高さ 10cm	外径 24cm×高さ 12cm	外径 24～30cm
掛け流し器具	オーバーフロー式		サイフォン式
水位の調節方法	<ul style="list-style-type: none"> ・掛け流し器具の角度調整 ・排水チューブの長さの調節 		<ul style="list-style-type: none"> ・排水口のシリコンチューブの長さの調節
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプラテック社特注品 ・単価（当時）： 13,125 円（本体） 3,500 円（掛け流し器具） 	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプラテック社特注品 ・単価（当時）： 6,000 円（本体） 3,500 円（掛け流し器具） 	<ul style="list-style-type: none"> ・市販品 ・単価： 18,000～26,000 円（本体） * 掛け流し器具は自作する
注意点	スターラーの回転子の回転部分が摩耗して削れてくる		<ul style="list-style-type: none"> ・容器の破損に注意する ・掛け流し器具のガラス管内に幼虫が営巣し詰まることがある

■ 飼育水の攪拌

スターラーと回転子を用いて飼育水を回転攪拌し、流水環境を擬似的に再現する。各種のスターラーが使用可能だが、水生生物の飼育では水漏れ事故の可能性があるので、防水性の製品が推奨される。前述の電磁スターラーはモーターがないため長寿命である。

水漏れ事故の際に飼育水が電気機器類にかからないように、可能な限りコンセント等電気関係のものは飼育棚の上側に設置することが求められる（図 1-14）。



図 1-14 幼虫飼育の事例

飼育水がかからないように非防水性の機器類やコンセント類を上側に設置している。

■ 底質

コガタシマトビケラの固着巣の巣材として底質が必要となる。底質として天然の小石や砂を利用できるが、幼虫の成長を観察しやすいように、飼育容器に投入する小石には園芸用の白玉砂利（1～3 cm）とガラスビーズ（粒径 0.6 mm）の使用が推奨される（図 1-15）。底質は使い捨てでも良いが、使用した底質を洗浄してからオートクレーブで滅菌して再利用することもできる。



図 1-15 底質として用いる小石（左）とガラスビーズ（右）

■ エサ

京都市賀茂川におけるコガタシマトビケラ幼虫の食性調査によると、その消化管内容物は藻類とデトリタスで構成されていた（文献 11）。野外の幼虫は捕獲網に捕捉した栄養価のある粒子を選択せずに摂食していると考えられる。室内では、栄養価の高いテトラフィン粉末等の人工飼料のみで飼育できることが分かっている（文献 5）。さらに、生き餌（ブラインシュリンプ、ミジンコ、藻類）も活発に摂食するようである。

室内飼育における幼虫のエサは、取り扱いの便利さから人工飼料を基本とする（表 1-4）。「テトラフィン金魚のえさ」は大きなフレーク状で幼虫には大きすぎるため粉末状にして与える。幼虫の成長に合わせて3段階の粒子サイズのテトラフィン粉末を準備する（図 1-16、[附属資料 1-H 幼虫のエサ用のテトラフィン粉末の調整法](#)）。「珪藻代替飼料 ZM 飼料ミシス用」は粒子サイズが小さいため1齢～3齢幼虫用のエサとしてそのまま与える。

さらに、補助食として生き餌を与えても良い。入手しやすい生き餌としてブラインシュリンプが挙げられる。前掲したブラインシュリンプの製品はふ化率が90%以上と高い。ブラインシュリンプは腐敗しやすいため過度に与えず、あくまでも補助的に与える。藻類も補助食として役立つ。ガラス温室等の設備がある場合は藻類の培養を推奨する。培養方法は[附属資料 1-F 補助食としての藻類のバイオフィルムの培養](#)に示す。培養に時間はかかるが滅菌等の煩雑な操作をせずに培養できる。

表 1-4 各エサの特徴

エサの種類	粒子径	主な用途	注意点
テトラフィン粉末（小）	< 53 μm	1～2 齢用	・ 食べ残さない程度に与える
テトラフィン粉末（中）	< 250 μm	3～4 齢用	
テトラフィン粉末（大）	250～500 μm	4～5 齢用	
ZM 飼料ミシス用	10～30 μm	1～3 齢用	
ブラインシュリンプ（補助食）	400 μm	4～5 齢用	・ 腐敗しやすいので与えすぎに注意する
藻類（補助食）	2 mm メッシュで裏漉し	1～5 齢用	・ 若齢に与えるときは、藻類懸濁液の上澄みの細かい粒子のものを与える

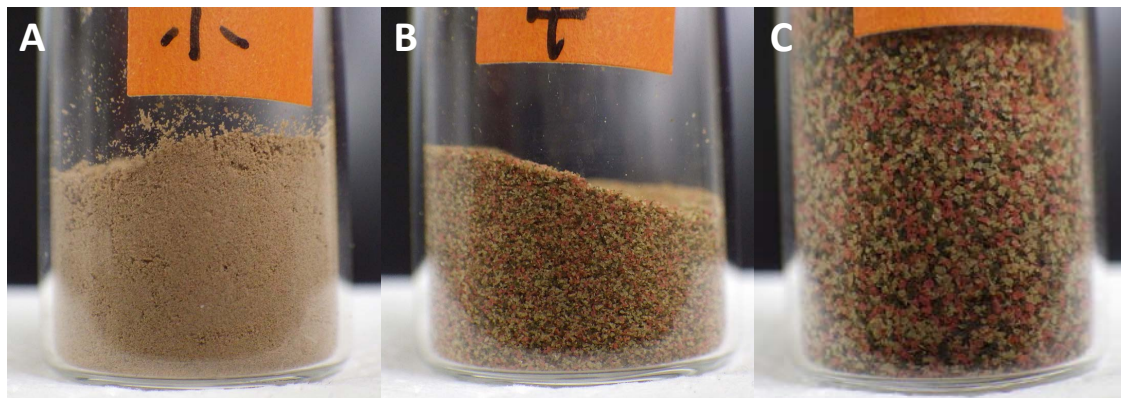


図 1-16 幼虫のエサ用のテトラフィン粉末

- A：テトラフィン粉末（小）粒子サイズ<53 μm.
 B：テトラフィン粉末（中）粒子サイズ<250 μm.
 C：テトラフィン粉末（大）粒子サイズ 250–500 μm.

2) 飼育水槽の準備と飼育の開始

後述の(4)成虫の飼育と採卵にしたがい得られた卵塊から飼育する方法である。前述の1-1. 入手法(1) 野外からの入手とは操作が異なるので留意する。

アクリル製円形水槽（外径 30 cm）を飼育水槽として用いる場合を例として以下に解説する。サイズの異なる水槽を用いる場合は、例示したエサおよび底質の数量に底面積の比率をかけて補正する。

■ 飼育水槽の準備

ふ化個体の定着を促すために、ふ化個体が摂食できるサイズのエサ粒子を底質に均一に沈殿させ、初期のエサを提供することが肝要である。

- ▶ スターラーの中央に水槽の中心がくるように幼虫飼育水槽を置き、給水チューブを取り付け飼育水を満たす。水深は 5~6 cm に設定する。掛け流し器具と水槽本体の間から水漏れがないことを確認する。また、掛け流し器具と排水溝の位置を調整し、排水が漏出しないことを確認する。
- ▶ 給気チューブを飼育水槽に固定し、チューブの先端にエアーストーンを取り付ける。この時点ではまだ給気を開始しない。
- ▶ 回転子を水槽の中央に置く。次に底質を投入する。ただし、回転部には底質を入れない。まず、小石を 20~30 個程度均等に配置する。次いで、ガラスビーズ（粒径 0.6 mm）50 g を全体的に均一になるように投入する。ガラスビーズの投入方法は[附属資料 1-I 幼虫飼育水槽の準備（底質のガラスビーズの投入方法）](#)を参照されたい。

- ▶ ZM 飼料ミシス用 0.2 g およびテトラフィン粉末（小） 0.3 g を 20 mL のスクリー管瓶に秤量し、飼育水を入れ良く振って懸濁させる。この懸濁液を穏やかに飼育水槽に回し入れる（1周で全量回し入れる）。懸濁液は一晩で飼育水槽内を自然に拡散し均一化する。食品用ラップフィルムで飼育水槽に蓋（図 1-34）をして 1 日静置する。
- ▶ 比較的大きなエサ粒子は翌日までに底質上に均一に沈殿する（図 1-17A, B）。一晩たっても水中に浮遊しているエサ粒子はこれ以上静置しても沈殿しない微細な粒子であり腐敗の原因となるので、新鮮な飼育水を掛け流して排出する。掛け流し量は沈殿したエサ粒子が巻き上がらない程度にする。同時に給気を開始する。給気量が多いと沈殿したエサが巻き上がるので注意する。濁りの除去は最低 2 日間行う（図 1-17C, D）。2 日経っても飼育水の濁り・泡立ち（水槽の水際に細かい気泡がたまる等）・生臭い強い臭気⁸が確認される場合は、掛け流し量を増やし、飼育水槽内が清浄になるまで掛け流す期間を延長する。
- ▶ 水槽内の水が透明になったら、スターラーにより飼育水の攪拌を開始する。攪拌は沈殿したエサ粒子を巻き上げないように低速（100 rpm）とする。

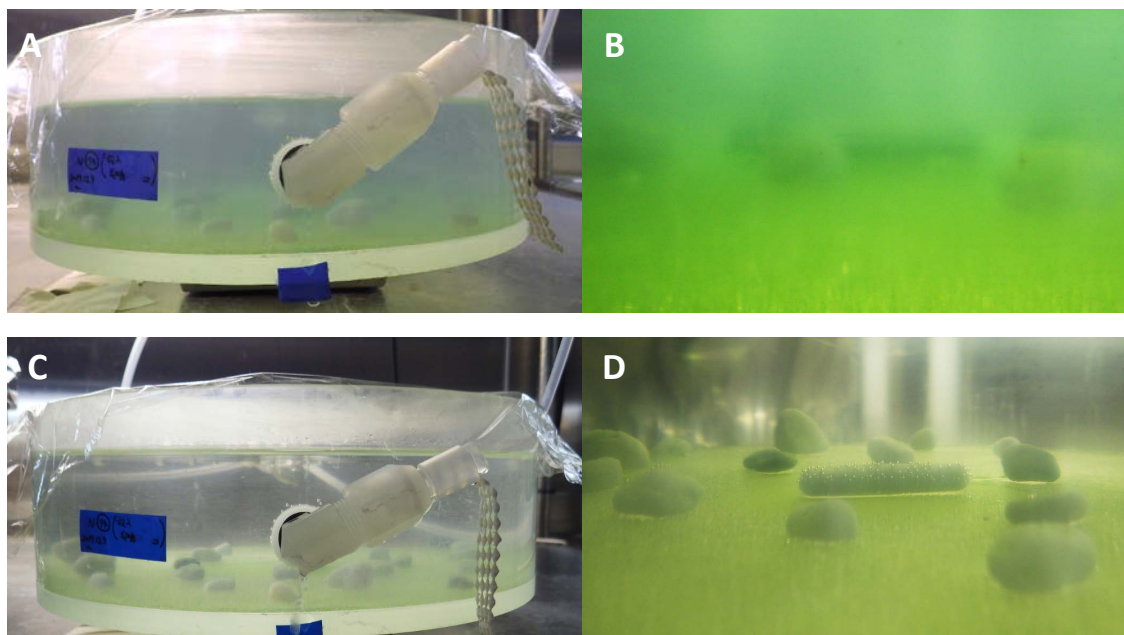


図 1-17 幼虫飼育水槽の準備

- A : エサの懸濁液を投入して 1 日静置させた水槽。
 B : A の拡大写真。水の濁りは沈殿しなかった微細なエサ粒子。緑色は ZM 飼料由来。
 C : 飼育水の掛け流しを開始して 2 日後の水槽。
 D : C の拡大写真。水は透明になり底質にエサ粒子（緑色）が均一に沈殿している。

⁸ 飼育水槽の飼育水がこのような状態の場合は、水が腐敗している可能性があり、1 齢幼虫に致命的な影響を与える可能性がある。

■ 飼育の開始

- 飼育水槽内の水が清浄になったら、掛け流し量を 30 mL/分に設定する。
- 給気量を極力抑える。給気が多いとふ化個体が気泡に捕捉され水面浮上して死亡することがある (図 1-18)。
- ふ化 2~3 日前の発生段階に達した卵塊を投入する (図 1-19)。1 個の飼育水槽に投入できる卵塊数に制限はないが、1 つの飼育水槽で羽化できる個体は 900 個体程度であり、投入卵塊数は数十個程度で十分である。やむを得ない事情を除き⁹、卵塊の過剰投入は飼育効率 (投入した卵数に対する羽化数の割合) を低下させる。
- 1 つの飼育水槽に卵塊を投入する期間は 2 週間~半月程度である (大量飼育モードの場合)。初期に投入した卵塊からふ化した個体が 4 齢幼虫以上に成長した状態の水槽に、新たに卵塊を投入してもふ化個体の定着率は極端に低下する。
- 卵塊を投入しはじめてから 2 週間~半月程度たったら、新しい幼虫飼育水槽を準備する (前述の ■ 飼育水槽の準備 の手順に戻る)。飼育水槽の更新スケジュールについては、(5) 飼育の規模とタイムスケジュール を参照されたい。
- 当初、ふ化個体は底質に沈殿したエサ粒子をはぎ取って摂食し、かつ巣材としても利用する (図 1-20)。
- 以降の飼育に関しては後述の 3) 幼虫の飼育管理 以降を参照する。

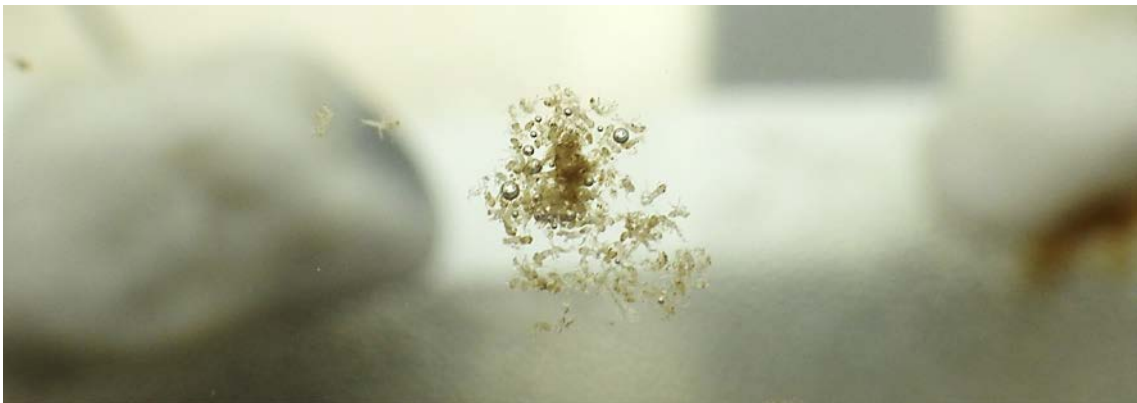


図 1-18 回転流の渦の中心に寄せ集められた水面浮上個体 (給気の気泡にトラップされた)

⁹ 大量飼育が軌道にのると、試験では使い切れないほど卵塊が大量に得られるようになる。余剰卵塊は全て飼育にまわるので、やむを得ず 1 つの幼虫飼育水槽に数百個の卵塊を投入する場合もある。

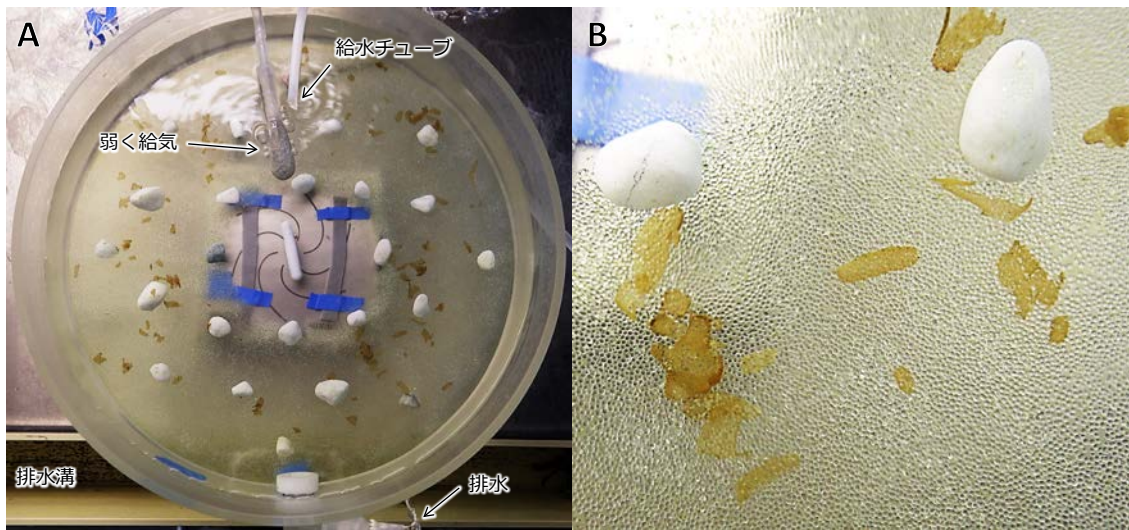


図 1-19 卵塊投入直後の新規幼虫飼育水槽
A：全景．B：拡大写真．投入された卵塊が散在する．

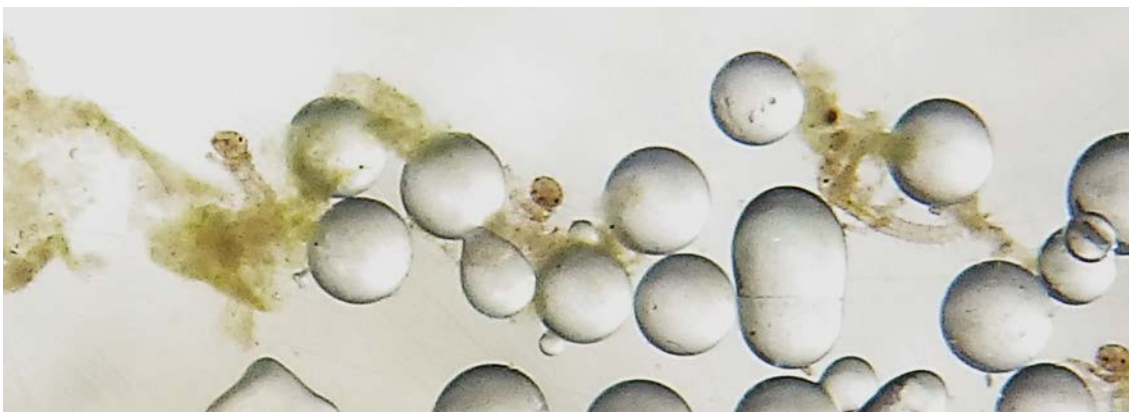


図 1-20 営巣したふ化個体
沈殿したエサ粒子を摂食しつつ巣材としても利用している．

3) 幼虫の飼育管理

幼虫の飼育管理の要点は、幼虫の成長にあわせた給餌、給気、飼育水および底質の管理を行うことである。表 1-5 にアクリル製円形水槽（直径 30 cm）を用いた飼育の場合の管理の目安を示す。サイズの異なる飼育水槽を用いる場合は、例示した給餌量に飼育容器の底面積の比率をかけた補正する。なお、飼育における幼虫齢期の判断は厳密でなくてもよい。慣れれば目視でおおよその区別がつく。正確な齢期判定を行いたい場合は頭幅を測定する必要がある。齢期判定の詳細は第4章 2 齢・3 齢幼虫を用いた急性毒性試験法を参照のこと。

表 1-5 アクリル製円形水槽の場合の幼虫の飼育管理の目安

平均的な経過日数	0~3	3~13	14~17	18~22	23~26	27~42	43~50	51~80	~120
水槽内の状態など	飼育水槽の準備	卵塊投入 1齢出現	1齢多い 2齢出現	2齢多い 3齢出現	3齢多い 4齢出現	4齢多い 5齢出現	5齢多い 成虫出現	蛹多い 羽化続く	生残幼虫 を後発水 槽に移す
給餌（1日当たり）	テトラ（小）	0.04→0.08g（14日～）							
	ZM飼料	0.04→ 0.08g		0.08g					
	テトラ（中）*			0.08→ 0.25g	0.25→ 0.5g	0.25→ 0.5g	0.25→ 0.05g		
テトラ（大）*					0.5g		0.5→ 0.1g		
緑藻（補助）			細かい藻類塊（懸濁液の上澄み）を与える		藻類懸濁液を与える （成長や個体数にあわせて懸濁液の添加量を調整する）				
ブイシロング（補助）							与える （過度に与えないように注意）		
給気	無	2日目から非常に弱く給気						十分に給気する	
飼育水	回転攪拌 (rpm)	無	100 200 300	400	500	600			
	掛け流し (mL/分)	底質を巻き上げない流量		30	50				
底質	無	吹き溜まった工サ・糞を再分散させる				平日1日1回底質の清掃を実施			

*給餌量が多いので2回に分けて与える。夕方に沈殿した工サをピペットで再懸濁させる。

■ 給餌の管理

<留意点>

給餌は平日毎日行う。幼虫の成長にあわせてエサ粒子のサイズ・給餌量を変更する（表 1-5、[附属資料 1-J 幼虫の飼育管理の事例](#)）。実際の飼育では幼虫の成長具合や個体密度などが飼育容器によって異なるため、飼育水槽内の状況を観察しエサ粒子サイズの切り替えのタイミングや給餌量を適宜調整する。参考として図 1-21 に農業環境変動研究センターで 2016 年 6 月 10 日から 2017 年 1 月 27 日にかけて飼育を実施したアクリル製円形水槽 7 個（1 容器当たりの平均卵塊投入数 331 個、最小～最大：94～601 個）の水槽別の給餌実績を示す。飼育水槽を準備した日を 0 日目として経過日数で給餌量の変化を示してある。水槽の状態の違いにより給餌量に大きな差があることが分かる。60 日以降、テトラフィン粉末（中）を再び給餌し始めているが、これはテトラ（大）よりも粒子サイズが小さく、幼虫個体密度が減った飼育水槽内でよく分散し、捕獲網に捕捉される機会が増えると期待されるからである。なお、60 日以降、テトラ（中）と（大）を同時に与えているように見えるが、個別水槽毎に見ると、テトラ（大）から（中）へ完全に給餌を切り替えている。

毎日の給餌の際に、給餌量を秤量するのは手間がかかるので、あらかじめ小型の計量スプーンですり切り 1 杯分の分量を秤量しておき、計量スプーンの杯数で給餌量を調整するとよい。

■ [底質の管理](#)でも述べるが、底質を清掃する際に前日与えたエサの食べ残しがある場合は給餌量を減らさなければならない。

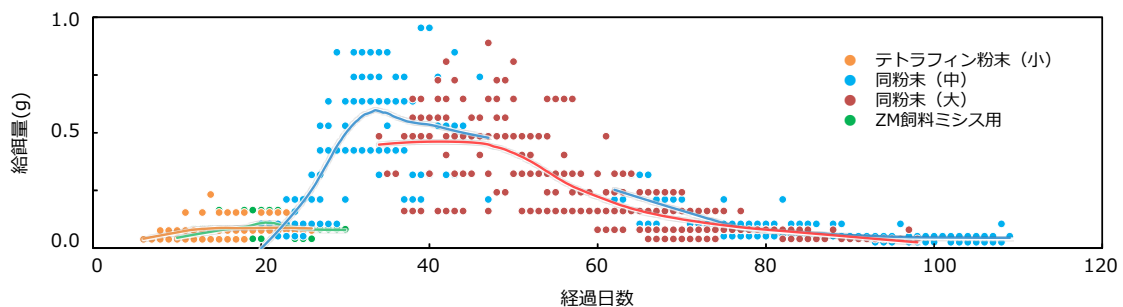


図 1-21 幼虫飼育における日々の給餌量実績

アクリル円形水槽 7 個の実績を示す。実線はカーネル平滑化曲線を示す。各飼育水槽の状態の違いによって給餌のタイミングと量は大きくばらつく。

<給餌の概要>

卵塊の投入を開始してから数日間は、飼育水槽を準備した際に最初に投入したエサ粒子が消費されるため新たな給餌は行わない。当初底質に沈殿したエサ粒子（図 1-22A）は数日でふ化個体の摂食・営巣活動、微生物の分解作用等により底質から剥がれて塊となる（図 1-22B）。このようなエサの塊は広口にした駒込ピペットで緩やかに水流を起こして分散させる。

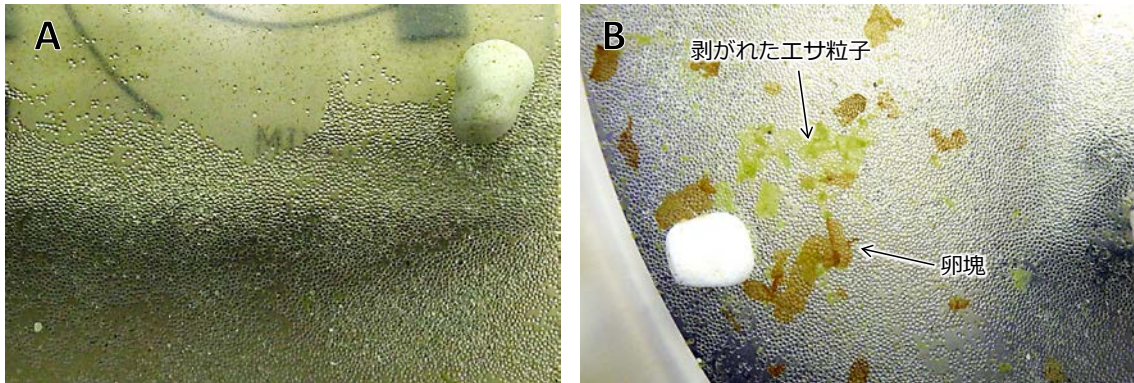


図 1-22 卵塊投入直前 (A) と数日後 (B) の飼育水槽内の底質の様子

エサ粒子が剥離した塊は、分散させることにより 1 齢幼虫に消費されやすくなり数日で消費される。以降は、テトラフィン粉末 (小) と ZM 飼料を給餌する。給餌する際は、ダムにならないように茶漉しを使って振り入れると均一に分散する (図 1-23)。テトラフィン粉末 (小) は主に 2 齢幼虫期まで、ZM 飼料は 3 齢幼虫期まで与える (表 1-5)。

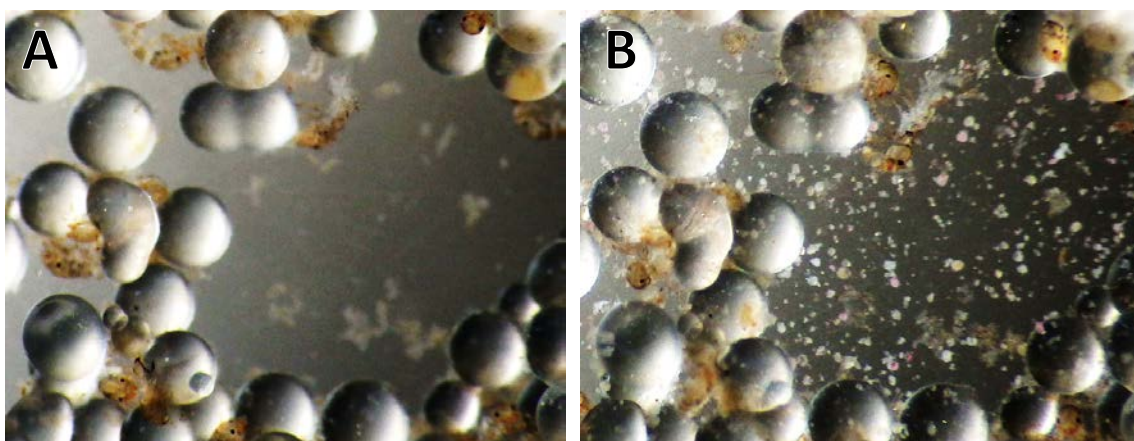


図 1-23 テトラフィン粉末 (小) の給餌前 (A) と給餌後 (B) の飼育水槽底の様子
テトラフィン粉末 (小) が均一に分散・沈殿している (B)。幼虫は 1 齢幼虫。

4 齢幼虫が出現し全体的に 3 齢幼虫が多くなったら、テトラフィン粉末（中）を給餌する。成長とともに給餌量を増やす（表 1-5）。4 齢幼虫が多くなったらテトラフィン粉末（大）も給餌しはじめ、徐々に（大）に切り替えていく。この時期の給餌量が多いので、給餌する際は一度に 1 日分全てを与えるのではなく 2 回以上に分けて与える。また、与えたエサが小石や巣の脇に溜まることがあるので、夕方に広口の駒込ピペットで懸濁させて幼虫に再分配するとよい（図 1-24）。

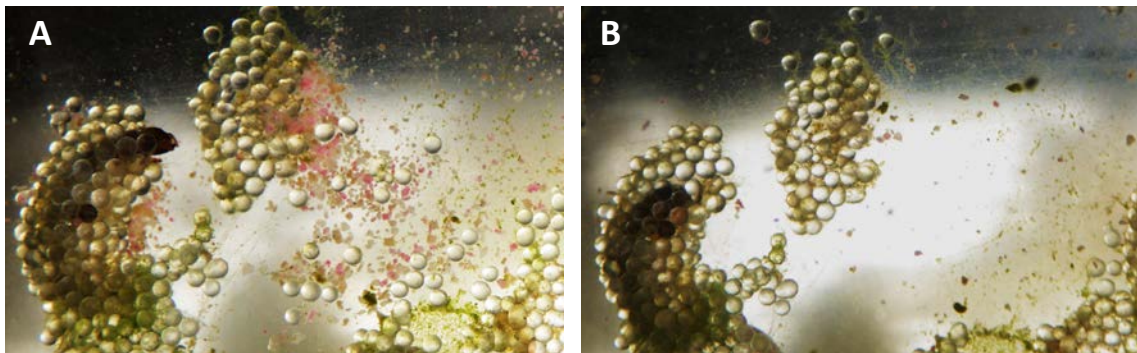


図 1-24 固着巣の脇に溜まったテトラフィン粉末（大）（A）と再懸濁後（B）

成虫の羽化は飼育開始から約 2 ヶ月でピークを迎え、その後 2 ヶ月続く。成虫の取り扱いについては後述の（4）[成虫の飼育と採卵](#)を参照されたい。羽化にともない飼育水槽内の個体数は次第に減少するので給餌量を減らしていく。前日の食べ残しや羽化を失敗する個体（羽化直後に水面にトラップされて死亡した成虫や羽化できずに溺死した蛹）が目立つようになったら、過剰給餌の可能性があるので給餌量を減らさなければならない。

<補助食について>

幼虫に補助食を与えなくても成虫まで飼育することができるが、適切に与えればより良好な飼育結果が得られる。

ブラインシュリンプは約 400 μm と大きいので 4 齢～5 齢幼虫の補助食として与える。一度に大量に給餌しても幼虫が食べきれず飼育水槽内に残って腐敗の原因となる。したがって、食べ残さないようにあくまで補助的に 1 日 1 回与える。

藻類も補助食として有用である。生きている藻類はブラインシュリンプや人工飼料と異なり腐敗することがないため一度に大量給餌することができ、夜間の幼虫の飢餓ストレスを緩和することが期待される。藻類を与える場合は、培養期間が長いので計画的に培養する必要がある（[附属資料 1-F 補助食としての藻類のバイオフィルムの培養](#)）。若齢幼虫には藻類懸濁液の上澄みに含まれる細かい藻類塊を与える。4 齢幼虫が確認されるようになったら、大きな藻類

塊を含む懸濁液を与える。藻類は腐敗しにくいとはいえ、翌日食べ残されるほど与えても無駄なので、食べ残しがないように与える。

■ 飼育水の管理

<回転攪拌による流水環境の擬似的再現>

コガタシマトビケラ幼虫が湖沼沿岸部に分布するという報告もあるが（文献6）、本種の幼虫にとって、エサと酸素を供給する流水は大量飼育の必須の条件である。したがって、幼虫の飼育中は常に飼育水をスターラーで回転攪拌し、幼虫の成長にあわせて回転速度を上げていく（表1-5）。

飼育開始当初は、沈殿させたエサ粒子の巻き上げを避けるため低速（100 rpm）で回転させる（2）飼育水槽の準備と飼育の開始）。数日後、底質に沈殿させたエサ粒子がほぼ消費されたら 200 rpm に増速する。以降、成長とともに段階的に増速し、4 齢幼虫が多くなったら 600 rpm で回転攪拌する。スターラーの性能によってはさらに増速してもよい。回転速度を上げすぎると回転子が弾き飛ばされる可能性があるので注意する。

回転攪拌が停止していないか平日毎日確認する。回転子が摩耗し回転が不安定になったら新品に交換する。回転攪拌が停止すると、給気により酸素を供給していても幼虫が固着巣から出巢したり、衰弱したりする場合がありますので注意する。

<飼育水の掛け流し>

林ら（2001年）によると、コガタシマトビケラ幼虫は水質階級のα中腐水性（汚い水）の河川で卓越するという（文献12）。しかし室内飼育では、幼虫期間を通じて水質を良好に維持した方が飼育効率（飼育容器に投入した卵数に対する羽化数の割合）は高くなる。したがって、幼虫の飼育期間中は水質の維持のため常に飼育水を掛け流す（表1-5）。

1 齢幼虫が多い時期は、掛け流し量が多すぎると 1 齢幼虫も排水とともに飼育水槽から逸出してしまう可能性があるため、掛け流し量を 30 mL/分とし、2 齢幼虫が多くなったら 50 mL/分まで増やす。50 mL/分の掛け流し量の場合、飼育水槽（直径 30 cm）の水深が 6 cm として 1 日に 4~5 回入れ替わる計算になる。

<留意点>

飼育水の掛け流しの際は水漏れ事故に注意する。掛け流しを開始するにあたり、給水チューブが飼育水槽にしっかりと固定されているか確認する。また、水槽本体に掛け流し器具が確実に取り付けられており、取り付け部の隙間から水漏れを生じていないか確認する。排水口と排水溝の位置をしっかりと確認する。仮に水漏れを起こしても、電気関係の機器類が水に触れない位置にあるか確認する。

飼育水の濁り・泡立ち（水槽の水際に細かい気泡がたまる等）・生臭い強い臭気が確認される場合は、掛け流し量を増やす。また、羽化を失敗する個体（羽化直後に水面にトラップされて死亡した成虫や羽化できずに溺死した蛹）が目立つときも掛け流し量を増やす。

なお、サイフォン式の掛け流し器具（1）**主な使用機器・器具類**）を用いる場合には、以下の注意点がある。サイフォン管の中に幼虫が営巣して詰まったり、気泡が溜まったりして排水が停止することがあるので平日は毎日に清掃する。清掃の方法は、排水口チューブにピペットの先を差し込み、強制通水させて詰まりを除去する。また、管径によっては最大掛け流し量が表 1-5 に示した目安に達しない場合もある。その場合は個々の掛け流し器具の最大量で掛け流す。

■ 給気の管理

コガタシマトビケラ幼虫は、水の流れを利用して溶存酸素が豊富な水を固着巣内に導き入れ、腹部の分枝した気管鰓で効率的に酸素を取り込んでおり、低酸素環境下には弱いと考えられる。前述の通り、室内飼育ではスターラーで飼育水を回転攪拌し流水環境を再現しているが、回転子が外れて回転攪拌が停止する可能性がある。回転攪拌が停止したとしても、給気により酸素を供給して幼虫の急激な死亡を防ぐことができる。

給気は幼虫飼育水槽の準備を開始した翌日から始める（表 1-5、2）**飼育水槽の準備と飼育の開始**を参照）。給気の気泡にふ化個体がトラップされて水面浮上するのを防止するために、当初の給気量は小さくする。2 齢幼虫が多くなったら給気量を増やす。

■ 底質の管理

底質の環境を良好に保つことは、水質の維持と同様に飼育効率上重要な問題である。表 1-5 に示した飼育水の攪拌速度と掛け流し量では、底質に沈殿した幼虫の排泄物や食べ残しを排出することはできない。排泄物や食べ残しが蓄積すると底質環境が著しく悪化するため、清掃して取り除く必要がある。また、余剰なガラスビーズ等は汚れを溜め込むので適宜除去する。

<排泄物・食べ残しの除去>

飼育開始初期の 1 齢幼虫が多い時期は、広口の駒込ピペットを用いて、底質のガラスビーズを吹き飛ばさない程度の緩やかな水流を底質に当て食べ残し等を再分散させる。

2 齢が多い状態になったら、掛け流し器具の最大排出量近くまで飼育水の掛け流し量を上げ、広口の駒込ピペットで底質の排泄物や食べ残しを巻き上げて排水とともに除去する（図 1-25）。2 齢幼虫の固着巣は脆弱なので、清掃の際は巣を吹き飛ばさないように優しく巻き上げる。清掃が終了したら掛け流し量を元に戻す。

4 齢以降の幼虫が多くなると、摂食量の増大に伴い底質に溜まる排泄物も多くなる。小石や固着巣の脇に溜まって食べ残されるエサ粒子も多くなる。そこで、排泄物を効率的に取り除くため、灯油ポンプを用いる（図 1-26）。灯油ポンプの吸い込み口は使いやすい長さに切断しておく。4 齢以降の固着巣は比較的堅固なので、広口の駒込ピペットを用いて強めに水流を起し沈殿している排泄物や食べ残しを巻き上げる。排泄物が懸濁している飼育水を灯油ポンプで排水して除去する。新鮮な飼育水を掛け流して、灯油ポンプによる排水に伴う水位低下を補う。排泄物等がほぼ無くなったら清掃完了とする（図 1-27）。掛け流し量を元に戻す。

清掃の際は、食べ残しの有無に注意して作業を行う。食べ残しが目立つ場合は給餌量を前日より減らさなければならない。



図 1-25 幼虫飼育水槽の底質の清掃

飼育水の掛け流し量を上げ、駒込ピペットで底質に溜まった排泄物等を巻き上げて排水とともに除去する。

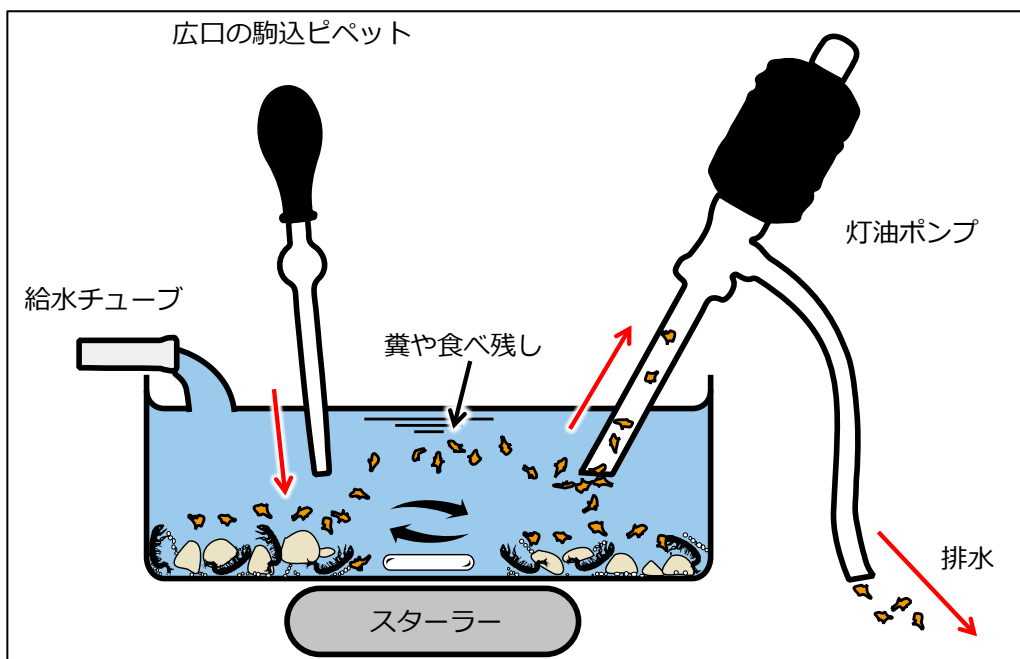


図 1-26 灯油ポンプを用いた底質の清掃のイメージ図

駒込ピペットで底質の排泄物等を巻き上げ、灯油ポンプで排出する。水位の低下を補うように飼育水の掛け流し量を増やす。

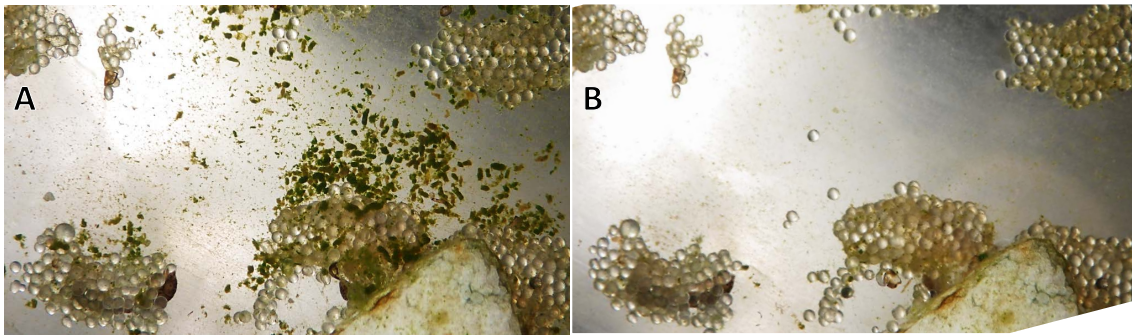


図 1-27 清掃前 (A) と清掃後 (B) の底質の様子
清掃前は藻類等を摂食した糞の粒が溜まっている。

<余剰のガラスビーズ・小石の除去>

十分成長した 5 齢幼虫は、ガラスビーズで繭を作り蛹化する。その後羽化すると、空になった繭は次第に崩れて余剰のガラスビーズを生じる。余剰の底質は汚れをためるため、底質の清掃の際に適宜除去する必要がある。除去方法は以下の通りである。まず、広口の駒込ピペットで水流を起こしながらガラスビーズを 1 カ所に寄せ集める。次に、集めたガラスビーズを駒込ピペットで勢いよく吸い取り、ビーカー等に移す。

以上のように、給餌・給気・飼育水・底質を適切に管理することにより、良好な飼育結果を得ることができる (図 1-28)。この事例では、卵塊が余剰状態であったこともあり 585 個の卵塊をアクリル円形水槽に投入して飼育を開始した。最終的には 1165 個体の成虫を羽化させることができた。



図 1-28 良好な飼育状態の事例 (飼育開始から約 2 ヶ月後)
多くの幼虫は 5 齢まで成長している。

4) 幼虫飼育の終了

成虫の羽化数は飼育開始2ヶ月後にピークとなり、その後徐々に減っていく。飼育水槽内の幼虫個体数も次第に減少する。飼育水槽内の幼虫が20~30個体程度まで減少したら、残存の幼虫を後発の幼虫飼育水槽に移す。繭はそのまま残して羽化させる。生きている繭であれば10日以内に羽化するので、幼虫を移して10日経ったら飼育水槽を洗浄する。洗浄に洗剤を使用する場合は水でしっかりとすすぎ洗剤を洗い流す。底質として用いた小石やガラスビーズも洗浄して再利用することができる。付着した有機物を、米を磨ぐようにして洗い流し、オートクレーブで滅菌した後、乾燥させて再利用する。

(4) 成虫の飼育と採卵

野外では夕刻にコガタシマトビケラの雄成虫が川沿いの樹木周辺で群飛することが知られている(文献 11)。これは交尾前行動ではなく、雄成虫が産卵に向かう直前の雌と交尾する最後の機会を得ようとしているものだという。このように、群飛が交尾に不可欠ではない本種は室内の定常環境で交尾させることができる。さらに、雌成虫は河川とは異なる狭い空間の止水環境でも潜水して産卵する。幼虫の飼育に比べ成虫の飼育と採卵は比較的容易な操作である。

1) 主な使用機器・器具類

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

- 吸虫管： 自作。10 mL 駒込ピペット(先端の細い部分を切断)、三角コーナー用水切り袋(PE製ネットタイプ)、塩化ビニル製チューブ、切り替えコック、三方コック、電動エアポンプ(CD-8S、テクノ高機)、1式
- 産卵用水槽： スチロール製昆虫飼育水槽(市販品、40×25×30 cm)を改造(作業用の中窓、給餌用スリットを開ける)、食品用ラップフィルム(蓋用)、1式
- 産卵用基質： 黒色塩化ビニル製の産卵用基質、15セット(交換用も含む)
- 給気： エアコンプレッサー(電動エアポンプでも可)、シリコンチューブ、1式
- 成虫のエサ： プロゼリー(KBファーム)、キムワイプ(塗布用)
- 飼育水： 脱塩素した上水(成虫の飼育では掛け流しはしない)
- その他： 片刃に加工したヘラ(水槽壁面に産み付けられた卵塊の回収用)

■ 吸虫管

幼虫飼育水槽で羽化した成虫を産卵用水槽に移動させるために用いる。成虫を傷つけずに移せる器具ならばどのような形でもよい。農業環境変動研究センターでは10 mL 駒込ピペットを加工して自作している(図 1-29)。駒込ピペット先の径が細くなっている部分を切断し切り口はバーナーで炙って角を丸める。駒込を取り付ける部分にPE製ネットの三角コーナー用水切り袋の断片を詰め、塩化ビニル製チューブを連結させる。チューブは使い勝手の良い長さに調整する。電動エアポンプの吸入側に吸虫管をつなげる。電動エアポンプと吸虫管の間に切り替えコックを取り付けて吸引の開始・停止を手元で操作できるようにすると便利である。また、流量調節のための三方コックを取り付けておく。吸引力が強いと成虫は吸虫管の奥のPE製水切りネットに衝突して負傷・衰弱するので、三方コックで吸引量を調整する必要がある。吸引した成虫を産卵用水槽に吐出するときはチューブを電動エアポンプの吐出側に付け替える。昆虫に抵抗感がない人は電動エアポンプの代わりに人力(吸気・呼気)で吸引・吐出を行っても良い。

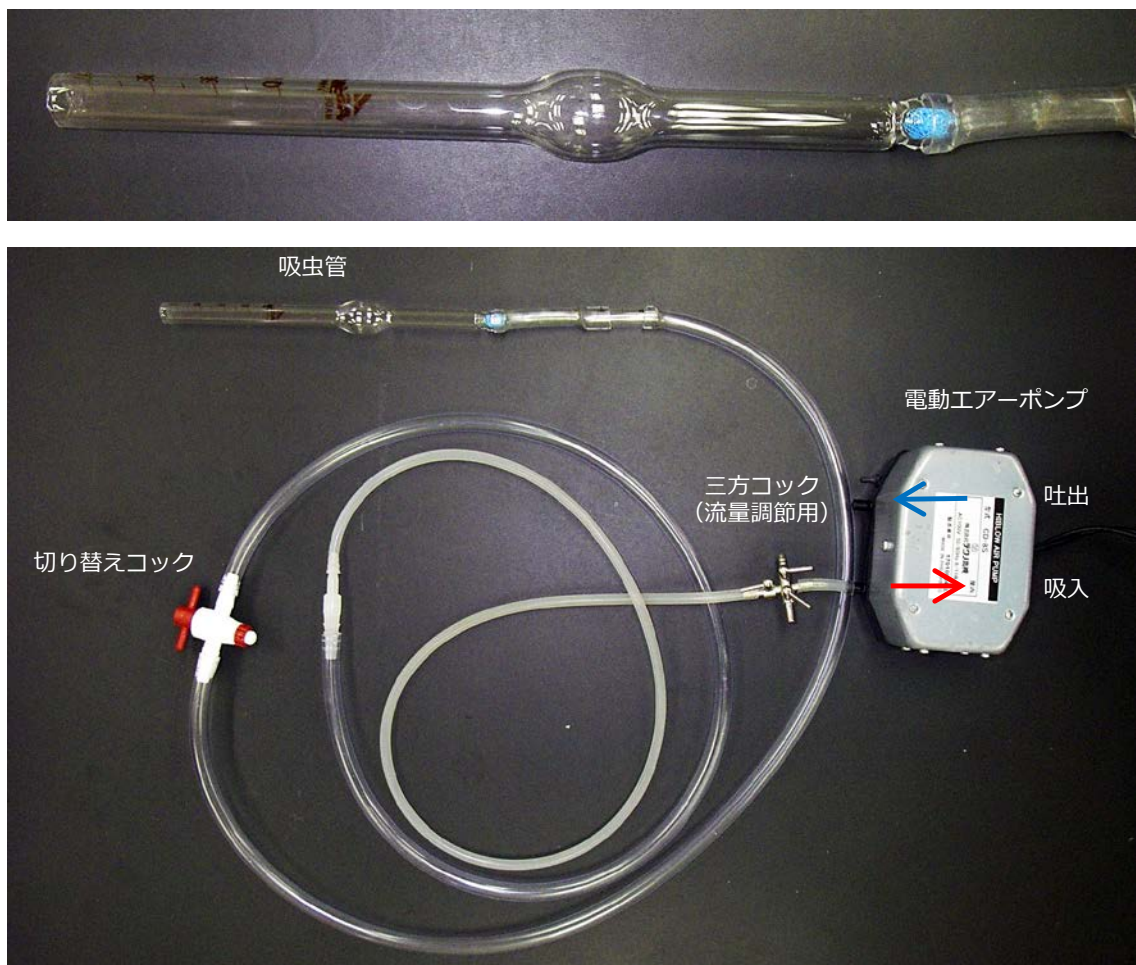


図 1-29 吸虫管

上段：吸虫管の拡大写真。下段：全体像。

■ 産卵用水槽

適度な容積があり、水を満たすことができ、透明で内部の視認性が高い容器を用いる。市販のスチロール製昆虫飼育水槽等が適する。水槽の大きさは幅 40 cm×奥行き 25 cm×高さ 30 cm 以上のものを用いる。それよりも小さな水槽では産卵率が低下することがある。市販品では卵塊の回収作業の際に成虫が逃げ出すことがある。作業効率を上げるため、市販品を改造して自作するか、特注品を作成する（図 1-30）。本体附属の蓋（①）は粗い格子なので成虫が逃亡しないように食品用ラップフィルム（②）を張る。吸虫管で捕集した成虫は④から投入する。④には綿を詰めておく。成虫の死骸や卵塊を回収するためにジッパー付洗濯ネットを固定した作業窓（⑤）をつける。成虫の給餌用のスリット（⑥）を設ける。給餌板（⑧）はスリット幅よりも太いアクリル管に針金で連結しており連結部は可動式になっている。給餌板に昆虫用ゼリーを塗布したキムワイブを貼付しスリットに差し込むと、給餌板はつり下がった状態になる（図 1-30）。スリットはアクリル管で塞がれるので成虫が逃亡する恐れはない。

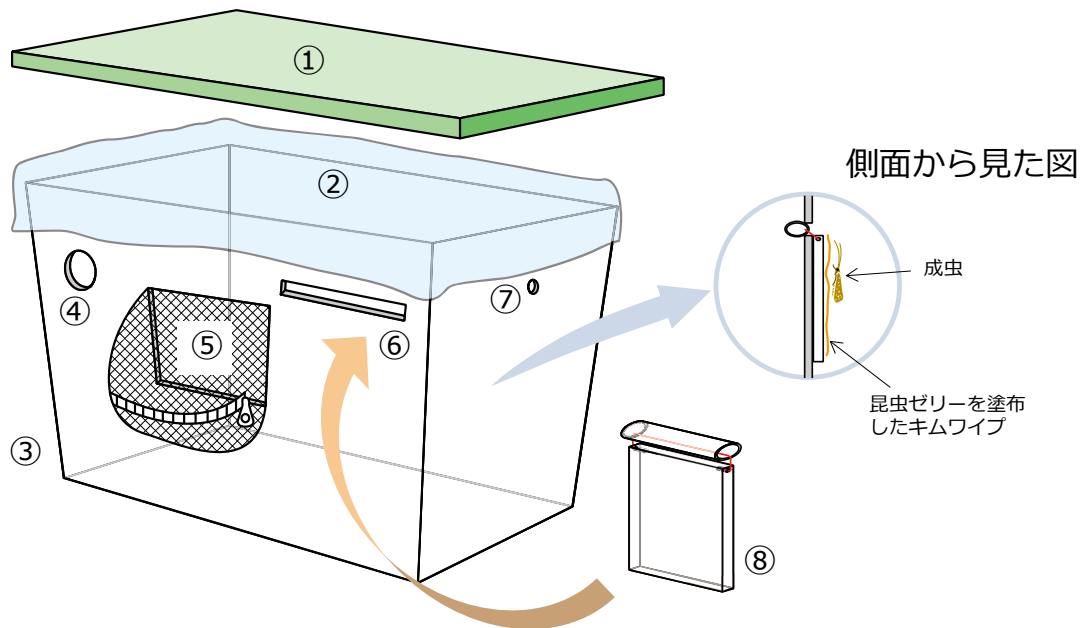


図 1-30 市販のスチロール製昆虫飼育水槽を改造した産卵用水槽のイメージ

①付属の蓋. ②食品用ラップフィルム. ③水槽本体. ④成虫投入口. ⑤ジッパー付洗濯ネットを固定した作業窓. ⑥給餌用スリット. ⑦給気チューブ用の穴. ⑧アクリル製給餌板.

■ 産卵用基質

各種材質の5~10cm程度の大きさの基質を用いる(図1-31)。基質の色は、産み付けられた卵塊の視認性が良い黒色に近いものが良い。天然石をそのまま用いることもできるが、産卵面に凹凸があると卵塊を剥がしにくいので、成形した御影石やレンガ等が産卵用基質として適する。

さらに作業性の高い産卵用基質として、農業環境変動研究センターでは黒色塩化ビニル製の産卵用基質を使用している。天然ゴム立方体を核として、その底面を除く5面に粗面加工した黒色塩化ビニル板を装着するものである(図1-32)。塩ビ板は脱着式なので卵塊が産み付けられた面のみを回収することができ、採卵と蓄養の管理を円滑に行うことができる。また、塩ビ板に卵塊が付着した状態で毒性試験用の卵塊片を裁断することができ、[第2章 卵を用いた毒性試験法](#)に用いる試験卵を効率的に得ることができる。



図 1-31 各種産卵用基質

左から天然石，レンガ，御影石，黒色塩化ビニル製産卵用基質（特注品），黒色塩化ビニル製産卵用基質は1辺5cm.

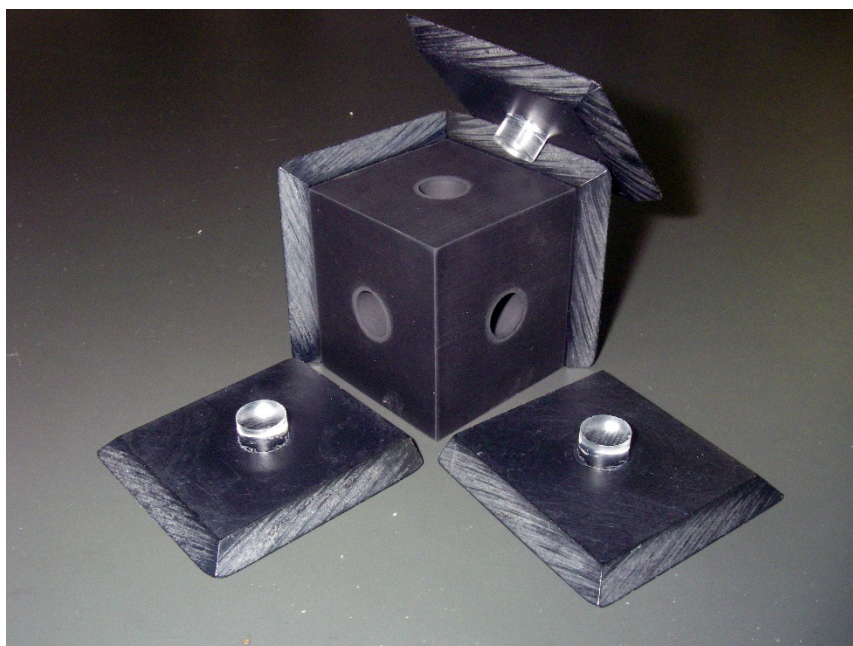


図 1-32 黒色塩化ビニル製産卵用基質

塩ビ板（1辺5cm）は天然ゴム核に差し込み式で脱着が容易である.

■ 成虫のエサ

野外で採集されたシマトビケラ科のウルマーシマトビケラ (*Hydropsyche orientalis*) の雌成虫の消化管には、何らかの食物片が含まれており、産卵前に摂食する必要性が指摘されている (文献 10)。柴田 (1975) によると、ウルマーシマトビケラの雌成虫にバナナ果肉を食べさせると、室内環境で産卵させることができるという (文献 10)。一方、同じシマトビケラ科のコガタシマトビケラ成虫については、野外における摂食に関する知見がない。また、室内環境で本種の成虫を飼育すると無給餌でも産卵することが判明している。しかしながら、給餌することにより成虫の寿命を延ばし交尾・産卵の機会を高める効果があると考えられる。

成虫のエサには、カブトムシ成虫等の飼育に用いられる市販の昆虫用ゼリーを使用する。コガタシマトビケラ成虫は口器が発達しておらず、積極的な摂餌行動も見られない。しかし、給餌板に偶然止まった成虫が塗布されたゼリーを舐めるように摂餌することがある。無給餌に比べ2~3日程度、成虫の寿命が延びる傾向にある。

2) 成虫の飼育管理と採卵

成虫の飼育手順と採卵法を解説する。コガタシマトビケラ成虫は産卵用水槽のような狭い空間でも交尾し、雌成虫は止水環境でも潜水して産卵用基質に1個体につき卵塊を1個産む。1-1. 入手法において入手した個体を増やして室内飼育が軌道にのれば、幼虫飼育水槽から毎日成虫が羽化し、毎日採卵できるようになる。

- 産卵用水槽を設置する。水槽に飼育水を水深 10 cm 程度まで満たす。飼育水は給気チューブにより弱く給気する。産卵用基質を数個程度水槽に入れる (図 1-33A)。
- 成虫のエサを設置する。給餌板にキムワイプ等の紙を置き、蒸留水で湿らせて給餌板に貼り付ける。そこに昆虫用ゼリーを薄く塗布する。給餌板を給餌用スリットに差し込んで吊す (図 1-33B)。3~4日おきに給餌板を交換する。カビが発生した場合はこまめに取り替える。

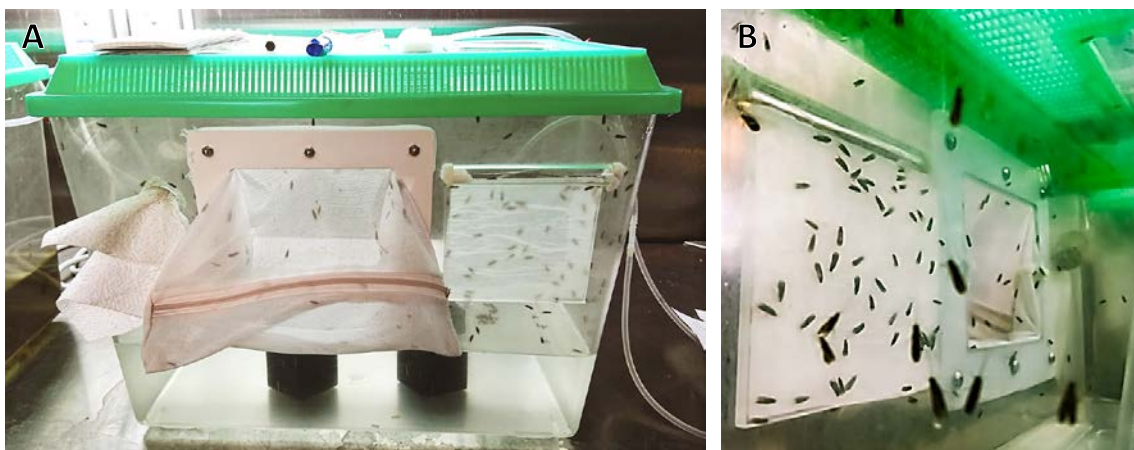


図 1-33 産卵用水槽の全景 (A) と成虫が止まった給餌板 (B)

- ▶ 平日は毎日、幼虫飼育水槽内で羽化した成虫を産卵用水槽に移す。幼虫飼育水槽はラップフィルムで蓋をしてある（図 1-34）。羽化個体はラップの裏側に止まっていることが多いので、ラップフィルムを慎重に開けながら、吸引管で羽化個体を吸引する。10 個体程度吸引したら、産卵用水槽の成虫投入口へ吐出する。吸引が強すぎると成虫が負傷して産卵率が低下するので注意する。ラップフィルムは遮光しないと藻が生えて成虫が見つげづらくなる。そこで幼虫飼育の開始から常に、ラップフィルムの上からアルミホイルで遮光しておく。

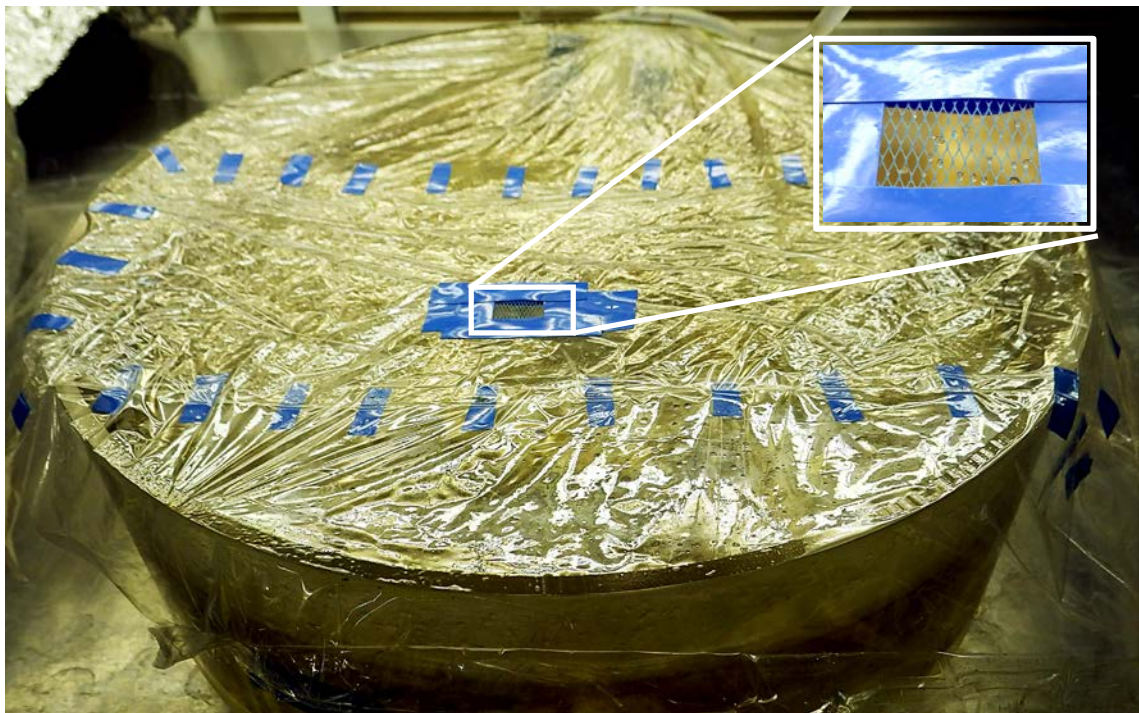


図 1-34 食品用ラップフィルムを用いた幼虫飼育水槽の蓋

羽化個体が逃亡しないようにラップフィルムを2~3枚つなぎ合わせて幼虫飼育水槽に蓋をする。空気抜きの窓（PE製メッシュの水切り袋を張る）を開けておく。

- ▶ 産卵用水槽の成虫密度が過密（100 個体以上）になると、作業中に逃げ出す個体が出てくるので注意する。羽化個体が多い場合は、産卵用水槽をもう 1 セット増設して羽化個体を振り分ける等の対策を講じる。
- ▶ 平日は毎日、産み付けられた卵塊を回収する。卵塊が産み付けられた黒色塩ビ板を回収する（図 1-35A）。産卵日を鉛筆で記入しておくで卵塊の管理がしやすい。補充として新しい塩ビ板を設置する。レンガ等を用いる場合は卵塊が産み付けられたレンガごと回収し（図 1-35B）、代わりのレンガを補充する。回収した産卵用基質は（2）卵塊の蓄養にしたがって蓄養する。

しばしば、産卵用水槽内壁にも卵塊が産み付けられる。その場合は片刃のヘラで削り取って回収する（金属ヘラでは産卵用水槽が傷つくので1 mm 厚の塩ビ板を片刃に加工する。加工の要領は[附属資料 1-G 卵塊剥離用の金属ヘラの作成](#)に準ずる）。剥離した卵塊は飼育水が入った 50 mL ビーカーに入れて蓄養する。

- 産卵用水槽内で死亡した成虫が水面に落ちて浮いているので毎日除去する。小型の手網ですくい取ると効率よく死骸を除去できる。
- 産卵用水槽はしばらくすると藻等が発生して汚れてくる。汚れてきたら新しい産卵用水槽を用意し、以降、羽化した個体は新しい水槽へ投入していく。古い産卵用水槽の成虫がすべて死亡したら水槽を洗浄する。

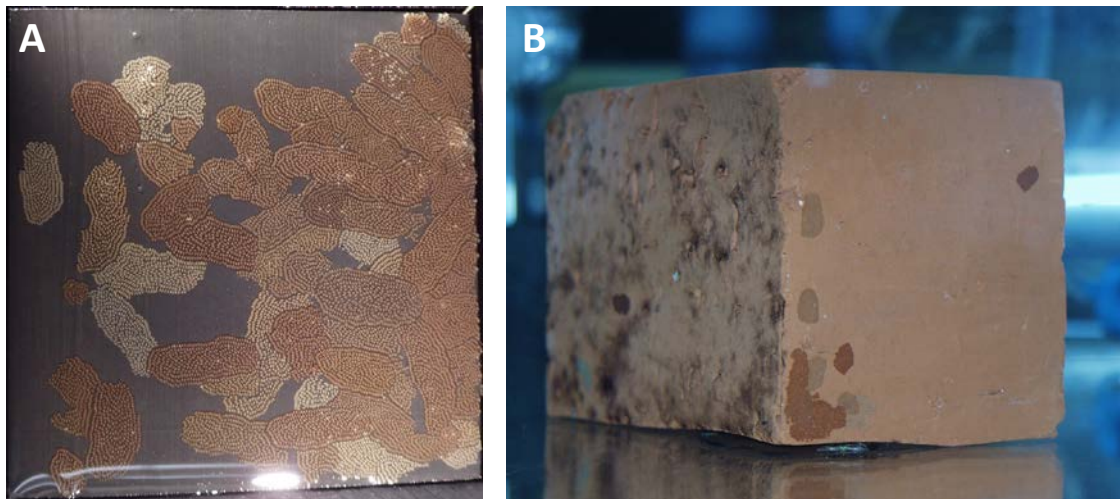


図 1-35 産卵用基質に産み付けられた卵塊

A : 黒色塩ビ板. B : レンガ.

(5) 飼育の規模とタイムスケジュール

ここでは、毒性試験用の試験個体を供給するための飼育規模と幼虫飼育水槽の更新間隔について、農業環境変動研究センターの飼育事例を紹介する。

1-1. 入手法の方法にしたがい入手した当初は、飼育規模が小さいため成長段階別毒性試験を実施するのは困難である。しかし、コガタシマトビケラは初発個体数が数個体であっても室内で増殖させることができる（文献5）。良好に飼育することができれば、数ヶ月で大量飼育モードに移行できる（図1-10）。

図1-36に農業環境変動研究センターにおける大量飼育モードの2016年6月1日～2017年5月31日までの1年間の飼育結果を示す。1年間で18個の幼虫飼育水槽を新たに準備した（水槽No. N-20からN-37）。水槽当たりの卵塊の平均投入数は403個、平均羽化数は928個体であった。成虫はいずれかの幼虫飼育水槽から毎日羽化しており、卵塊もほぼ毎日回収された（1日平均27個）。なお、産卵用水槽は2個使用した。

幼虫飼育水槽を準備してから、次の飼育水槽を準備するまでの平均間隔は17日で、2～3週間に1回、幼虫飼育水槽を更新していることになる。幼虫飼育水槽を準備してから羽化が終了し飼育が完了するまでの平均期間は114日であった。常に5～8個の幼虫飼育水槽を並行して維持していることになる。

以上の規模でコガタシマトビケラを維持すると、[第2章 卵を用いた毒性試験法](#)および[第3章 1齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)を頻繁に実施することができる。2齢幼虫以降の急性毒性試験については各成長段階につき年に数回実施できると考えられる。

大量飼育モードはそれなりに労力と時間を要する。毒性試験を実施する予定がなく系統として維持するだけならば飼育規模を縮小できる。次に、農業環境変動研究センターにおいて、系統保存の目的で飼育規模を縮小して維持している1年間の飼育事例（2018年1月～12月）を紹介する（図1-37）。幼虫飼育水槽には一回り小型の亚克力製円形水槽（直径25cm）を用いる。並行して維持する幼虫飼育水槽は2個とする。水槽あたりの平均卵塊投入数は169個で、飼育水槽あたりの卵塊投入開始から投入完了までの平均期間は40日と長く、最後の卵塊を投入する時点で5齢幼虫が出現している。幼虫飼育水槽を準備してから次の飼育水槽を準備するまでの平均間隔は56日、幼虫飼育水槽を準備してから羽化が終了し飼育が完了するまでの平均期間は107日である。約2ヶ月弱に1回、幼虫飼育水槽を更新していることになる。成虫が羽化してこない時期があり産卵用水槽は1個で十分である。

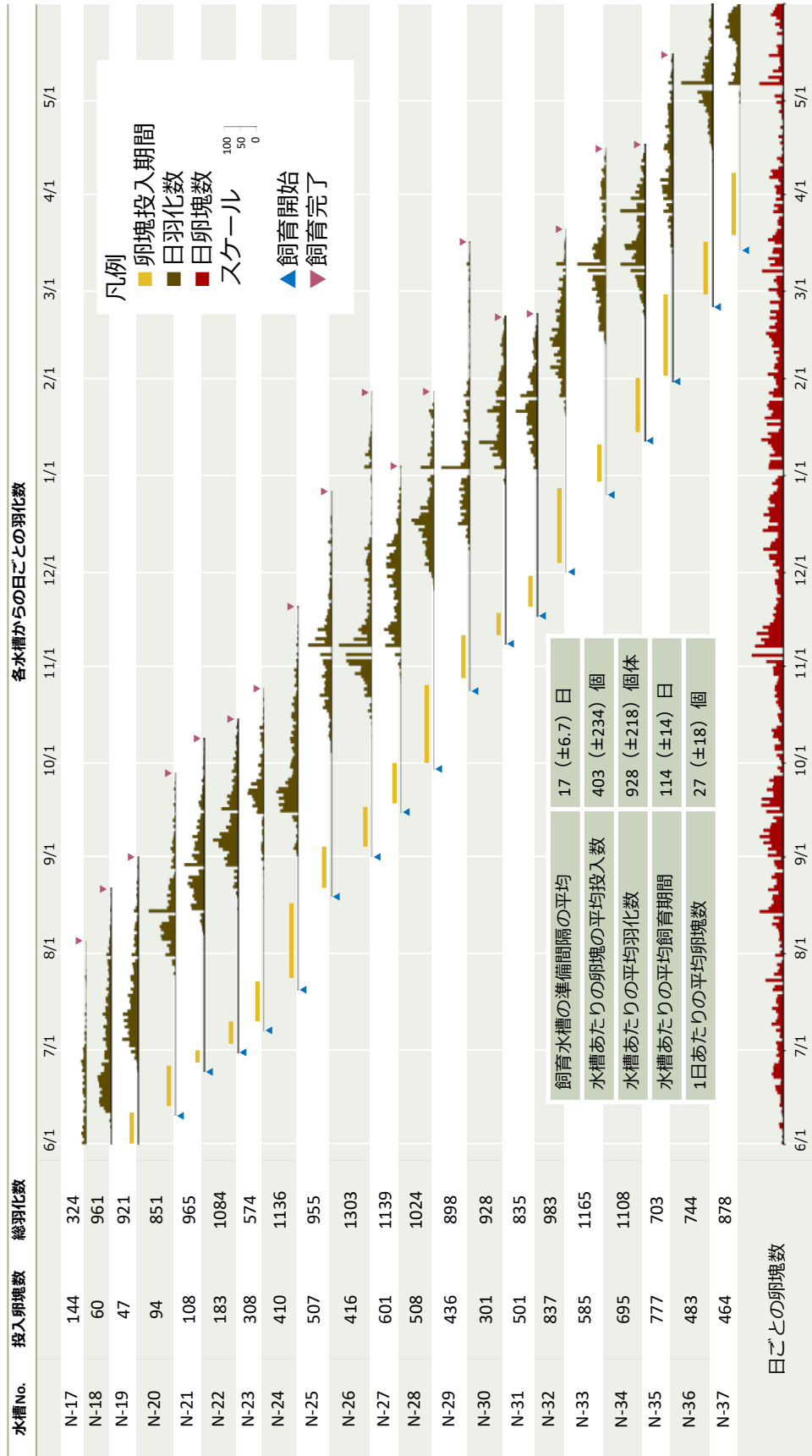


図 1-36 大量飼育モードでの 1 年間の飼育事例 (2016 年 6 月 ~ 2017 年 5 月)

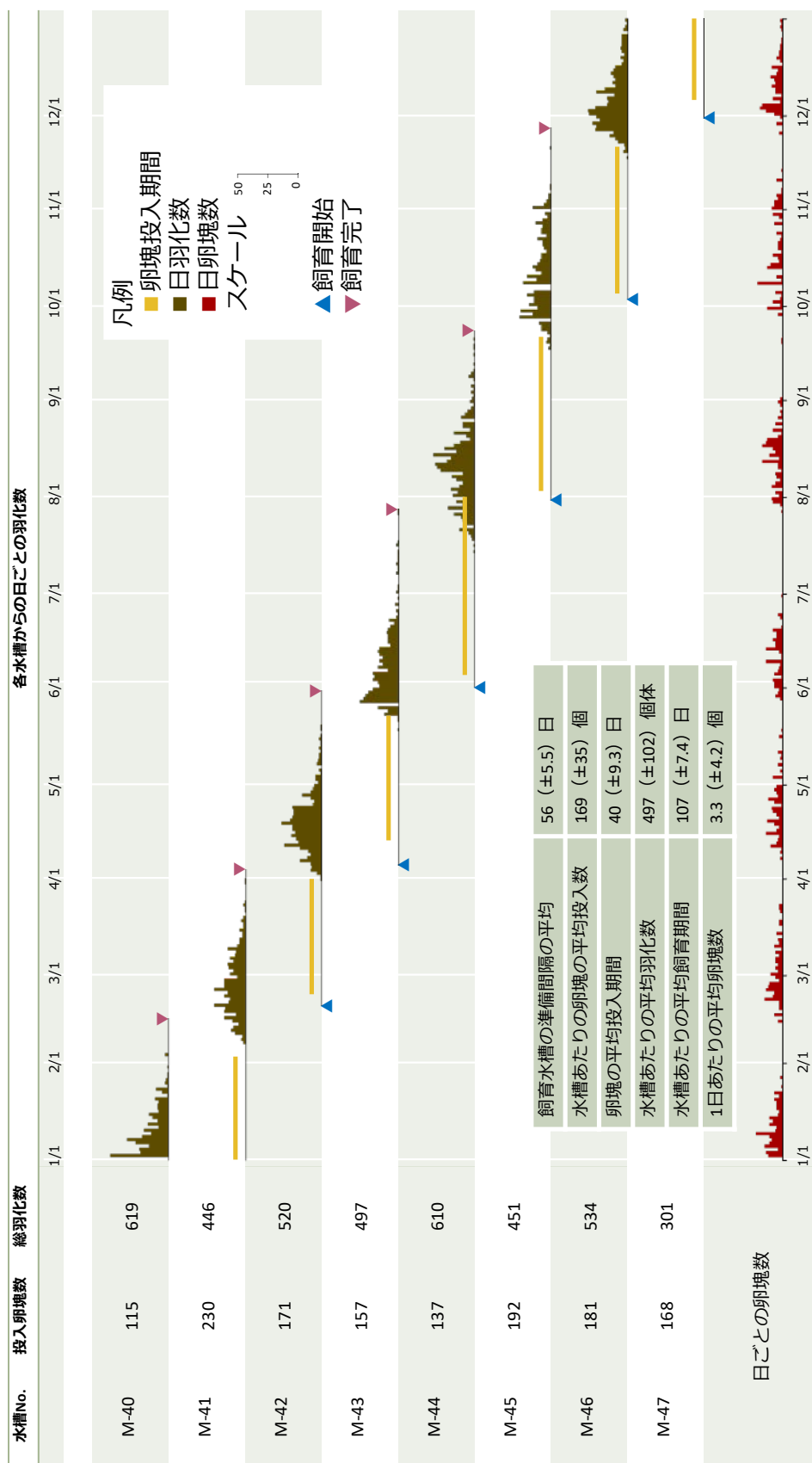


図 1-37 系統維持モードでの 1 年間の飼育事例 (2018 年 1 月～12 月)

(6) おかしいな、と思ったら

■ 幼虫の飼育を開始したが、いつの間にか底質に藻類が生えて幼虫がとても少ない

- いくつか原因が考えられる。その幼虫飼育水槽の個体数はもう回復することはないので、生き残った幼虫がこれ以上減少しないように対策をする。また、後続の飼育水槽で飼育するときに対策を反映させる。
 - －水質が悪化して死亡した可能性がある。飼育水の濁り・泡立ち（水槽の水際に細かい気泡がたまる等）・生臭い強い臭気が確認される場合は、掛け流し量を増やす。
 - －底質の環境が悪化している可能性がある。糞や食べ残しが底質に蓄積している場合は、飼育水を掛け流しながら広口の駒込ピペットで優しく巻き上げて清掃する。
 - －初期の給餌量が足りなくて餓死した可能性がある。次回の飼育水槽では給餌量に気をつける。

■ 5 齢幼虫期に出巢する個体が多く、出巢して衰弱・共食いされる個体が目立つ

- 底質環境が悪化している可能性がある。糞や食べ残しが目立つ場合は、給餌量を減らし、飼育水の掛け流し量を増やす（掛け流し器具の最大排水量を超過してはならない）。底質の清掃を入念に行う。

■ 溺死する蛹が多い、羽化に失敗して水面にトラップされる成虫が多い

- テトラフィン粉末の給餌量が多すぎる可能性がある。テトラフィン粉末の給餌量を減らし、底質を入念に清掃する。また、飼育水の掛け流し量を増やす（掛け流し器具の最大排水量を超過してはならない）。次第に蛹の溺死個体が減少する。また、テトラフィン粉末の給餌量を減らす代わりに、藻類懸濁液を多めに与えると良い。

1-3. 引用文献

- (1) 国土交通省水管理・国土保全局 (2016) 平成 28 年度版 河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版] (底生動物調査編) ,
http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/Download/H28KK_manual_river/H28KK_02.teisei.pdf (2019 年 12 月閲覧) .
- (2) 環境省水・大気環境局 (2017) 水生生物による水質評価法マニュアル—日本版平均スコア法一, <http://www.env.go.jp/water/mizukankyo/hyokahomanual.pdf>. (2019 年 12 月閲覧)
- (3) 西本浩之 (2001) コガタシマトビケラ属のフェニトロチオン感受性を利用した農薬負荷の推定, *愛知農総試研報*, 33, 219–227.
- (4) 環境省水・大気環境局 (2017) 河川生物の絵解き検索,
<https://www.env.go.jp/press/files/jp/106083.pdf> (2019 年 12 月閲覧) .
- (5) Yokoyama, A., Hamaguchi, K., Ohtsu K., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A method for mass-rearing caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata)(Trichoptera: Hydropsychidae), as a new test organism for assessing the impact of insecticides on riverine insects. *Applied Entomology and Zoology*, 44, 195–201.
- (6) 川合禎次、谷田一三共編 (2005) 日本産水生昆虫 科・属・種への検索, 東京大学出版会, 1342 pp.
- (7) 林義雄 (1998) 酵素多型による日本産コガタシマトビケラ属 (*Cheumatopsyche*: Trichoptera; Hydropsychidae) 3 種の分類, *陸水学雑誌*, 59, 175–183.
- (8) Yokoyama A. (2019) Assessing impacts of insecticides on different embryonic stages of the nontarget aquatic insect *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 1434–1445.
- (9) Mochizuki S., Kayaba Y. and K. Tanida. (2007) Larval growth and development in the caddisfly *Cheumatopsyche brevilineata* under natural thermal regimes. *Entomological Science*, 9, 129–136.
- (10) 柴田喜久雄 (1975) 水力発電導水路害虫ウルマシマトビケラ (*Hydropsyche ulmeri* Tsuda) の生態と防除, 自費出版, 149pp.
- (11) 八木雅之、笹川満廣 (1992) コガタシマトビケラの生活史と群飛行動, *環動昆*, 4, 1–10.
- (12) 林義雄、町田和俊、尹順子 (2001) 多摩川水系におけるコガタシマトビケラ属 (*Cheumatopsyche*; Hydropsychidae) 幼虫の分布と環境要因について, *陸水学雑誌*, 62 : 51–59.

1-4. 附属資料

附属資料 1-A 運搬容器について

コガタシマトビケラ幼虫を生きのまま運搬するための容器である。運搬時に水中溶存酸素濃度・水温を適切に維持できること、幼虫が団子状に集まって衰弱しないように適切な足場となる基質を幼虫に提供することが求められる。

(1) 準備と使用法

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

■ バケツ式

<準備するもの>

- ・サンペールバケツ No.6 (6.1 L 容量)
- ・シリコンチューブ (外径 6 mm×内径 4 mm、長さは適宜)
- ・スプリング (合金鋼、外径 7.95 mm×長さ 152.4 mm×太さ 0.711 mm)
- ・エアーストーン
- ・乾電池式エアーポンプ BH-735 (National)
- ・セフティーネット (EVA 製、試薬瓶の保護等に用いられるもの)
- ・重し (自然石、市販の重りなど)

サンペールバケツの蓋に、シリコンチューブの外径に合わせて穴を開ける。クーラーボックスへの収容を考慮してシリコンチューブを適切な長さに調整する。次に、運搬中にシリコンチューブが折れてエアレーションが止まるのを防止するために、スプリングを引き延ばして中にシリコンチューブを通しチューブを補強する。補強したシリコンチューブをサンペールバケツの穴に通し、エアーストーンを装着する。幼虫の足場となるセフティーネットは、バケツ底に合わせて切り抜く。切り抜いたセフティーネットを数枚重ね合わせてバケツの底に敷く。セフティーネットとバケツ底に隙間があると、その隙間に幼虫が団子状に集まってしまう可能性があるため隙間ができないように注意する。セフティーネットは水に浮く性質があるので運搬時は重しを入れる。足場の表面積を増やすため、重しをセフティーネットで包んだ塊を数個入れる。

使用する際は、バケツ式運搬容器に河川水を入れ採集した幼虫を投入する。採集後、水漏れしないようにバケツの蓋をしっかりと閉め、乾電池式エアーポンプで通気する。バケツ式運搬容器をクーラーボックスに収容し、水温の変化に気をつけながら持ち帰る。

■ ポリ袋式

<準備するもの>

- ・空のペットボトル（2L角形）
- ・三角コーナー用水切り袋：PE製ネットタイプおよび不織布タイプ
- ・ポリ袋：熱帯魚用丸底袋（R底）0.06×160×350 mm
- ・輪ゴム、結束バンド、ナイロンループタイ
- ・スポーツ酸素専用カートリッジ、本体バルブ（日本炭酸瓦斯株式会社）
- ・プラスチックチューブ

ペットボトルは底から15 cmほどの高さで切断する。PE製水切りネットは短冊状に切断した後、ナイロンループタイなどで縛って束ね、不織布タイプの水切り袋に入れ、さらにポリ袋に収納する。PE製水切りネットの束と不織布の水切り袋全体が、幼虫の足場として機能する。



現場で幼虫を採集する際は、ポリ袋式運搬容器をペットボトルに固定し、そこに河川水を半分程度入れる。幼虫を不織布の水切りネットの中に投入する。幼虫を投入し終わったら、不織布の水切りネットから幼虫が逸出しないように輪ゴムで口を止め、全体が水で浸るように沈める。酸素カートリッジを装着した本体バルブにプラスチックチューブをつなげ、ポリ袋に酸素を充填する。酸素を充填したら、プラスチックチューブを素早く引き抜き、ポリ袋の口をねじり締めて結束バンドや輪ゴムなどで固定する。酸素を封入したポリ袋をペットボトルに入れ、クーラーボックスに収容する。



クーラーボックスには10本収容可能である。季節によってはこの上にバット等を置き、そこに保冷剤や氷等を入れて適宜冷やしながら運搬する。



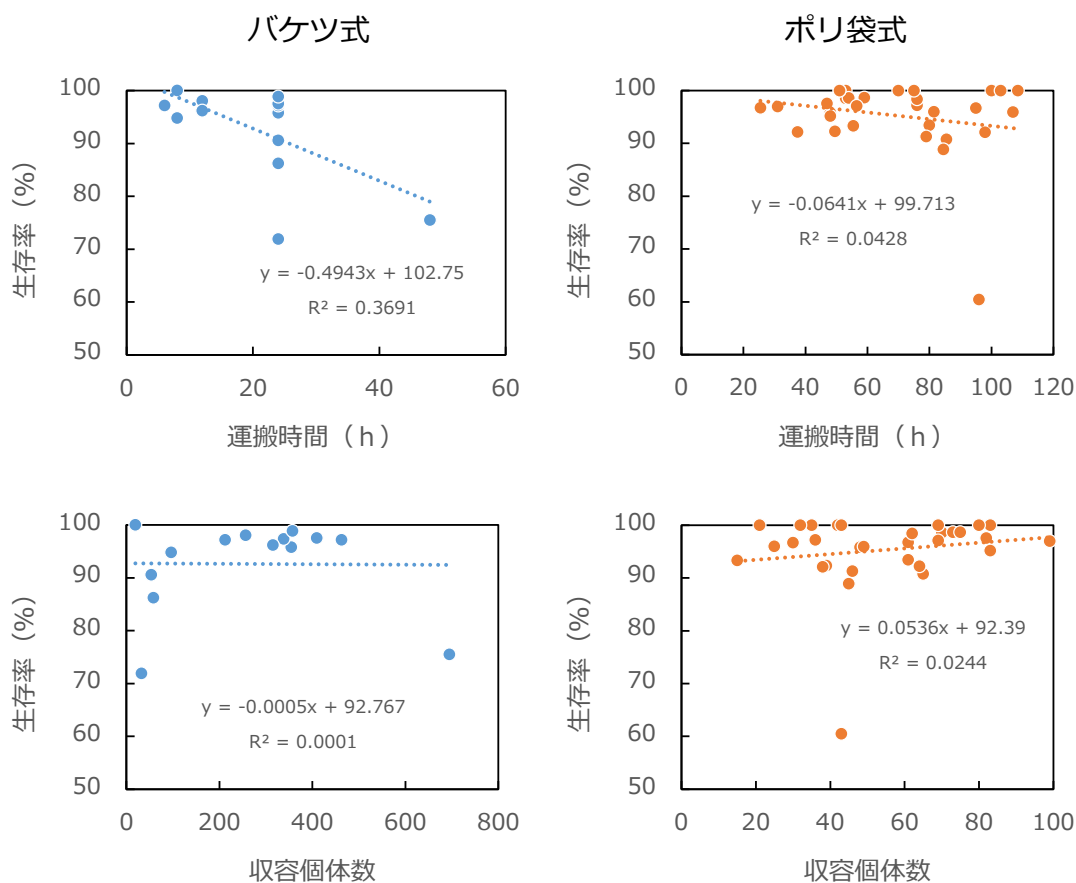
(2) 運搬容器の使用実績

農業環境変動研究センターで前記2つのタイプの運搬容器を使用した実績は次の通りである。

バケツ式の運搬所要時間は数時間～48時間で、収容個体数は19～694個体であった。生存率は71.9～100%で、平均92.6%だった。生存率70%台の2つの事例のうち、1つの事例では収容個体数が694個体と非常に多く、運搬時間が48時間と比較的長かったため、生存率が低下したと考えられる。

ポリ袋式では、運搬所要時間は25～109時間、収容個体数は15～99個体であった。生存率は60.5～100%の範囲で、平均は95.3%だった。生存率が60.5%だった事例は、4齢幼虫の生存率が36%と低く、生存率を押し下げた結果である。

バケツ式の特徴としては、運搬時間が1日程度と短い場合、1つの容器で数百個体を運搬できる。ポリ袋式は、運搬時間を4日程度と比較的長くとることができるが、収容個体数は100個体程度である。採集調査の内容・日程に合わせて運搬容器を選択する。

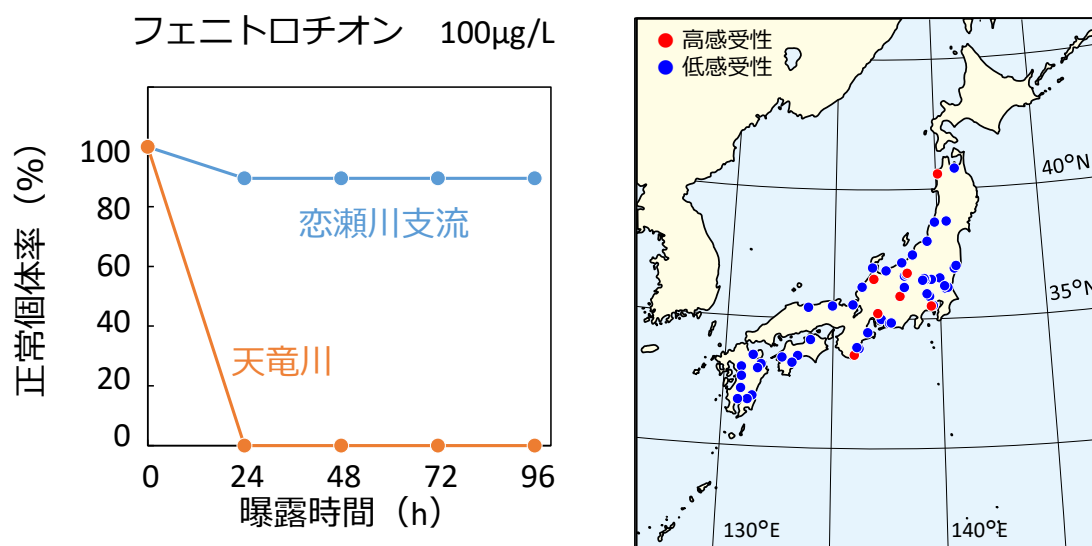


附属資料 1-B 野外個体群のコガタシマトビケラ属幼虫のフェニトロチオン感受性

農業環境変動研究センターでは、日本各地のコガタシマトビケラ属(ナミコガタシマトビケラ、サトコガタシマトビケラを含む)の5齢幼虫を採集し、「[第5章 4齢・5齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)」に従い、有機リン系殺虫剤フェニトロチオンの感受性を調査している。

その結果、西本(2001)¹⁰が報告したように、採集地点によって感受性が異なることが判明した。事例として、5齢幼虫をフェニトロチオン100 $\mu\text{g/L}$ に曝露したときの正常個体率の経時的变化を下の折れ線グラフに示す。天竜川で採集したコガタシマトビケラ5齢幼虫は、曝露開始24時間後には全ての個体が影響を受けたが、恋瀬川支流で採集したコガタシマトビケラ幼虫は、96時間曝露されても殆ど影響を受けなかった。

そこで便宜的に、フェニトロチオン100 $\mu\text{g/L}$ で48時間曝露されたときの正常個体率を指標として、野外個体群を高感受性(正常個体率10%未満)と低感受性(10%以上)に区分し、その分布を下の日本地図に示す。日本各地で低感受性個体群が確認されているが、下流域の農耕地から隔離された上流域の個体群や、河川水中農薬濃度が高くなりにくいと推測される水量の多い河川等で高感受性個体群が確認されている。

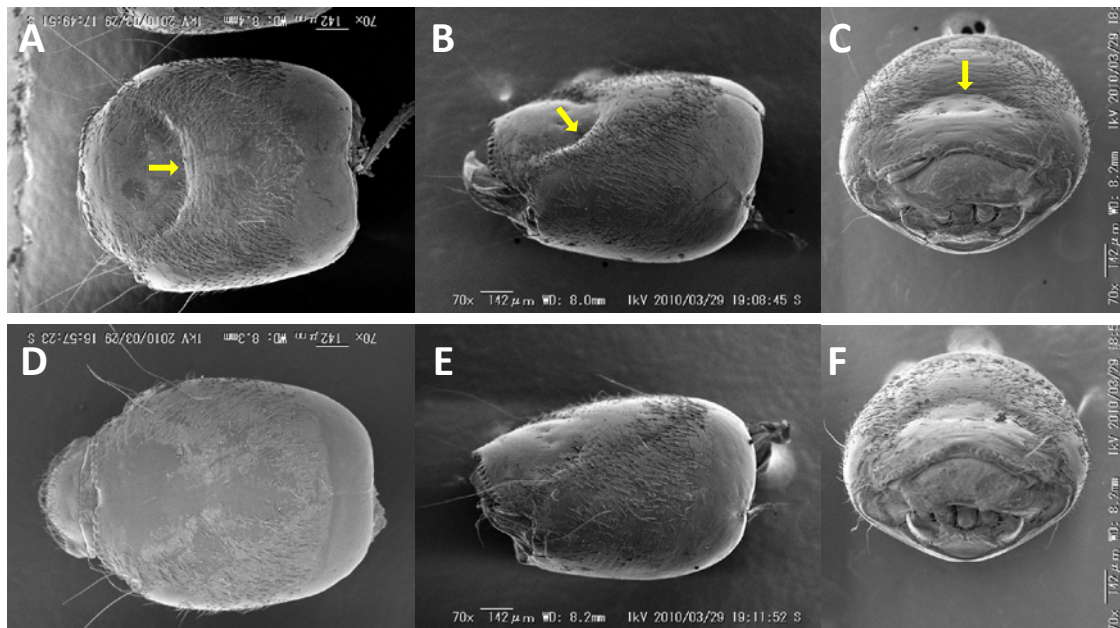


¹⁰ 西本浩之(2001) コガタシマトビケラ属のフェニトロチオン感受性を利用した農薬負荷の推定, 愛知農総試研報, 33: 219-227.

附属資料 1-C コガタシマトビケラ属幼虫の頭部比（頭幅／頭長）について

コガタシマトビケラ属については、雄成虫の生殖器の形態や、成虫や幼虫のエステラーゼのザイモグラムによって種レベルまでの分類は可能だが、林（1998）¹¹によれば、5 齢幼虫の頭部比（頭幅／頭長）でもある程度区別することができるという。しかし、生きた幼虫を扱う場合、頭部比の指標はやや不便である。そこで、頭部比以外で種を判別するのに役立つ形質について検討した。

2010年3月10日～12日にかけて、鳥取県倉吉市、兵庫県豊岡市、福井県小浜市、石川県加賀市にてコガタシマトビケラ属5 齢幼虫を採集し、ポリ袋式運搬容器で実験室に持ち帰り、フェニトロチオンに対する感受性を評価した（前述）。一部の幼虫については、80%アルコールで固定後、胸部から頭部を切除し、実体顕微鏡で頭部形態を観察して大まかに分類した。すなわち、頭部サイズが一回り小さく縦長な頭部はナミコガタと判定した。残りの頭部については、頭楯板の陥没のエッジが明瞭な頭部（下図 A～C の矢印）となだらかな頭部（下図 D～F）にグループ分けした。



A～C：兵庫県豊岡市で採集した個体の頭部。頭楯板の陥没のエッジが明瞭（矢印）。
D～F：福井県小浜市で採集した個体の頭部。頭楯板の陥没のエッジがなだらか。
A および D は頭部上面。B および E は頭部上側面。C および F は頭部前面。

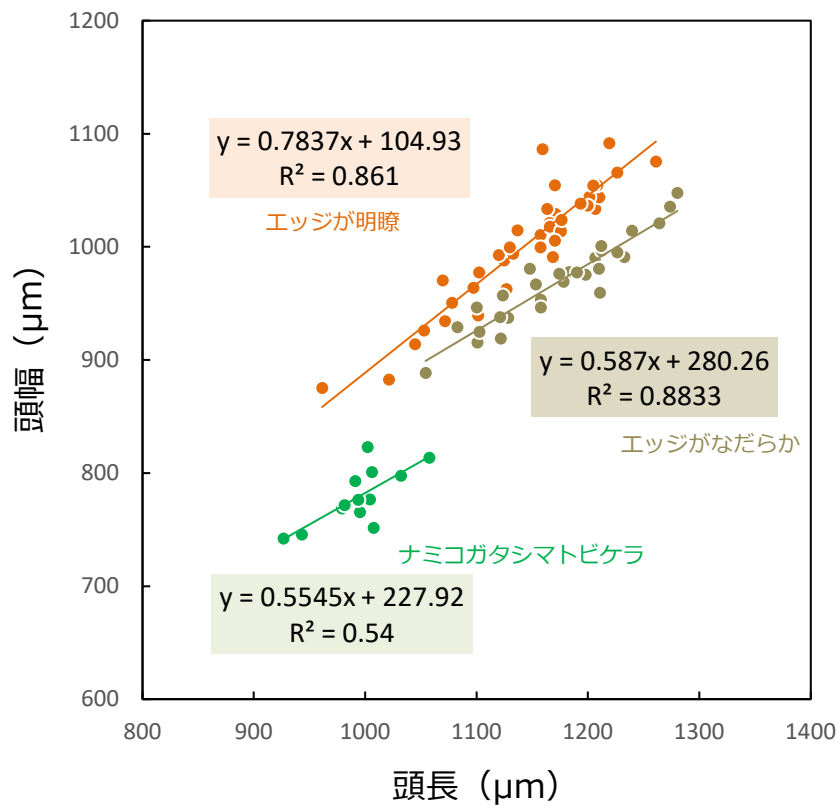
¹¹ 林義雄（1998）酵素多型による日本産コガタシマトビケラ属（*Cheumatopsyche*: Trichoptera; Hydropsychidae）3 種の分類，*陸水学雑誌*，59：175–183。

採集地点、グループ毎に、走査型電子顕微鏡の試料台のカーボンテープ上に頭部を貼付し乾燥させた。乾燥後、1個体ずつ頭部を上面から撮影し、Adobe Photoshopの「ものさしツール」を用いて頭幅および頭長を測定した。測定結果を下表に示す。

各採集地点のコガタシマトビケラ属5齢幼虫の頭幅および頭部比

種・グループ	採集地点	n	頭幅 (μm)		頭部比 (頭幅/頭長)	
			平均±標準偏差	最小-最大	平均±標準偏差	最小-最大
ナミコガタ	兵庫県豊岡市	4	778 ± 22	752-798	0.78 ± 0.023	0.75-0.80
	石川県加賀市	9	779 ± 28	742-823	0.79 ± 0.017	0.77-0.82
頭楯板の陥没のエッジが明瞭	鳥取県倉吉市	8	940 ± 49	875-1010	0.88 ± 0.016	0.86-0.91
	兵庫県豊岡市	28	1021 ± 39	939-1092	0.87 ± 0.019	0.85-0.94
	石川県加賀市	3	983 ± 52	934-1038	0.88 ± 0.009	0.87-0.89
頭楯板の陥没のエッジがならだか	鳥取県倉吉市	9	942 ± 30	889-990	0.84 ± 0.012	0.82-0.86
	福井県小浜市	19	978 ± 30	919-1036	0.82 ± 0.016	0.79-0.86
	石川県加賀市	1	1048		0.82	

今回測定したサンプルの頭幅は、林(1998)の報告に比べて全体的にやや小さく、頭部比も全体的にやや細長なデータが得られた。これは頭部の前処理・観察手法が異なることや、地域個体群の違いに起因すると考えられる。頭部比は、頭楯板の陥没のエッジが「明瞭」および「ならだか」なグループ間で差が見られ、「ならだか」なグループの方がやや細長な頭部であった。全ての個体の頭幅・頭長データを散布図に示す。頭部比の分布パターンは、林(1998)の分布パターンに類似しており、エッジが「明瞭」なグループはコガタシマトビケラ、「ならだか」なグループはサトコガタシマトビケラに相当すると考えられた。



コガタシマトビケラ属 5 齢幼虫の頭部のサイズ

幼虫頭部の頭楯板の陥没の状態については、照明の角度を調整すれば実体顕微鏡を使用して生きた幼虫でも可能であることから、コガタシマトビケラとサトコガタシマトビケラの大まかな判別の指標になる可能性がある。今後の課題として、頭楯板の陥没状態で簡易的に分けたグループから成虫を羽化させ、雄成虫による種の確認を行う必要がある。

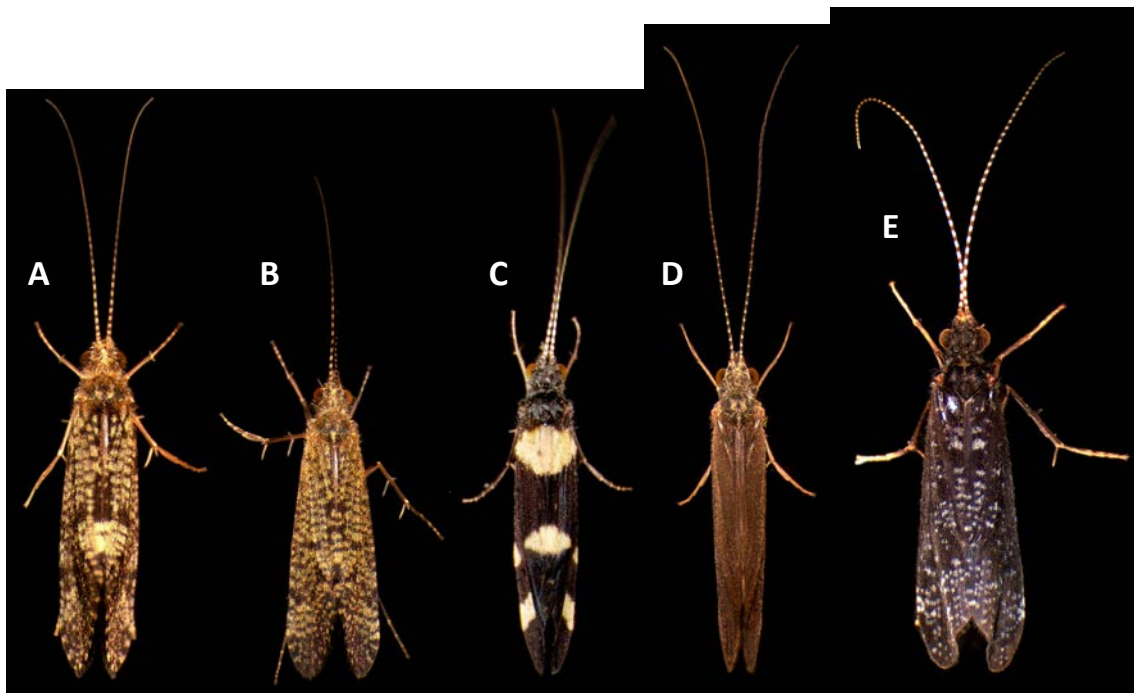
附属資料 1-D 野外から採集したシマトビケラ科幼虫の飼育結果について

農業環境変動研究センターでは、これまでに野外から採集した各種トビケラ幼虫を親世代として室内飼育システムの確立を試みてきた。以下に室内飼育を試みた種を記す。

- ・コガタシマトビケラ *Cheumatopsyche brevilineata*
- ・ナミコガタシマトビケラ *C. infascia*
- ・ガロアシマトビケラ *C. galloisi*
- ・エチゴシマトビケラ *Potamyia chinensis*
- ・ミヤマシマトビケラ属 *Diplectrona* sp. DA
- ・ミヤマシマトビケラ属 *Diplectrona* sp. DB
- ・ヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata*

いずれの種においても、親世代の幼虫を羽化させることができた。参考までに、一部の種について室内で羽化させた雌成虫の写真を掲載する。次に、羽化個体を1-2. 室内飼育法に基づいて室内環境下で交尾・産卵させようと試みたが、コガタシマトビケラを除くその他の種では交尾行動が全く確認されず、産卵させることはできなかった。コガタシマトビケラと近縁のナミコガタシマトビケラについても全く繁殖行動は確認されなかった。林ら(2001)¹²によれば、多摩川水系における両種間の幼虫の分布の違いは水質と水温が関係しており、ナミコガタシマトビケラ幼虫はコガタシマトビケラよりも水質が良く水温が低い上流側に分布する。このことから、成虫についてもナミコガタシマトビケラはコガタシマトビケラよりも相対的に標高の高い冷涼な陸上環境に適応していると推測される。したがって、コガタシマトビケラに最適化した室内環境下では、ナミコガタシマトビケラ成虫は繁殖行動を示さなかったのではないかと考えられる。

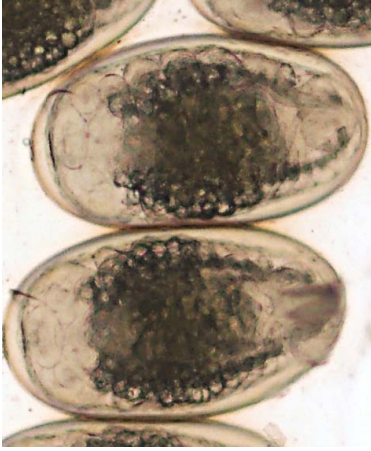
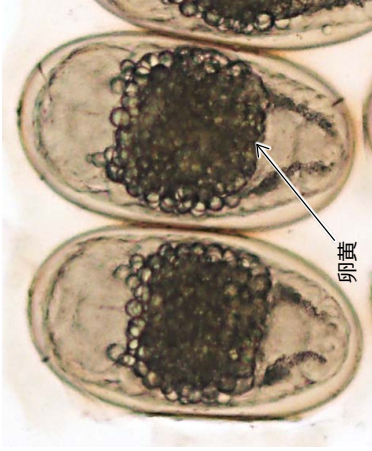
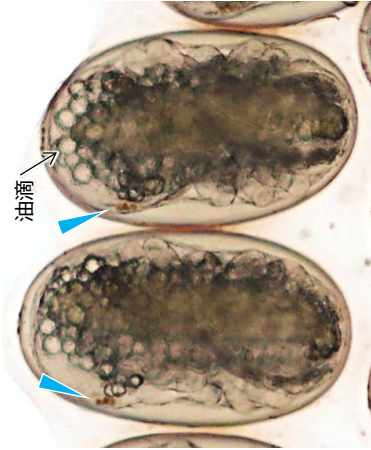



¹² 林義雄、町田和俊、尹順子(2001) 多摩川水系におけるコガタシマトビケラ属(*Cheumatopsyche*; *Hydropsychidae*) 幼虫の分布と環境要因について, *陸水学雑誌*, 62: 51-59.


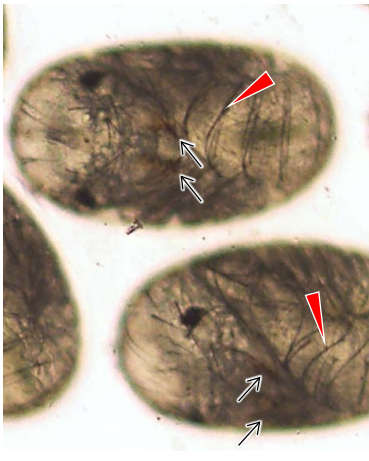

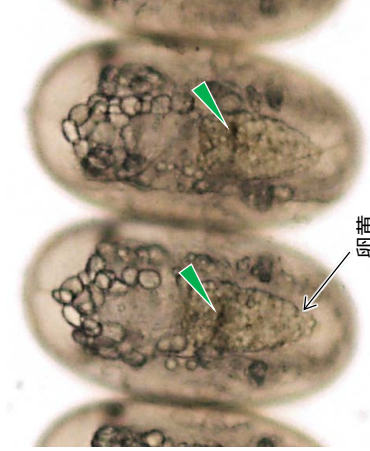




各種トビケラの雌成虫

A : コガタシマトビケラ、B : ナミコガタシマトビケラ、C : ガロアシマトビケラ、D : エチゴシマトビケラ、E : ミヤマシマトビケラ DB.

附属資料 1-E 卵塊の胚発生と幼虫飼育水槽の準備の目安

産卵からの経過日数	卵塊の様子		胚発生の特徴	飼育水槽の準備
	腹側	背側		
5日後			胚の姿勢転換がはじまる	<ul style="list-style-type: none"> ・幼虫飼育水槽の準備を開始 ・水槽に飼育水を満たし、底質を投入する ・工サ粒子を懸濁させ静置する
6日後			姿勢転換が完了 (腹側) 眼点が見え始める(▲) (背側) 二次背器はない	<ul style="list-style-type: none"> ・24時間静置後、飼育水の掛け流しを開始し、濁った上澄みを除去する
7日後			(腹側) 眼点をはっきりする (腹側) 腹部に小顆粒が散在(赤枠) (背側) 二次背器極大～縮小期(▲)	<ul style="list-style-type: none"> ・掛け流しを続行

産卵からの経過日数	8日後	9日後	10日後
腹側			
背側			
胚発生の特徴	<p>(腹側) 腹部の小顆粒は殆ど消失 (背側) 二次背器は痕跡的 (▲) (背側) 卵黄は縮小</p>	<p>(腹側) 大顎が褐色を呈す (↑) (腹・背側) 刺毛が顕在化 (▲)</p>	<p>ふ化</p>
飼育水槽の準備	<p>・掛け流し量を、飼育時の設定にする ・卵塊を投入する</p> <p>・飼育の開始～</p>		

卵塊の様子

附属資料 1-F 補助食としての藻類のバイオフィルムの培養

農業環境変動研究センターでは、補助食として培養した藻類をコガタシマトビケラ幼虫に与えている。コガタシマトビケラは4齢から5齢幼虫にかけて摂食量が増える。食料が欠乏すると幼虫間の闘争の原因となり飼育効率が低下する。したがって、栄養価の高いテトラフィン粉末等の人工飼料の給餌量を増やすことになるが、一度に大量給餌すると食べ残しが腐敗して水槽内の環境が悪化し、かえって飼育効率が低下する。生き餌である藻類は人工飼料と異なり腐敗することがないため一度に大量給餌することができ、夜間の飢餓ストレスを緩和することができる。

以下に、コガタシマトビケラ幼虫のエサとしての藻類の培養法について解説する。なお、この培養法は非無菌培養である。また、単種培養でもないので、培養される藻類種はバッチによって異なる可能性がある。

<準備するもの>

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

- ・サンペールバケツ No.6 (6.1 L 容量)
- ・シリコンチューブ (外径 6 mm×内径 4 mm、長さは適宜：通気用)
- ・ローラーランプ (KT-4.5, アズワン)：通気量の調節用
- ・透明塩ビ版 (バケツの蓋にする。食品用ラップフィルム等でも代用可能)
- ・エアーストーン
- ・電動エアーポンプ (REI-SEA APN-110R, 株式会社イワキ)
- ・藻類培養液 KW21 (第一製網株式会社)
- ・藻類が発生しているメダカ等の飼育水 (緑色に濁っているものが良い)

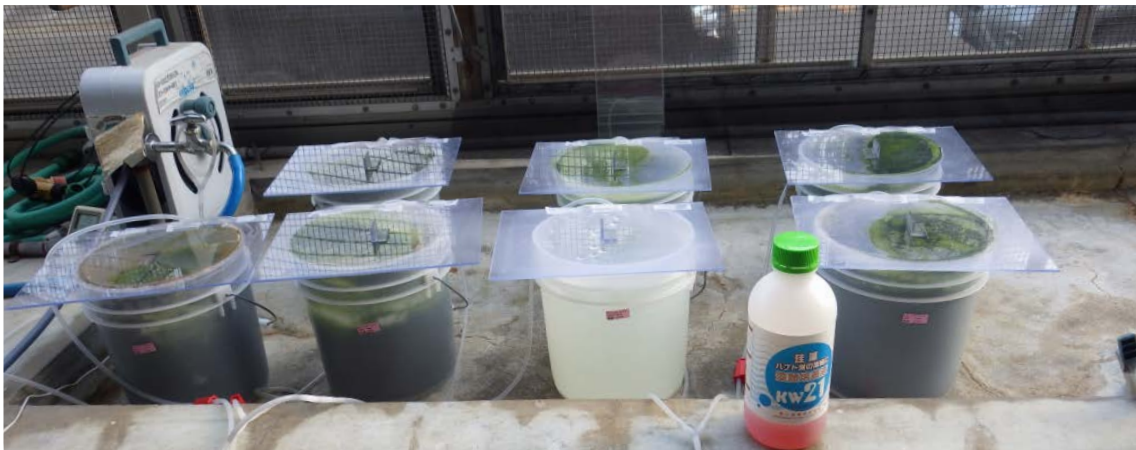
<培養する場所>

- ・ガラス温室など太陽光が確保できる場所。電動エアーポンプを使用するので風雨をしのげる場所が好ましい。

<培養手順>

- 継ぎ種として、緑色に濁っている魚類の飼育水等を用意する。
- サンペールバケツに水道水を 5 L 以上汲み、ガラス温室に設置する。電動エアーポンプは直射日光が当たらない日陰に設置する。
- ピペットを用いて、藻類培養液 KW21 および魚類の飼育水を約 15 mL ずつバケツに添加する。
- 通気用のエアーストーンをバケツに入れ、塩ビ版で蓋をし、バケツと塩ビ版の隙間はサランラップ等のフィルムで塞ぎ培養液の蒸発を防止する。

- 通気を開始する。通気量が多すぎると培養液の蒸発が激しくなる。また、少なすぎると藻類の増殖・収量が低下する。培養液が程よく上下に攪拌される通気量とする。
- 太陽光で培養を行う。2~3週間で培養液は緑色に濁る。この時点では藻類量が少なすぎるので培養を継続する。
- 数ヶ月後、バケツ内壁に藻類のバイオフィームが付着し培養液自体は透明となる。この状態に達したら、コガタシマトビケラのエサとして藻類を回収する。



農業環境変動研究センターにおける培養風景

藻類の元種は屋外のメダカ飼育水である。ガラス温室で培養し植え継ぎを繰り返して数年間維持している。手前中央の白いバケツは植え継いだ直後のもの。それぞれのバケツは約1ヶ月間隔で植え継いでいる。

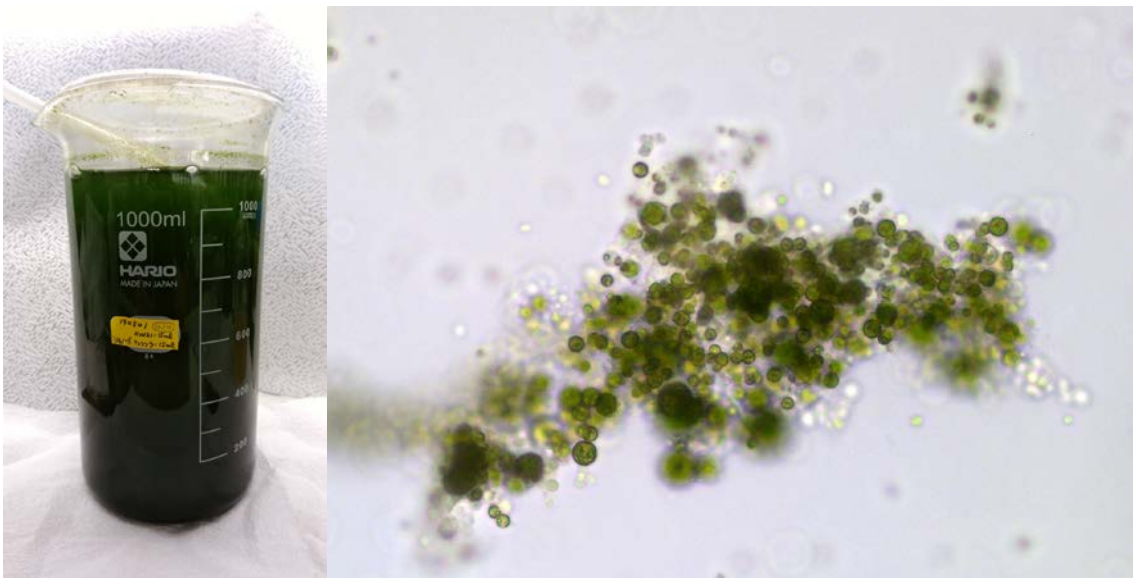


培養液の状態

左：培養開始約1ヶ月後。培養液は緑色に濁っている。
右：培養開始約4ヶ月後。培養液は透明になり、壁面に藻類バイオフィームが付着。

＜藻類バイオフィルムの回収と幼虫への給餌＞

- サイフォン等を用いて透明になった培養液を捨てる。
- 底にたまった藻類やバケツ内壁に付着したバイオフィルムをこそぎ取ってビーカーなどに回収する。
- 回収したバイオフィルムを金網ザル（2 mm メッシュ）等で裏漉しして適度な大きさに粉碎し、ビーカーに入れ蒸留水で1Lにマスアップする。これをコガタシマトビケラ幼虫用の藻類懸濁液とする。
- 藻類懸濁液は、弱く通気しながら室温で1ヶ月程度腐敗することなく保管できる。
- ピペットを用いて藻類懸濁液を適宜、幼虫飼育水槽に添加して与える。



藻類懸濁液と顕微鏡写真

- 左：回収した藻類懸濁液（2019年5月～12月まで培養したもの）。室温で通気しながら1ヶ月程度エサとして使用できる。
- 右：藻類培養液の顕微鏡写真（対物20倍）。その他、シアノバクテリアと思われる糸状体なども観察された。

附属資料 1-G 卵塊剥離用の金属ヘラの作成

金属ヘラは、ステンレス製ミクロスパーテルのヘラの部分を片刃になるように研磨して作成する。ミクロスパーテルのヘラの片面をミニサンダで荒削りし、最後に砥石で先端部が鋭利になるように仕上げる。農業環境変動研究センターでは、刃先の角度はおよそ 48~49°のものを用いている。ミニサンダによる荒削りで角度が決まるので注意すること。荒削りする際は、ヘラ先端部を左右均一に押し当てて削ること。薄刃の方が卵塊を剥離させるときに卵を潰さないのが望ましいが、ステンレス製なので物理的衝撃に弱く刃先が曲がりやすいので取り扱いに注意する。刃先が曲がったときは砥石で整える。

使用した研磨道具

ミニサンダ：RYOBI 製 S-550M

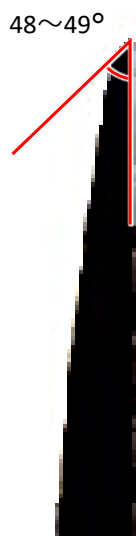
ハイピッチペーパー：三共理化学株式会社、サイズ 75×110 mm、粒度 240

アーカンサス砥石（medium および fine）、ホーニングオイル

ミクロスパーテル



拡大図（側面）



拡大図（上面）



附属資料 1-H 幼虫のエサ用のテトラフィン粉末の調整法

幼虫にとってテトラフィンは栄養価が高く、入手・保管がしやすいため室内飼育に適した人工飼料である。しかしながら、テトラフィンは幼虫には大きすぎるフレーク状のため、幼虫の成長にあわせて大きさの異なる粉末に調整する必要がある。ここではテトラフィン粉末の調整法を解説する。

<準備するもの>

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。

- ・ワンダーブレンダーWB-1（大阪ケミカル株式会社）
- ・ステンレスふるい（75 mm×20 mm、目開き 500 μ m、250 μ m、53 μ m）、受け器（サンポーター）
- ・すりこぎ
- ・ハケ（毛束を輪ゴムで縛り、毛先に力が伝わりやすいようにしておく）
- ・テトラフィン金魚のえさ（スペクトラムブランドジャパン社）
- ・ポリ袋



＜テトラフィン粉末（大）と（中）の作り方＞

- ▶ テトラフィンを透明ポリ袋に適量入れ、手でよく揉んで細かく砕く。
- ▶ 一番下に受け器、その上に目開き 250 μm のふるい、その上に 500 μm のふるいにセットする。
- ▶ 砕いたテトラフィンを 500 μm で篩う。大きな破片はすりこぎで砕く。
- ▶ 250 μm のふるい上に溜まった粉末を、机にふるいをトントンと打ち付ける垂直運動でふるい分ける。
- ▶ 250 μm のふるい上に残った粉末をテトラフィン粉末（大）とする。受け器に溜まった粉末をテトラフィン粉末（中）とする。粉末（中）を多く必要とする場合は、250 μm のふるい上の粉末（大）をすりこぎを用いて粉碎して受け器にふるい落とす。以上の作り方では、粉末（中）に < 53 μm の粒子はほとんど含まれない。
- ▶ テトラフィン粉末（大）および（中）は、スクリー管瓶に入れて保管する。

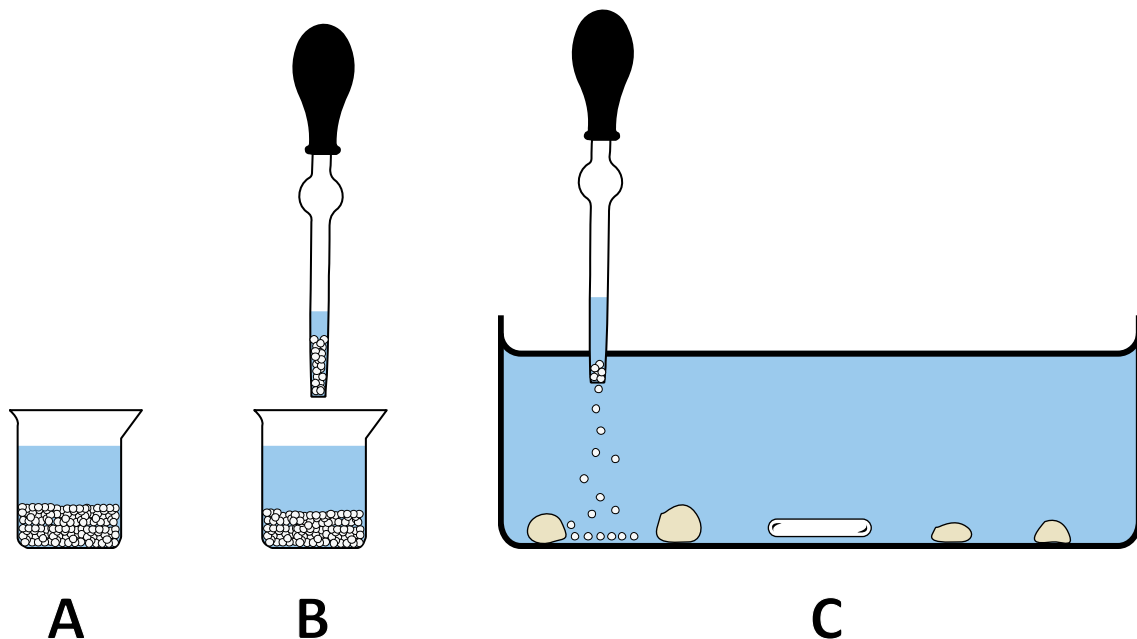
＜テトラフィン粉末（小）の作り方＞

- ▶ テトラフィンをワンダーブレンダーで粉碎する。ワンダーブレンダーの粉碎力は強力で、10秒以上連続して回転させると粉碎物が熱を持ち始める。テトラフィンは温まると脂質が粘りを帯びてふるいに付着して分画できなくなる。そこで、熱を帯びないように数秒間粉碎した後、十分な時間冷却し、また数秒間粉碎する、という作業を数回繰り返す。
- ▶ 一番下に受け器、その上に目開き 53 μm のふるいをセットする。
- ▶ 粉碎したテトラフィンを適量ふるいにのせ、ハケの毛先で粉末をトントン押すように裏漉しする。ふるいが詰まり気味になったら、ふるいを洗浄してよく乾かしたのち作業を再開する。
- ▶ 受け器に溜まった粉末をテトラフィン粉末（小）とし、スクリー管瓶に入れて保管する。

附属資料 1-I 幼虫飼育水槽の準備（底質のガラスビーズの投入方法）

新しい幼虫飼育水槽を準備する際に、底質として用いるガラスビーズ（粒径 0.6 mm）を均一に投入する方法を解説する。

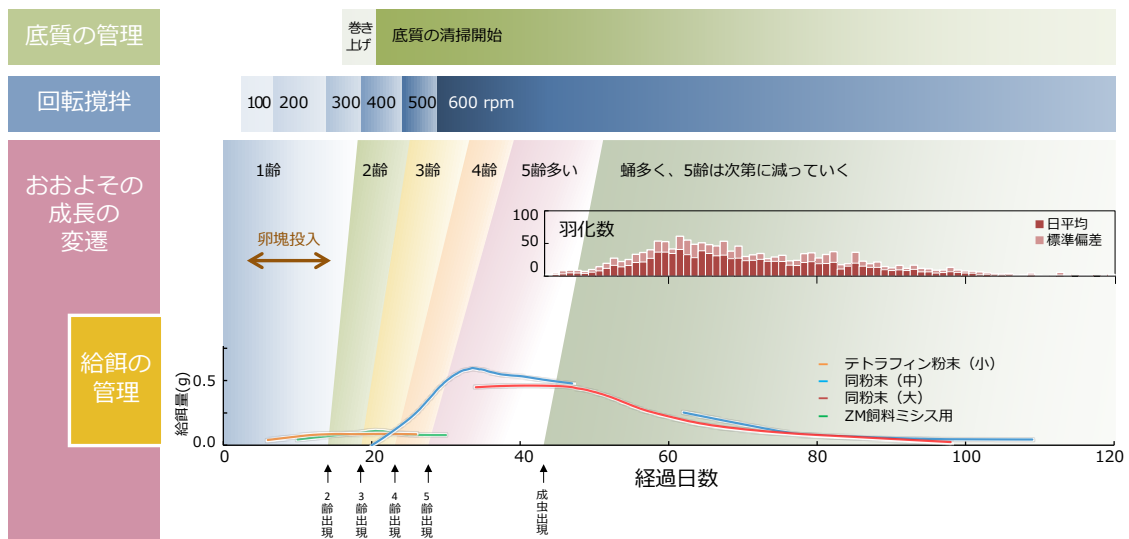
- ▶ 所定量のガラスビーズを 100 mL ビーカーにとり、飼育水を入れる。新しいガラスビーズの場合は、ビーズの間隙に空気をかんでしまい飼育水となじみにくい。その場合は、10分程度超音波をかけるとガラスビーズの間隙の空気が抜ける（下図 A）。再利用のガラスビーズの場合は飼育水になじみやすい。
- ▶ 先端を切った広口の駒込ピペットを用いて、勢いよく水とともにガラスビーズを吸い上げる（下図 B）。駒込ピペットは垂直に保つと比重の重いビーズはピペット先に沈殿する。ここで、ピペットの先端に気泡が入らないように注意する。
- ▶ ピペットを垂直に保ったまま、幼虫飼育水槽の水面下にピペット先を浸けると、ガラスビーズは自然落下して分散しながら均一に水槽底に沈殿する（下図 C）。このとき、駒込を押しで強制的にガラスビーズを押し出しさない。また、ピペット先に気泡があるとガラスビーズは落ちないので、吸い上げたガラスビーズを一旦ビーカーに戻してやり直す。
- ▶ 上記ピペット操作を繰り返して、所定量のガラスビーズを全量均一に投入する。なお、スターラーの回転部にはガラスビーズを投入しない。



附属資料 1-J 幼虫の飼育管理の事例

幼虫の飼育管理の事例として、農業環境変動研究センターにおける2016年6月10日から2017年1月27日までの飼育結果を紹介する。期間中、アクリル製円形水槽7個（1容器当たりの平均卵塊投入数331個、最小—最大：94～601個）を幼虫飼育に使用した。幼虫飼育水槽ごとに、各成長段階の初確認日とその成長段階が優占した日付、羽化記録、飼育水の回転速度の記録、日々の給餌量等の統計をとった。下図は7個の幼虫飼育水槽の平均値を示したものである。幼虫の成長や給餌量は水槽間でバラツキが大きく、表1-5に示した目安との誤差があった。水槽の状態によって給餌量等の幼虫の飼育管理を柔軟に変更した結果、飼育水槽1個あたり平均1063個体の成虫が羽化し、飼育結果は良好であった。

給餌量は4齢期以降急激に増加し、5齢が優占する時期に最多となる。40日以降、成虫が羽化し始め、60日頃に羽化数はピークを迎え、その後次第に減っていく。給餌量は羽化数の増加とともに減少させていく。60日以降、テトラフィン粉末（中）を再び給餌し始めているが、これはテトラ（大）よりも粒子サイズが小さく、幼虫個体密度が減った飼育水槽内でよく分散し、捕獲網に捕捉される機会が増えると期待されるからである。なお、60日以降、テトラ（中）と（大）を同時に与えているように見えるが、個別水槽毎に見ると、テトラ（大）から（中）へ完全に給餌を切り替えており、切り替えのタイミングが水槽間でばらつくため、平均値では同時に与えているように示されている。

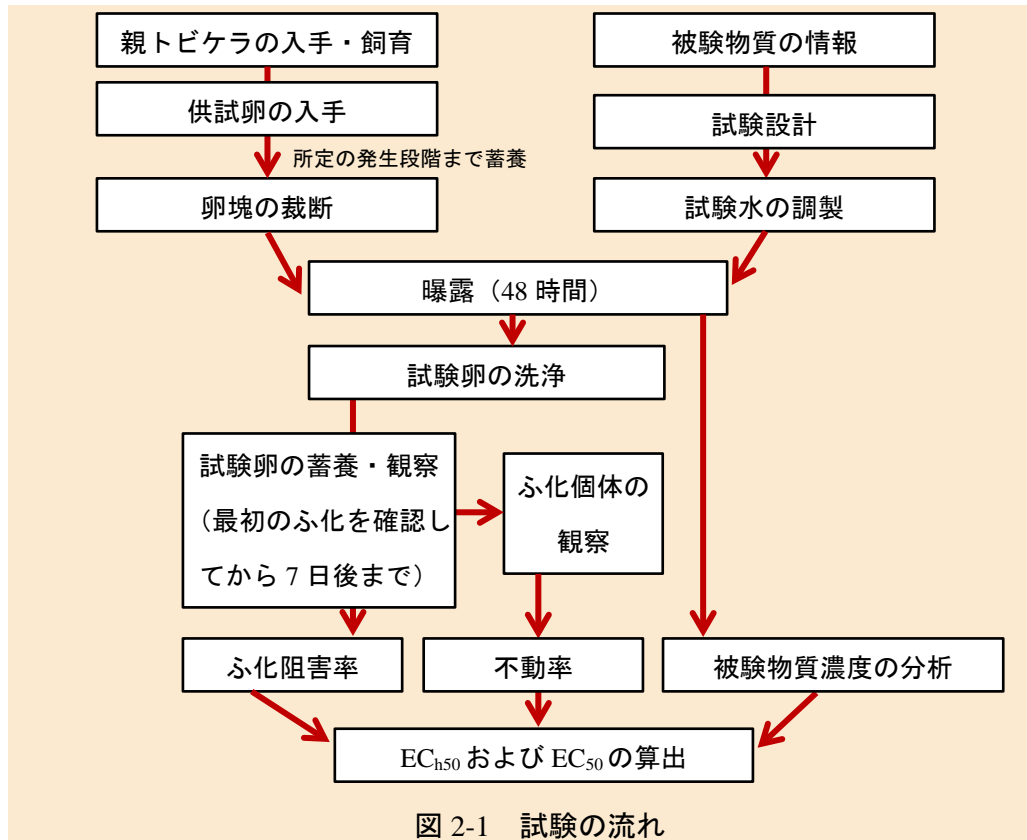


第2章 卵を用いた毒性試験法

コガタシマトビケラ卵に対する農薬の影響を評価する試験法である。水生昆虫の卵期はその生活史において活発に器官形成が行われる成長段階であり、換言すれば、農薬の作用点形成が活発な時期であると考えられる。水生昆虫卵に対する農薬の毒性データは少なく、本試験法は水生無脊椎動物に対する農薬の生態リスク評価において貴重な毒性データを提供すると期待される。

2-1. 試験概要

試験開始時に所定の発生段階に達した卵を、数段階の濃度の被験物質に48時間曝露する。曝露終了時に試験卵を希積水で洗浄したのち、清浄な希積水中で蓄養する。その後、試験卵のふ化阻害数およびふ化個体の不動数を観察・記録し、48時間曝露における半数ふ化阻害濃度 (EC_{h50}) および半数総合影響濃度 (EC_{50}) を算出する (図 2-1)。



2-2. 被験物質

試験設計に必要となる被験物質の情報（水溶解度、オクタノール-水分配係数、水中安定性、純度等）や、試験水中の被験物質濃度の測定法および回収率・定量限界等の情報を収集・整備しておく。これらの情報を基に、試験水の調製法や試験容器等の試験設計を検討する。

2-3. 基準物質

基準物質を用いた試験を実施し、試験系・試験条件の妥当性を確認することが望ましい。基準物質としては、リングテストに用いられたジフルベンズロンが推奨される。また、コガタシマトビケラ卵を用いた毒性試験結果が文献等で公開されている場合は、その被験物質を基準物質として用いても良い。

2-4. 試験の妥当性

試験の妥当性基準は以下の通り

- 試験期間中において対照区の背景異常卵率（[2-9. 用語の定義](#)）は10%を超えてはならない。
- 試験期間中において対照区の総合影響率が10%を超えてはならない。
- 溶存酸素濃度は曝露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

2-5. 試験方法

(1) 主な使用機器・器具類

供試卵を卵塊から裁断する道具として、腰が強く先端の細い解剖針と片刃のヘラを使用する。曝露するための試験容器には、ガラス製もしくは化学的に不活性な素材の容器を用いる。

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。ガラス製器具類については、使用前に適切な方法で洗浄しておく。

<供試卵の準備用>

- タングステン針： プローブニードル H-W-1（先端半径 25 μm×L38 mm、株式会社 ESS テック）（[附属資料 2-A タングステン針と金属ヘラの作成](#)）
- 金属ヘラ： ステンレス製ミクロスパーテルのヘラの部分を片刃になるように研磨して作成（[附属資料 2-A タングステン針と金属ヘラの作成](#)）。

実体顕微鏡： MZ75 (ライカマイクロシステムズ株式会社)
 光学顕微鏡： DMIRB (ライカマイクロシステムズ株式会社)
 供試卵の蓄養容器： ポリスチレン製 24 穴マルチディッシュ (Nunc, 平底)
 ロータリーシェーカー： RS-200 (柴田科学株式会社)

<試験水の調製用>

残留塩素計： OYWT-31 (株式会社オーヤラックス)
 天秤： AG245 (メトラー・トレド株式会社)
 ダイリゅうター： MICROLAB[®] 500 SERIES (Hamilton)
 マイクロピペット： Eppendorf Research Plus (100)
 ディスペンサー： Eppendorf Multipette Plus
 スターラー： MAGNETIC STIRRER REMIX RS-6D (アズワン株式会社)
 試験水調製用容器： ガラス製ビーカー

<曝露試験用>

曝露試験容器： ガラス製ビーカー (200 mL 以上)
 一時プール用容器： ガラス製ビーカー (50 mL)
 温度計： Thermo Recorder RTR-52 (株式会社ティアンドデイ)
 pH 計： LAQUA twin (株式会社堀場製作所)
 溶存酸素計： NeoFox (OceanOptics 社)
 温度制御装置： 試験温度を一定に維持できる恒温室、インキュベーター等の装置
 ロータリーシェーカー： RS-200 (柴田科学株式会社)

<曝露終了後用>

フィルター： 24 mm Netwell insert with 74 μ m mesh (Corning Inc.) もしくは
 セルストレーナー (70 μ m ナイロンメッシュ、FALCON)
 洗浄用容器： ガラス製ビーカー (50 mL)
 蓄養用容器： ポリスチレン製 24 穴および 6 穴マルチディッシュ (Nunc, 平底)
 ディスペンサー： Eppendorf Multipette Plus
 実体顕微鏡： MZ75 (ライカマイクロシステムズ株式会社)
 光学顕微鏡： DMIRB (ライカマイクロシステムズ株式会社)
 ロータリーシェーカー： RS-200 (柴田科学株式会社)
 温度制御装置： 試験温度を一定に維持できる恒温室、インキュベーター等の装置
 照明： トレビューアーA4-500 (株式会社トライテック)

(2) 供試生物

■ 生物種

- コガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) を用いる。
- 供試生物は経歴(入手源、飼育方法等)の明らかなものを用いる。農業環境変動研究センターでは、2004年より室内飼育系統を維持しており、卵塊の配布を行っている¹。
- 基準物質での半数影響濃度を確認することが望ましい。

■ 親トビケラの飼育

供試卵を得るための親トビケラの入手・飼育については、[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

■ 生育段階

試験には卵を用いる。なお、農薬の作用機作によっては、発生段階により感受性が大きく変動する可能性がある。したがって、少なくとも発生早期、中期、後期の3つの異なる発生段階の卵を用いて予備試験を実施し、感受性の最も高い発生段階で本試験を実施する^{2,3}。

コガタシマトビケラ卵の発生段階を区別するため、ここでは便宜的に、発生早期(産卵1日後)、中期(4日後)および後期(7日後)を各々E1期、E4期およびE7期と呼ぶこととする(図2-2)。トビケラ胚発生に関する研究例は少ないが、Yokoyama(2019)がコガタシマトビケラの胚発生の概要について報告している。また、Miyakawa(1973)はヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)の胚発生を詳細に報告しており、コガタシマトビケラの胚発生を考えると参考となる。それによると、コガタシマトビケラ卵のE1期は、ヒゲナガカワトビケラ胚のStage 3(胚盤・胚条形成期)、E4期はStage 6(中期前姿勢転換期)、E7期はStage 9(後姿勢転換期)に比定されると考えられる。E1期は卵が膨張する前の発生段階である。E4期は昆虫胚特有の胚運動である姿勢転換(もしくは胚反転という)前の発生段階である。E7期は胚の姿勢転換が完了し、胚を包んでいた胚膜が開裂して胚背部に収斂し二次背器を形成する発生段階である。

¹ 自機関で親トビケラを飼育して供試卵を得るのではなく、農業環境変動研究センターからの配布を希望する場合は、「コガタシマトビケラ成長段階別毒性試験法マニュアル」の巻末に記載されている連絡先に問い合わせる。必要な卵塊数、納期等について農業環境変動研究センターの担当者と事前に十分調整を行う。卵塊の配布等の手続き・費用等については、別途、農研機構の定めるところに従う。配布の際は、裁断済みの卵塊片を配布する。

² 農業環境変動研究センターより供試卵を入手する場合は、輸送にかかる所要日数を考慮すると、E7期の卵を用いた毒性試験が実施可能である。

³ ここでは供試卵の発生段階としてE1期、E4期、E7期を提示したが、被験物質の作用機作等の理由から、その他の発生段階の卵を試験に供することができる。ただし、産卵後8日以降(20℃でE8期以降)の卵は曝露試験中にふ化する可能性があることに留意する。

コガタシマトビケラ卵のふ化所要日数は、20℃の温度条件下で約10日間である（図2-2）。10℃～25℃の間では温度依存的に発生が速くなる。また、溶存酸素の供給が滞る場合は発生が遅くなる。逆に、産卵用基質から卵塊を剥離させて蓄養すると酸素供給効率が高まるためか、発生が速くなる。

産卵用基質に産下された供試用卵塊を蓄養するときは、試験と同じ条件（希釈水・温度・光）下で、希釈水（蓄養水）を十分通気させる。

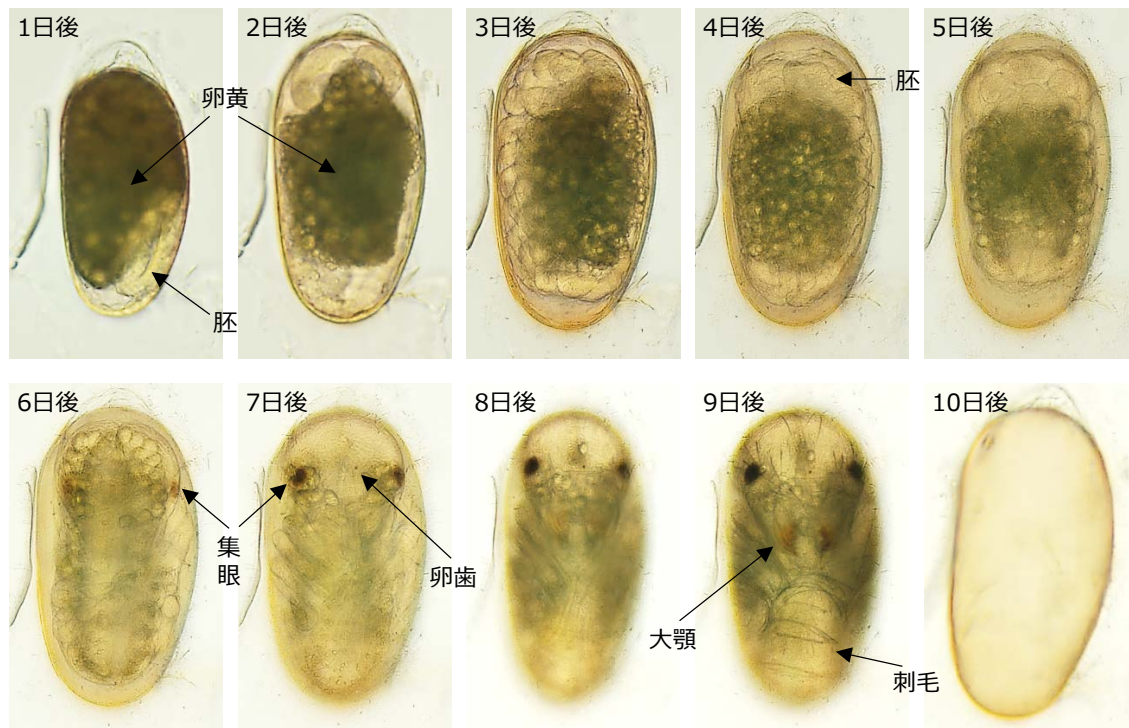


図2-2 卵（腹側）の顕微鏡写真（20℃で蓄養）

■ 供試卵の発生段階の確認

ここでは、E1 期、E4 期および E7 期の発生段階の卵を試験に供試することを想定し、発生段階の識別法を説明する。20℃条件下では産卵からの経過日数が識別の参考となる（産卵 1 日後＝E1 期、4 日後＝E4 期、7 日後＝E7 期）。しかしながら、室内飼育環境下であってもコガタシマトビケラの産卵のタイミングを精密に制御することはできないうえ、産卵のタイミングを常時記録することは飼育作業の都合上不可能である。したがって、同一産卵日の卵塊間で発生段階に 1 日程度のバラツキが生じる⁴。以上より、産卵からの経過日数はあくまで目安として用い、正確な発生段階の識別は光学顕微鏡観察により行う。金属ヘラで供試用卵塊の一部を産卵用基質から剥離させ、希釈水の入った 12 穴マルチディッシュに移して観察を行う。以下に各発生段階の特徴を記載する。

E1 期：産卵 1 日後（20℃）の卵で、卵が膨張していないものを試験に供する（図 2-3A～D）。産卵 2 日後（20℃）には卵が吸水により膨張する（E2 期、図 2-3E）。このような状態の卵は E1 期の試験に用いない。

E4 期：産卵 4 日後（20℃）の卵で、胚体が背側まで伸長したものをを用いる（図 2-4A）。図 2-4B のような、尾端方向に細粒塊が伸び始めている卵は、産卵 5 日後（20℃、E5 期）に相当するので、E4 期の試験には用いない。なお、E5～E6 期にかけて尾端が腹側に伸長する姿勢転換が起こる。

E7 期：産卵 7 日後（20℃）の卵で、二次背器が明確に確認できる発生段階の卵を試験に供する（図 2-5C～F）。E7 期は姿勢転換が完了したのち（図 2-5A, B）、胚体を包んでいた胚膜が破れて背側に収斂し二次背器を形成すると考えられる（図 2-5C, D）。このような二次背器形成期の卵は試験に用いても良い。形成直後の二次背器は円形で明確に視認できるが（図 2-5C, E）、その後卵黄に取り込まれつつ縮小する（図 2-5F）。産卵 8 日後（20℃、E8 期）には、二次背器はかなり縮小～ほぼ消失の状態となる（図 2-5G）。このような卵は E7 期の試験に用いない。

⁴ 農業環境変動研究センターの室内飼育では、毎日 1 回午前中に産卵された卵塊を回収しており、前日回収直後から当日回収直前までに産卵された卵塊は同一の産卵日として扱われる。したがって、同一産卵日であっても、発生段階やふ化所要日数は卵塊間で 1 日程度の差が生じる可能性がある。

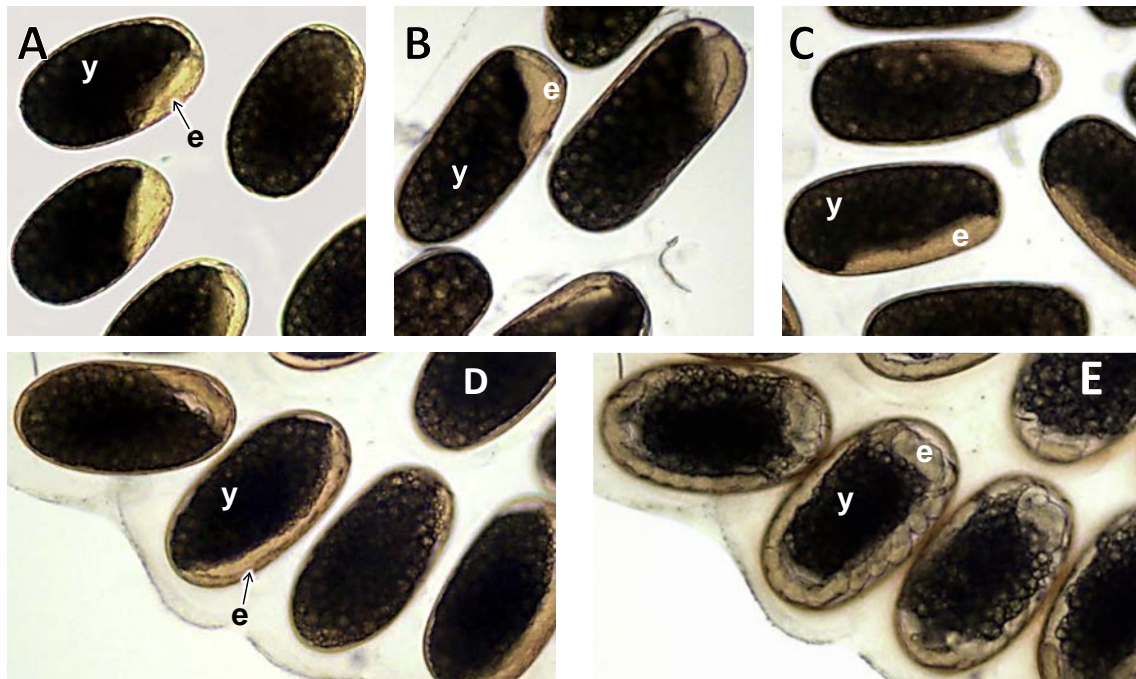


図 2-3 E1～E2 期の卵の光学顕微鏡写真

図中の y : 卵黄, e : 胚を示す.

A～D : E1 期. A から D の順で発生が進んでいる (胚が伸長している).

E : E2 期. D の卵塊片が 1 日経過した状態. 吸水により卵が膨張し, 胚はさらに伸長している.

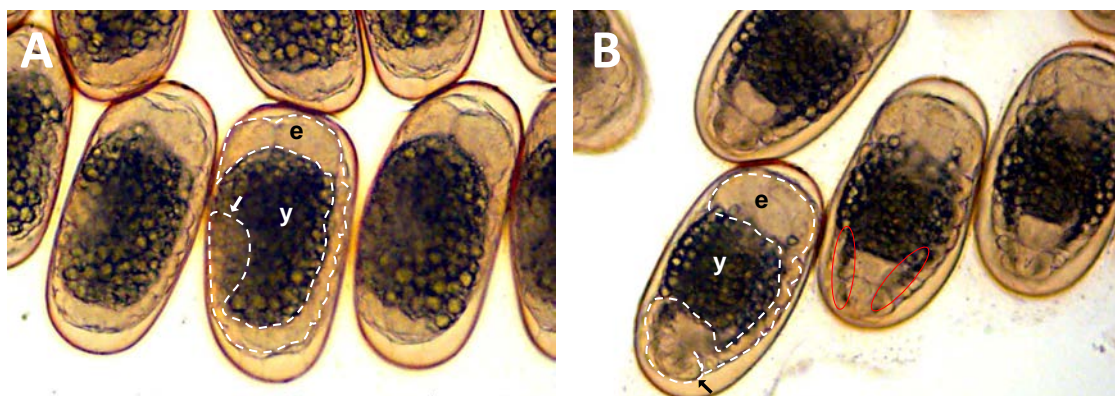


図 2-4 E4～E5 期の卵 (背側) の光学顕微鏡写真

図中の y : 卵黄, e : 胚を示す. 胚体の領域を白破線で図示する.

A : E4 期. 胚体は背側まで伸長している. 白矢印は尾端を示す.

B : E5 期. ヒゲナガカワトビケラ卵の Stage7 (後期前姿勢転換期) に相当すると考えられる. 黒矢印は尾端側を示す. 細粒塊が尾端方向に伸びている (赤線枠).

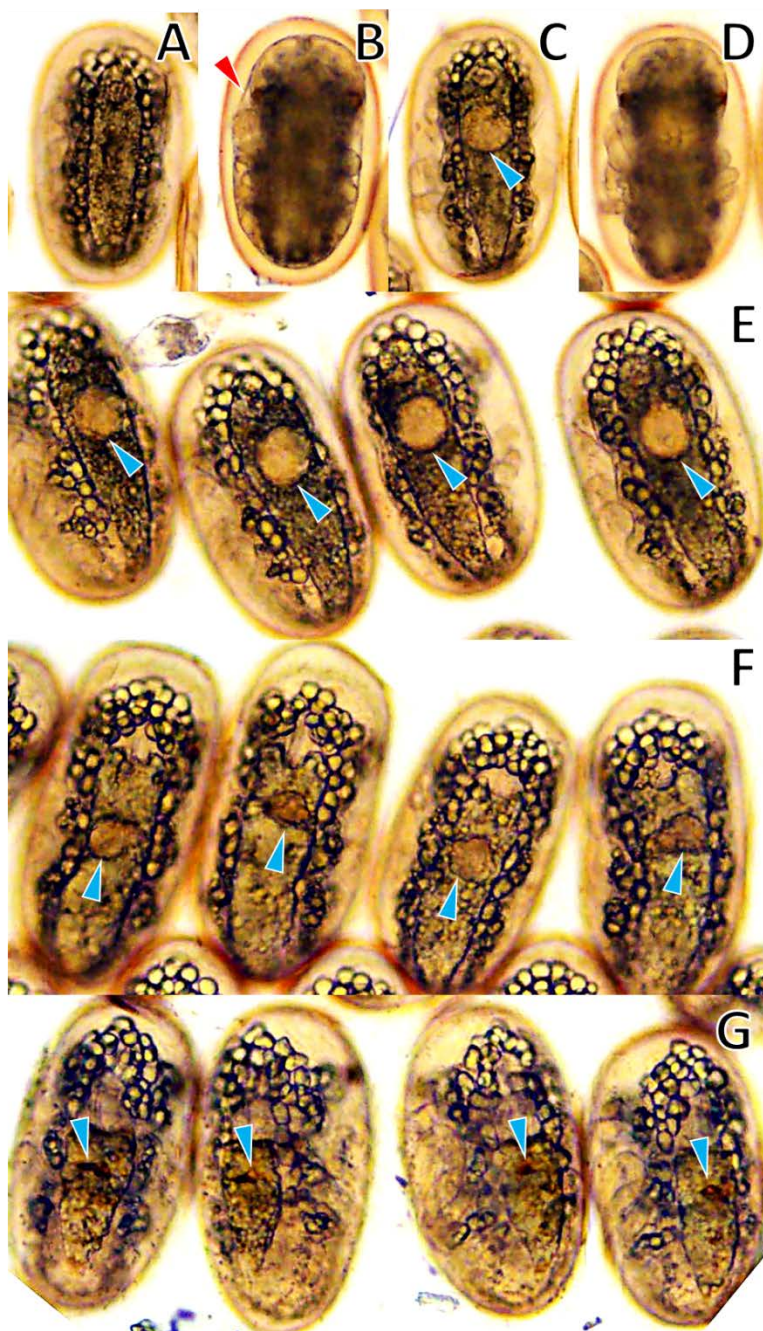


図 2-5 E7~E8 期の卵（背側）の光学顕微鏡写真

図中青三角は二次背器を示す。赤三角は胚膜を示す。

A および B : E7 期（二次背器形成直前）。焦点を変えて同一卵を撮影。胚膜があり二次背器は未形成。

C および D : E7 期（二次背器形成）。焦点を変えて同一卵を撮影。胚膜は消失し、円形の二次背器が確認される。

E : E7 期（二次背器は円形で最も大きく視認できる）。

F : E7 期（二次背器は縮小しつつある）。

G : E8 期（二次背器はほぼ消失）。

■ 供試卵の準備

卵塊からの供試卵の切り出し（裁断）は、実体顕微鏡下で行う。所定の発生段階に達した卵塊が産み付けられた産卵用基質を実体顕微鏡にセットする。卵塊は平均約 300 個の卵が平面的に並んでおり（図 2-6A）、表面は薄いゼラチン質に包まれている。まず、タングステン針で卵と卵の間に切れ目を入れる。片刃の金属ヘラを用いて切れ目を入れた箇所の卵塊を産卵用基質から剥離させ分離する（図 2-6B）。1 卵塊片には 5~20 卵含まれるように裁断する（図 2-7）。乾燥しないうちに裁断した卵塊片をガラスピペットで吸い取って、希釈水を 3 mL/ウェルずつ分注したポリスチレン製 24 穴マルチディッシュに投入する。光学顕微鏡を用いて裁断した卵塊片の発生段階や発生異常卵の有無を最終確認する。所定の発生段階に達し、なおかつ発生異常卵を含まない卵塊片を試験に供する。卵塊片は無作為抽出で 20 卵ずつ群分けし、曝露開始までポリスチレン製 24 穴マルチディッシュに入れたままロータリーシェーカー上で蓄養する（70 rpm）。

注意事項として、E1 期の卵は軟弱で潰れやすいため裁断操作は慎重に行う。また E1 期では、背景異常卵（被験物質の曝露によらない発生異常卵）と正常卵の区別が難しく供試卵に背景異常卵が混入しやすいので注意する（[附属資料 2-B E1 期の卵における背景異常卵の見分け方](#)）。一方、E4 期、E7 期は背景異常卵と正常卵の区別が容易である。



図 2-6 コガタシマトビケラの E7 期の卵塊全景 (A) と裁断の手順 (B)

20 卵/片の卵塊片を裁断する場合を例として、B の図で説明する。

- ① 破線に沿ってタングステン針を卵と卵の間に差し込み、切れ目を入れる。その際、胚発生の状態が他とは異なる卵（赤矢印）は避ける。
- ② 卵塊の縁から矢印の方向へ、片刃の金属ヘラを卵塊と産卵用基質の間に差し込んで、卵塊片を剥離させる。遊離した卵塊片をガラスピペットで吸い取り、24 穴マルチディッシュに移す。



図 2-7 裁断された卵塊片

(3) 曝露方法

止水式または半止水式により曝露試験を行う。

(4) 曝露期間

48時間とする。

なお、農薬の作用機作により48時間以上の曝露で影響を受けると推測される場合は、オプションとして、発生早期から後期の間で、曝露期間を2～8日間に設定して試験を実施することが可能である。

(5) 試験生物数および試験区の設定

■ 試験生物数

試験区ごとに少なくとも20卵を使用する。

■ 試験区の設定

➤ 試験濃度区の設定

- ・等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。ただし、被験物質の性状により広い濃度範囲で影響が認められる場合はもっと大きな公比でも良い。
- ・試験濃度および濃度公比は、予備試験の結果を参考にして決定する。
- ・濃度範囲には、試験生物のすべてに影響が見られる濃度と全く影響が見られない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部に影響が見られる濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。
- ・試験濃度の上限は100 mg/Lとする。但し、被験物質の性状によりこれらの濃度の試験が困難な場合は技術的に可能な濃度を上限とする。上限濃度で被験物質の毒性によると考えられる影響がみられた場合は、これらの上限濃度以上の濃度区を設定し可能な限りEC₅₀値を求めることが望ましい。

➤ 対照区の設定

- ・被験物質を含まない無処理対照区を設ける。
- ・試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区も設ける。

(6) 試験水の調製

試験水の調製方法は以下のとおりとする。なお、試験水および試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

- 易水溶性農薬の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験水又は試験原液を調製する。
- 難水溶性農薬の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験水または試験原液を調製するか、有機溶剤を助剤として用いて試験原液を調製する。助剤は試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で試験生物に対して有害性が認められず、かつ被験物質の性質を変えないものを用いる。参考として、1 齢幼虫に対して最も毒性の低い有機溶媒としてアセトンおよびメタノールが挙げられる（[第3章 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)参照）。
- 助剤の試験水中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100 mg/L（又は 0.1 mL/L）を超えないことが望ましい。

(7) 曝露の開始と曝露試験条件

曝露操作の流れを図 2-8 に示す。調製した試験水を試験容器および一時プール用ビーカー（50 mL）に分注する。ガラスピペットを用いて裁断した供試卵を少量の希釈水とともに一時プール用ビーカーに滴下して沈め、試験水になじませたのち、直ちに試験容器に移し曝露を開始する。試験容器はロータリーシェーカー上に設置し、試験水を攪拌する（70 rpm）（図 2-9）。

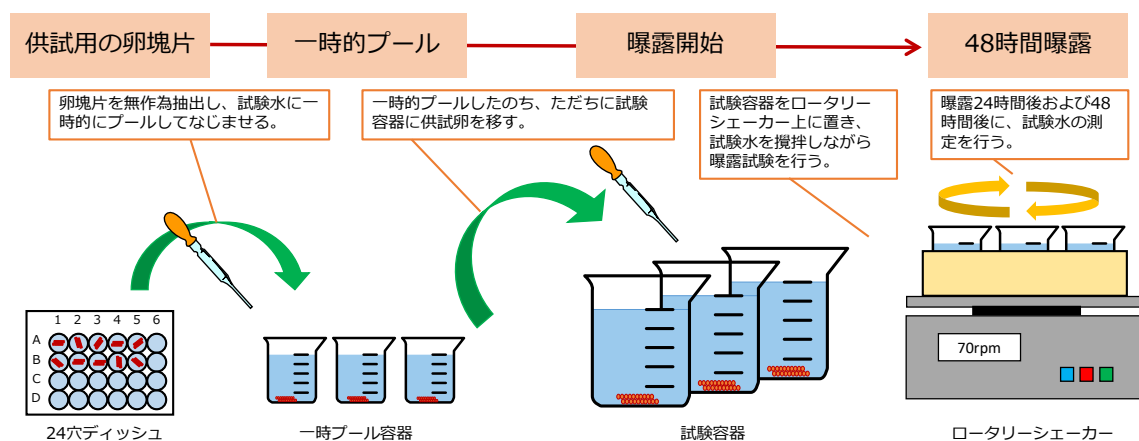


図 2-8 曝露試験の操作の流れ

曝露の環境条件は以下の通りである。

■ 試験水量

卵1個あたり10 mL以上とする。

■ 水温

設定濃度は20℃とし、曝露期間中の変動範囲は±1℃以内とする。

■ 照明

12～16 時間明期が望ましい。ただし、被験物質の水中光分解性が高い場合は暗所試験を実施しても良い。光周期はトビケラ卵の発生に影響を与えない。

■ 給餌

曝露期間中は給餌を行わない。

■ 希釈水

- 脱塩素水道水を用いる。
- 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まない水質であること。
- 使用前には十分に曝気するとともに、温度調整を行う。

■ 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、曝露期間を通して試験温度での飽和濃度の60%以上を保つようにする。

■ pH

試験水のpH調整は行わない。

■ 給気

曝露期間中は、試験水に給気しない。

■ 試験水の攪拌

曝露期間中は、試験容器をロータリーシェーカー上に設置し、70 rpm で試験水を攪拌する。

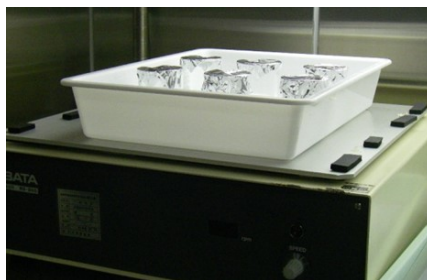


図 2-9 卵を用いた曝露試験風景

(8) 曝露の完了と試験卵の洗浄

図 2-10 に曝露の完了と試験卵の洗浄操作を示す。

曝露 48 時間後に、ガラスピペットを用いて、試験区毎に試験卵を可能な限り少量の試験水とともに希釈水 50 mL の入ったガラス製ビーカーに移し曝露を完了させる。

次に、試験区毎に試験卵をフィルター上に移して希釈水 200 mL で約 50 秒間通水洗浄する。

通水洗浄後、10 mL/ウェルの希釈水が入ったポリスチレン製 6 穴マルチディッシュに、洗瓶を用いてフィルターから洗浄した試験卵を洗い流して移し、さらに、3 mL/ウェルの希釈水が入ったポリスチレン製 24 穴マルチディッシュに移し替えて試験卵の発生状態を確認したのち、蓄養を開始する。

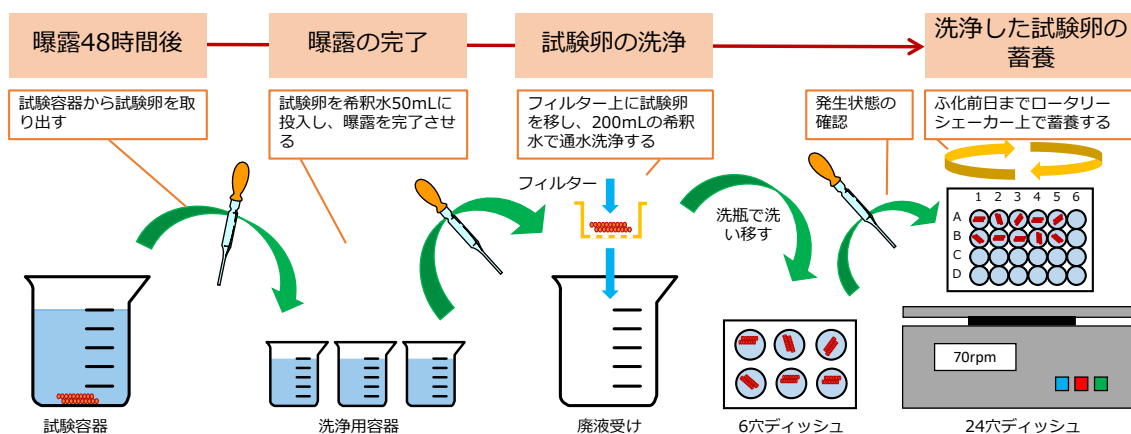


図 2-10 曝露の完了と試験卵洗浄の操作の流れ

(9) 洗浄した試験卵の蓄養条件

48 時間の曝露完了後、洗浄した試験卵のふ化率を確認するため、3 mL/ウェルの希釈水が入ったポリスチレン製 24 穴マルチディッシュで試験卵を蓄養する。光学顕微鏡で試験卵の発生段階を毎日確認し、前ふ化期 (E9 期に相当。図 2-11B~D。大顎が呈色した状態) に達したら、10 mL/ウェルの希釈水が入ったポリスチレン製 6 穴マルチディッシュに試験卵を移す⁵。ふ化個体の水面への浮上を抑制するために、6 穴マルチディッシュの底面から白色蛍光灯もしくは白色 LED による連続光を照射してふ化に備える (図 2-12)。蓄養のための希釈水 (蓄養水) は毎日交換する。

⁵ 一部の試験区の試験卵が前ふ化期に達したら、全ての試験区の試験卵を 6 穴ディッシュに移す。

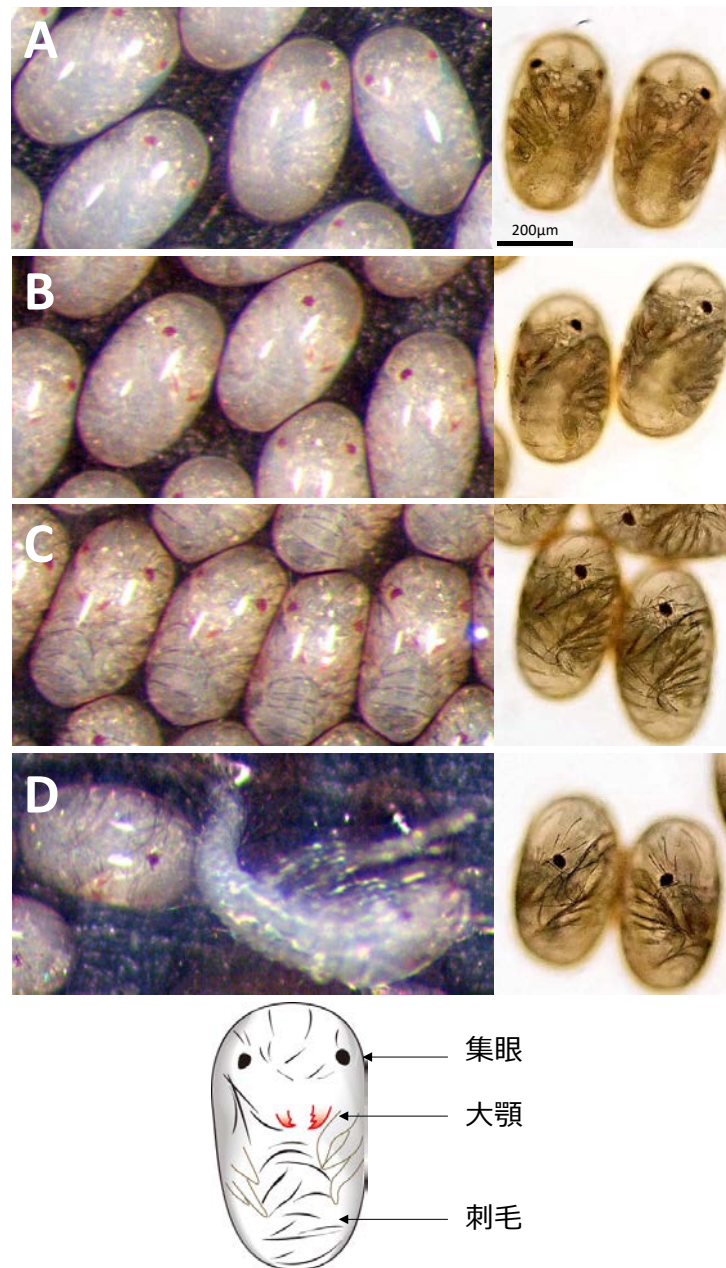


図 2-11 発生後期の卵の状態（腹側）

左列：実体顕微鏡像，右列：光学顕微鏡像。

A：産卵 8 日後。大顎は呈色していない。刺毛は視認できない。

B：前ふ化期（産卵 9 日後）。大顎が呈色。光学顕微鏡では刺毛がうっすらと確認できる。

C：前ふ化期～ふ化期（産卵 10 日後）。実体顕微鏡でも刺毛が視認できる。

D：ふ化期（産卵 10 日後）。光学顕微鏡で観察すると、頭部の膨張が確認できる。

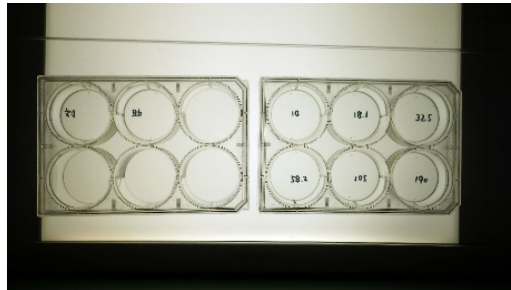


図 2-12 ふ化前日の蓄養（6穴マルチディッシュ底面より連続光照射・静置）

蓄養条件は以下の通り。

■ 蓄養期間

曝露完了後の蓄養開始から最初のふ化個体を確認した日の7日後までを蓄養期間とする。ただし、対照区および全ての試験区において、全ての未ふ化卵に、ふ化が期待できないほどの明らかな発生異常（[附属資料 2-C ふ化阻害卵と発生異常の事例](#)）が認められた場合は、その時点で蓄養を終了しても良い。

■ 蓄養容器

- 洗浄直後～E9期相当： ポリスチレン製24穴マルチディッシュ
- E9期相当以降： ポリスチレン製6穴マルチディッシュ

■ 蓄養水量

- 洗浄直後～E9期相当： 卵20個あたり3mL以上とする。
- E9期相当以降： 卵20個あたり10mL以上とする。

■ 試験水の攪拌

- 洗浄直後～E9期相当： 曝露の環境条件と同じとする。
- E9期相当以降： 攪拌を止め、静置蓄養する。

■ 照明

- 洗浄直後～E9期相当： 曝露の環境条件と同じとする。
- E9期相当以降： 蓄養容器底面から連続光を照射し、ふ化個体の水面浮上を抑制する。

- 水温
曝露の環境条件と同じとする。
- 給餌
曝露の環境条件と同じとする。
- 希釈水（蓄養水）
曝露の環境条件と同じとする。
- 給気
曝露の環境条件と同じとする。

(10) ふ化個体の確認

ふ化個体の確認の操作の流れを図 2-13 に示す。6 穴マルチディッシュに移した洗浄済み試験卵について、試験区ごとに毎日ふ化を確認する。ふ化が確認された場合は、ガラスピペットを用いてふ化個体を希釈水 1.5 mL/ウェルの入ったポリスチレン製 48 穴マルチディッシュに 1 個体/ウェルずつ移し、実体顕微鏡下でふ化個体の不動の有無を確認し、試験区ごとに記録する。

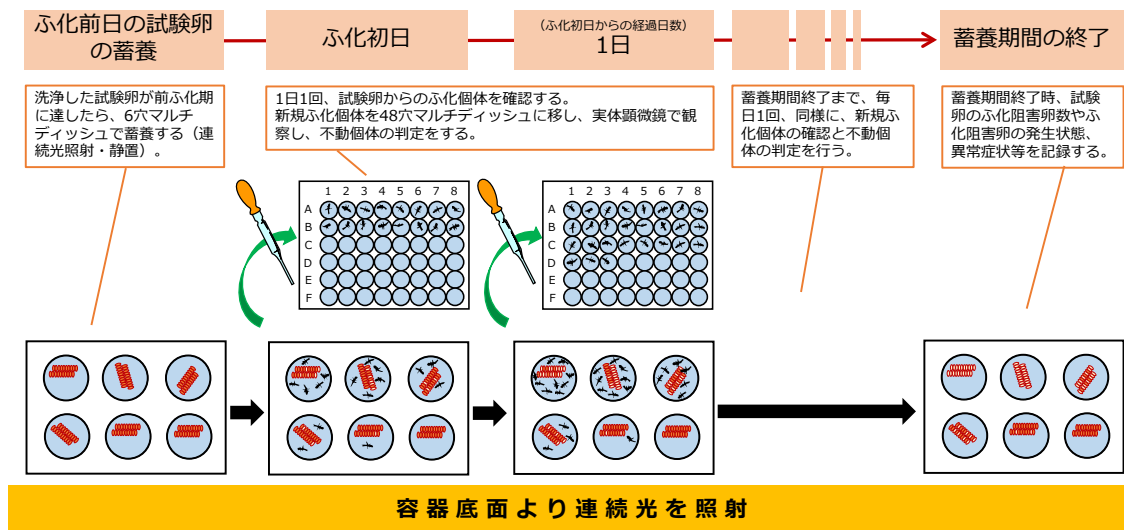


図 2-13 ふ化個体の確認と観察の操作の流れ

(11) 観察と測定

■ 試験生物の一般状態の観察

- ▶ 試験卵: 洗浄した試験卵の発生状態を光学顕微鏡下で毎日観察する。蓄養期間終了時には、ふ化卵数、未ふ化卵数を記録する。ふ化個体が完全に卵殻から脱出し、卵殻のみになったものをふ化卵と判定する。体の一部が卵殻内に残り完全に脱出できていない卵や、卵殻内に胚が完全に残ったままの卵はふ化阻害卵と判定する ([附属資料 2-C ふ化阻害卵と発生異常の事例](#))。その他、胚発生に明らかな異常 (形態異常、胚の萎縮等) が見られた場合は記録する。
- ▶ ふ化個体: 前述のとおり、試験卵からふ化した個体について、ポリスチレン製 48 穴マルチディッシュに移し、実体顕微鏡観察によりふ化確認時 (ふ化当日) の不動個体の有無を記録する⁶。明視野観察の方が判定しやすい (総合倍率~10 倍程度)。不動個体の判定は以下の通り。自発的運動により移動する個体 (体をくねらせて遊泳もしくはウェル底面・壁面を歩行している個体) は正常とする。丸まっているもしくは弛緩している個体については、ガラスピペットを用いて試験水を攪拌して水流刺激を与え、屈伸開脚反応 (刺激に対し体を伸ばしたり丸めたりする反応。体を伸ばす際は同時に脚をひろげる) を示した個体を正常と判定する。水流刺激に対し、屈伸開脚反応を示さない個体および屈伸するが開脚できない個体は不動個体と判定する。水面に浮上している個体は試験水を滴下して沈めてから判定を行う。不動個体の判定の詳細は[第3章 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)を参照のこと。その他、行動や外見に異常が確認された場合は記録する ([附属資料 2-D ふ化個体の異常症状の事例](#))。

■ 被験物質濃度の測定

- ▶ 農薬を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質濃度を少なくとも、曝露開始時、曝露終了時、換水前および換水後に測定する。
- ▶ 被験物質濃度は、曝露期間中、設定濃度の 80 % 以上であることが望ましい。

■ 曝露環境条件の測定

- ▶ 試験に先立って希釈水の水質を確認する。
- ▶ 各試験区における試験水の水温、溶存酸素濃度および pH を曝露開始時、曝露終了時、24 時間毎に測定する。半止水式試験の場合は換水前および換水後も測定する。また、曝露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

⁶ オプションとして、ふ化 48 時間後まで蓄養し屈伸開脚反応の有無を確認することができる。

■ 蓄養環境条件の測定

- ▶ 洗浄した試験卵の蓄養においては、少なくとも対照区における蓄養水の水温を24時間毎に測定する。

2-6. 限度試験

2-5. 試験方法を用いて、被験物質のおおよその毒性を調べるために、被験物質濃度 100 mg/L もしくは被験物質の水溶解度が 100 mg/L 未満である場合はその水溶解度の濃度で限度試験を行ってもよい。限度試験には試験区・対照区ともに20個体の試験個体を用いる。試験終了時に試験区で影響個体が10%を超えたときは、2-5. 試験方法による本試験を行う。

2-7. 結果の処理法

各濃度における曝露に供した卵数から背景異常卵数を差し引いた有効試験卵数に対する未ふ化卵数の割合（ふ化阻害率）から、半数ふ化阻害濃度（ EC_{h50} ）を計算する。

また、各濃度における曝露に供した卵数から背景異常卵数を差し引いた有効試験卵数に対する、未ふ化卵数とふ化個体の不動数を加算した影響数の割合（総合影響率）から、半数総合影響濃度（ EC_{50} ）を計算する。

EC_{h50} および EC_{50} を算出するにあたり、Finney の図解法、対数正規確率紙上での作図法、プロビット法、ロジット法等一般に用いられているいずれの方法でも良い。可能ならばプロビット法やロジット法を用い、95%信頼限界も算出するとともに、総合影響率による EC_{10} を無影響濃度として報告する。ただし、無影響濃度については、 EC_{10} の代わりに0%影響最高濃度を報告しても良い。

被験物質濃度の測定値が設定濃度から±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき EC_{h50} および EC_{50} を算出する。

2-8. 報告事項

試験報告書には次の項目について記載する。

- 1) 試験機関：名称、所在地
- 2) 試験責任者と試験担当者：氏名、所属および連絡先
- 3) 被験物質：化学物質の名称（一般名、商品名等も併記）、構造式（示性式、分子式及び分子量も併記）、入手先、製造年月日及びロット番号、純度及び不純物、水溶解度等の物性に関する資料、その他必須事項
- 4) 試験容器：製品名、材質、形状
- 5) 試験生物：
 - －種名（学名）および系統名
 - －由来（入手先）
 - －飼育方法（馴化中も含む。餌の種類と量、給餌頻度等）
 - －供試卵塊の産卵日・ふ化日・およびふ化率
- 6) 試験条件と方法：
 - －試験開始日、試験終了日および試験期間（本試験および予備試験の試験実施日も併記）
 - －試験温度
 - －希积水の入手源と水質
 - －試験水の状態（透明、白濁、沈殿等）、試験原液の保管方法および試験水への被験物質の添加法（助剤を用いた場合は、その名称・添加方法及び助剤濃度）
 - －試験容器あたりの試験水量および濃度区ごとの試験個体数
 - －濃度区の設定根拠および各濃度区の被験物質の濃度（設定値および実測値）
 - －光源の種類、光周期、照度
 - －試験期間中の溶存酸素濃度、pHの測定法
 - －試験結果の処理法
- 7) 試験結果：
 - －試験条件の測定値（試験温度、溶存酸素濃度、pH）
 - －被験物質濃度の分析結果
 - －各濃度区及び対照区のふ化阻害数およびふ化阻害率、ふ化個体数、ふ化個体の不動数および不動率、ふ化阻害数とふ化個体の不動数を加算した総合影響数および総合影響率
 - －試験終了時の濃度－反応曲線を示す図
 - －EC₁₅₀値およびEC₅₀値（可能であればそれらの95%信頼限界）とその算出法
 - －可能であれば無影響濃度（EC₁₀値）とその算出法（代替として0%影響最高濃度でも良い）
 - －試験水の外観
 - －その他の観察された影響およびそれらが認められた濃度

2-9. 用語の定義

限度試験：適切な濃度において毒性の有無を調べる試験。

予備試験：本試験実施に先立ち、試験条件・試験方法・試験濃度範囲を決定するために行う試験。

本試験：予備試験で得られた情報を基に、最終的な急性毒性値を求めるために行う試験。

試験水：試験生物を曝露するために用いる被験物質を含んだ水。

希釈水：試験水の調製に用いる被験物質を含まない水。

試験原液：試験水の調製に用いる被験物質を含む溶液。

被験物質：毒性試験に用いる農薬。

有効成分：農薬としての薬効を発揮するための主たる成分。

濃度：この試験では、添加濃度、実測濃度、設定濃度等の区別を明確にし、それを表示する。

濃度の単位：化学物質の濃度は重量/容量（ $\mu\text{g/L}$ あるいは mg/L ）で表記する。

助剤：試験水を調製するために用いる有機溶剤

曝露期間： EC_{50} 値および EC_{10} 値を求めるために試験生物を試験水に曝露した期間

止水式試験：曝露期間中、試験水を交換しない試験。

半止水式試験：曝露期間中、一定期間ごとに試験水を試験容器ごと交換する試験。

EC_{50} ：試験個体の 50% に、ふ化阻害をもたらすと算定される被験物質の濃度をいう。試験時間を明記し表記する。（例：48h EC_{50} ）

EC_{10} ：試験個体の 10% に、総合影響（ふ化阻害およびふ化個体の不動をあわせた影響）をもたらすと算定される被験物質の濃度をいう。試験時間を明記し表記する。（例：48h EC_{10} ）

蓄養：入手した試験生物をそれまでの生息環境と大きく異ならない状態で飼育すること。あるいは、試験生物を試験環境と大きく異ならない状態で飼育すること。

背景異常卵：被験物質の曝露に起因しない発生異常卵のこと。初期発生段階で発生が停止する場合が多い。E1 期の卵を供試するときに混入しやすい（[附属資料 2-B E1 期の卵における背景異常卵の見分け方](#)）。

2-10. 参考文献

- Belluck, D. and A. Felsot (1981) Bioconcentration of pesticides by the egg masses of the caddisfly, *Triaenodes tardus* Milne. *Bull Environ Contam Toxicol* 26: 299–306
- 昆虫発生学入門, 安藤裕著, 東京大学出版会, pp.144
- Miyakawa, K. (1973) The embryology of the caddisfly *Stenopsyche griseipennis* MacLachlan (Trichoptera: Stenopsychidae) I. Early stages and changes in external form of embryo. *Kontyu*, 41: 413–425.
- Palmoquist, KR., Jenkins, JJ. And PC. Jepson (2008) Clutch morphology and the timing of exposure impact the susceptibility of aquatic insect eggs to esfenvalerate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1713–1720.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A useful new insecticide bioassay using first-instar larvae of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of Pesticide Science*, 34, 13–20.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains. *Journal of Pesticide Science*, 34, 21–26.
- Yokoyama, A., Hamaguchi, K., Ohtsu K., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A method for mass-rearing caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata)(Trichoptera: Hydropsychidae), as a new test organism for assessing the impact of insecticides on riverine insects. *Applied Entomology and Zoology*, 44, 195–201.
- Yokoyama A., Nagai T. and T. Horio (2012) Acute toxicity of some insecticides to eggs of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata*. *SETAC Asia Pacific 2012 Program & Abstract*, p202.
- Yokoyama A. (2019) Assessing impacts of insecticides on different embryonic stages of the nontarget aquatic insect *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 1434–1445.

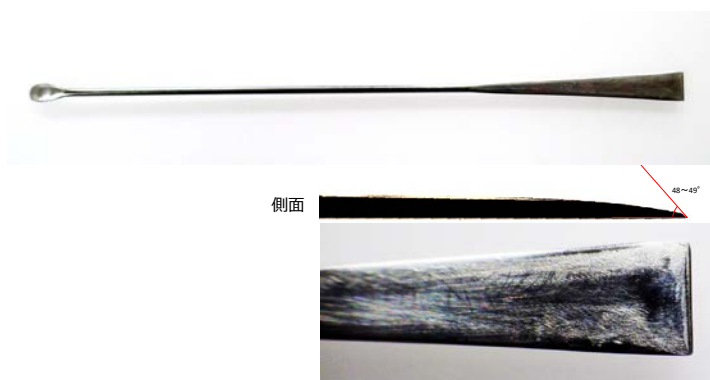
2-11. 附属資料

附属資料 2-A タングステン針と金属ヘラの作成

タングステン針は、株式会社 ESS テックの純タングステン製プローブニードル 型番 N-W-1 (胴直径 0.5 mm、全長 38 mm、先端半径/開き全角=25 μm/5 度) を利用した。購入した状態でも利用可能であるが、砥石を用いて針先を細く整える。胴直径がシャープペンの芯と同じなので、シャープペンにセットして利用すると操作性が良い。



金属ヘラは、ステンレス製ミク로스パーテルのヘラの部分を片刃になるように研磨して作成した。ミク로스パーテルのヘラの片面をミニサンダで荒削りし、最後に砥石で先端部が鋭利になるように仕上げる。農業環境変動研究センターでは、刃先の角度はおよそ 48~49° のものを用いている。ミニサンダによる荒削りで角度が決まるので注意すること。また、ヘラ先端部の左右均一に押し当てて荒削りすること。薄刃の方が卵塊を剥離させるときに卵を潰さないのが望ましいが、ステンレス製なので物理的衝撃に弱く刃先が曲がりやすいため取り扱いに注意する。刃先が曲がったときは砥石で整える。



使用した研磨道具

ミニサンダ：RYOBI 製 S-550M

ハイピッチペーパー：三共理化学株式会社、サイズ 75×110 mm、粒度 240

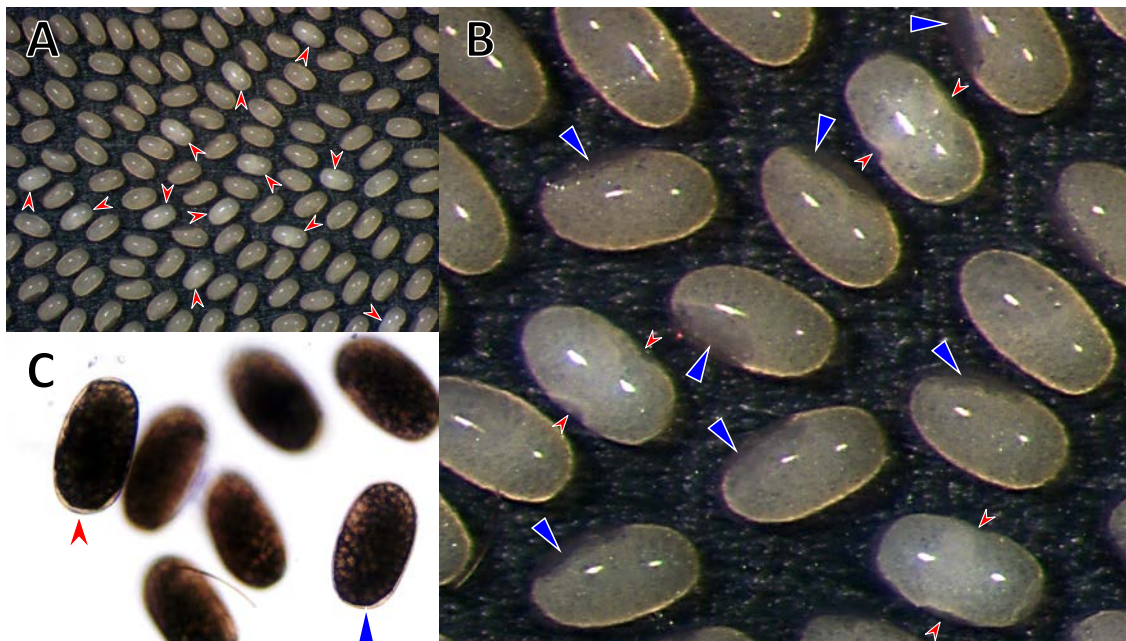
アーカンサス砥石 (medium および fine)、ホーニングオイル

附属資料 2-B E1 期の卵における背景異常卵の見分け方

供試用卵塊片を裁断する際には、予め発生異常卵を識別し、供試卵への混入を回避する必要がある。毒性試験に混入した発生異常卵は、被験物質の曝露とは無関係な背景異常卵として扱われ、試験の妥当性基準にかかわるため、発生異常卵の識別は重要な問題である。

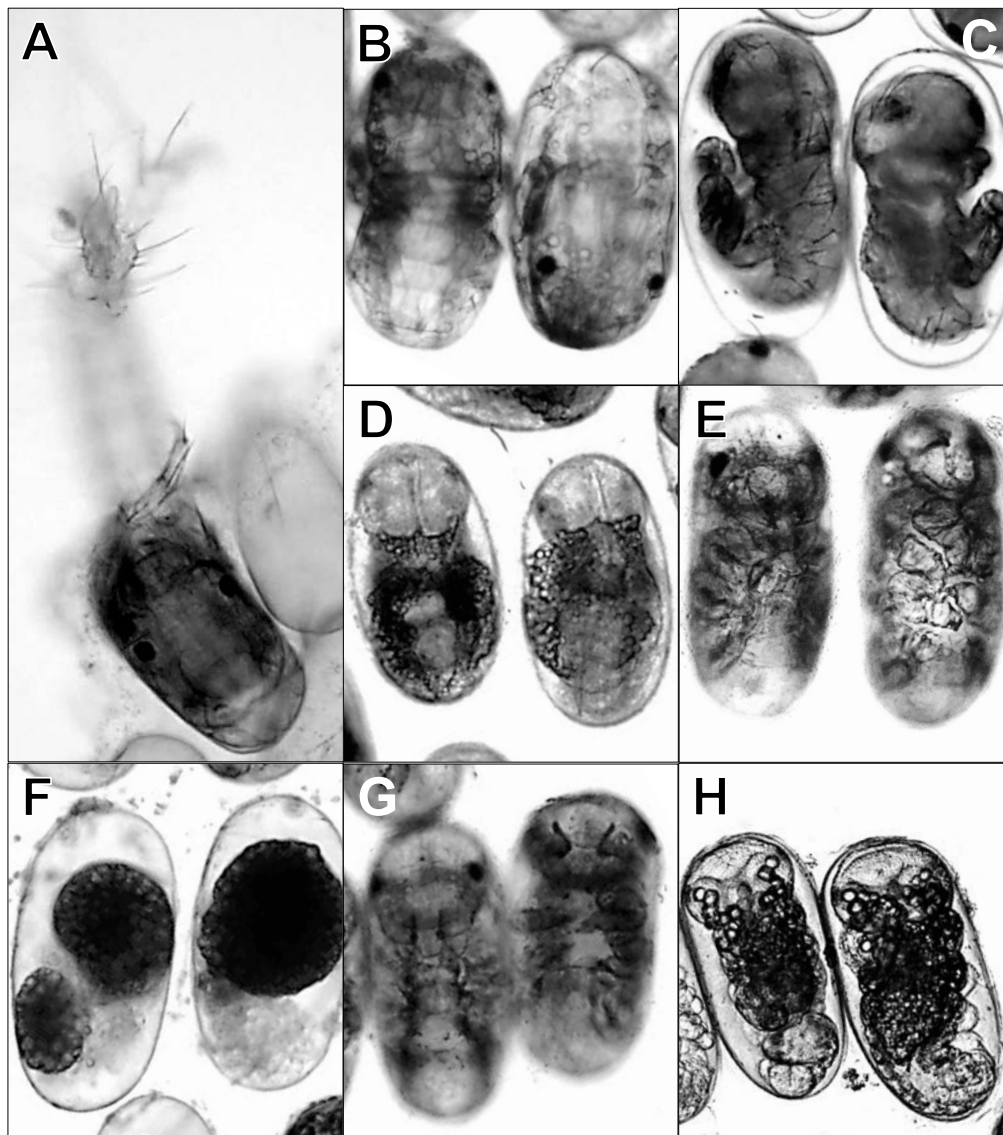
E4 期および E7 期の卵では、発生が進んでいる正常卵と発生異常卵の識別は容易である。一方、発生早期の E1 期の卵では注意深く観察する必要がある。実体顕微鏡で E1 期の卵塊を観察すると、色調の違う卵が混在していることがある（写真 A）。写真 A の▶が発生異常卵である。さらに拡大すると、正常卵は胚体（▲）の形成が進んでいるが、発生異常卵では胚体が見られず、卵殻と卵黄の境界がでこぼこしている（▶）（写真 B）。この特徴は光学顕微鏡による観察でも捉えられる（写真 C）。卵殻と卵黄の境界は、発生異常卵（▶）ではでこぼこしているが、正常卵（▲）では滑らかである。

E1 期の卵で試験する場合は、上記の特徴を注意深く観察し、可能な限り供試卵に発生異常卵が混入しないように努める。



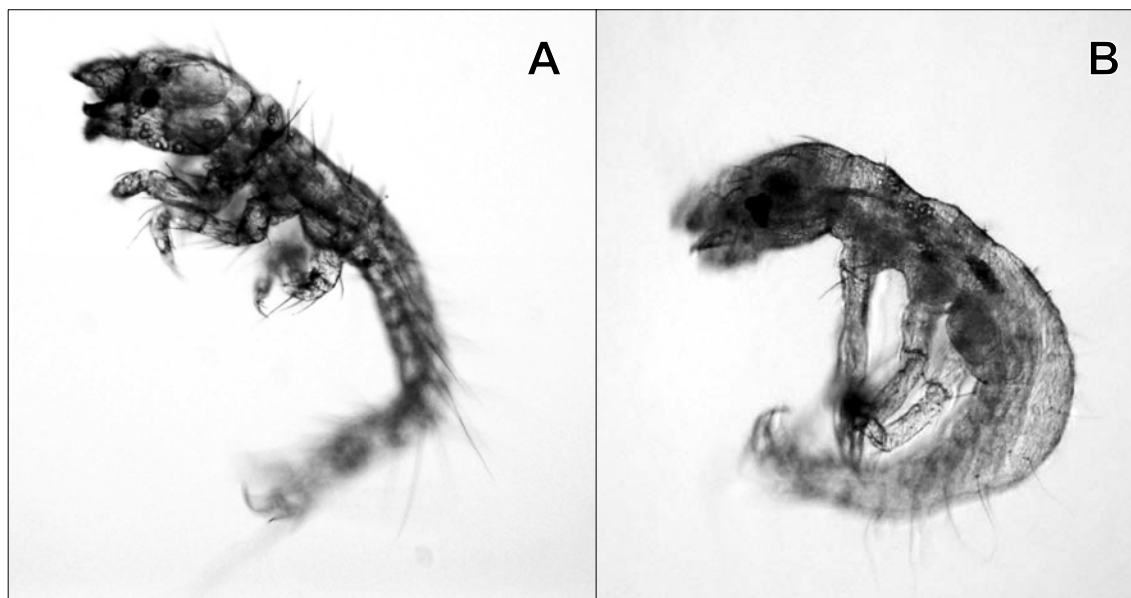
E1 期卵塊の実体顕微鏡写真（A, B）および光学顕微鏡写真（C）

附属資料 2-C ふ化阻害卵と発生異常の事例



- A: ふ化失敗の例 (卵殻から抜け出せない) (E1 期試験, エトフェンプロックス 0.9 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- B: ふ化直前まで発生は進んだが, ふ化が阻害された例. 卵殻内における頭部の位置が異常 (E4 期試験, エトフェンプロックス 8.1 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- C: ふ化直前まで発生は進んだがふ化が阻害され, その後胚体は萎縮した (E7 期試験, エトフェンプロックス 24.3 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- D: 背側より撮影. 胚運動である姿勢転換および付属肢 (大顎, 脚等) 形成に重篤な異常が観察された. 卵黄が胚に取り込まれていないことから背閉鎖が不完全であると推測される. 明らかにふ化はできない (E1 期試験, スピロメシフェン 160 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- E: 腹側より撮影. 姿勢転換が不完全で付属肢 (大顎, 脚等) 形成に重篤な異常が観察された. 明らかにふ化できない (E1 期試験, ピリプロキシフェン 23.4 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- F: 発生早期の異常の例. 明らかにふ化しない (E1 期試験, ピリプロキシフェン 100 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- G: 腹側より撮影. 姿勢転換が不完全で付属肢 (大顎, 脚等) 形成に重篤な異常が観察された. 明らかにふ化できない (E4 期試験, ピリプロキシフェン 0.5 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .
- H: 背側より撮影. 姿勢転換および付属肢 (大顎, 脚等) 形成に重篤な異常が観察された. 明らかにふ化できない (E4 期試験, ピリプロキシフェン 0.84 $\mu\text{g/L}$ 曝露) .

附属資料 2-D ふ化個体の異常症状の事例



- A : E4 期試験 (クロラントラニリプロール 244 $\mu\text{g/L}$ 曝露) . 脚が正常の機能しておらず, 水流刺激に対して開脚反応を示すことができない.
- B : E3 期試験 (スピロメシフェン 80 $\mu\text{g/L}$, 6 日間曝露) . ふ化後間もなくして死亡した個体.

附属資料 2-E 試験スケジュール

曝露期間 48 時間, E1, E4, E7 期の卵を用いた毒性試験の例

		馴 化							曝 露		蓄 養															
試験日数		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	14	15	16	
産卵からの日数	E7期	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17							
	E4期				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
	E1期							0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
内 容		<ul style="list-style-type: none"> ・供試用卵塊の入手・裁断 ・発生段階の確認 							<ul style="list-style-type: none"> ・試験水の測定 		<ul style="list-style-type: none"> <毎日> ・蓄養水の水温測定、交換 ・発生段階の確認 								<ul style="list-style-type: none"> <蓄養の終了時> ・ふ化阻害卵数の記録 ・その他異常症状の記録 							
											<ul style="list-style-type: none"> <前ふ化期から毎日> (産卵から約9日後~) ・新規ふ化個体の確認、不動個体の記録 その他異常症状の記録 								 							

曝露のタイミング、曝露期間は、試験の目的により自由に設定できる。一例として、E5 期卵で 2 日間曝露、E3 期卵で 4 日間曝露、E1 期卵で 8 日間曝露の毒性試験スケジュール例を下表に示す。

		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	14	15	16	
産卵からの日数	E5期			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
	E3期					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			
	E1期							0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
内 容		<p>馴化期間</p> <ul style="list-style-type: none"> ・供試用卵塊の入手・裁断 ・発生段階の確認 							<p>曝露</p> <p>2~8 日間</p> <ul style="list-style-type: none"> ・試験水の測定 		<p>蓄養期間</p> <ul style="list-style-type: none"> <毎日> ・蓄養水の水温測定、交換 ・発生段階の確認 								<ul style="list-style-type: none"> <蓄養の終了時> ・ふ化阻害卵数の記録 ・その他異常症状の記録 							
											<ul style="list-style-type: none"> <前ふ化期から毎日> (産卵から約9日後~) ・新規ふ化個体の確認、不動個体の記録 その他異常症状の記録 								 							

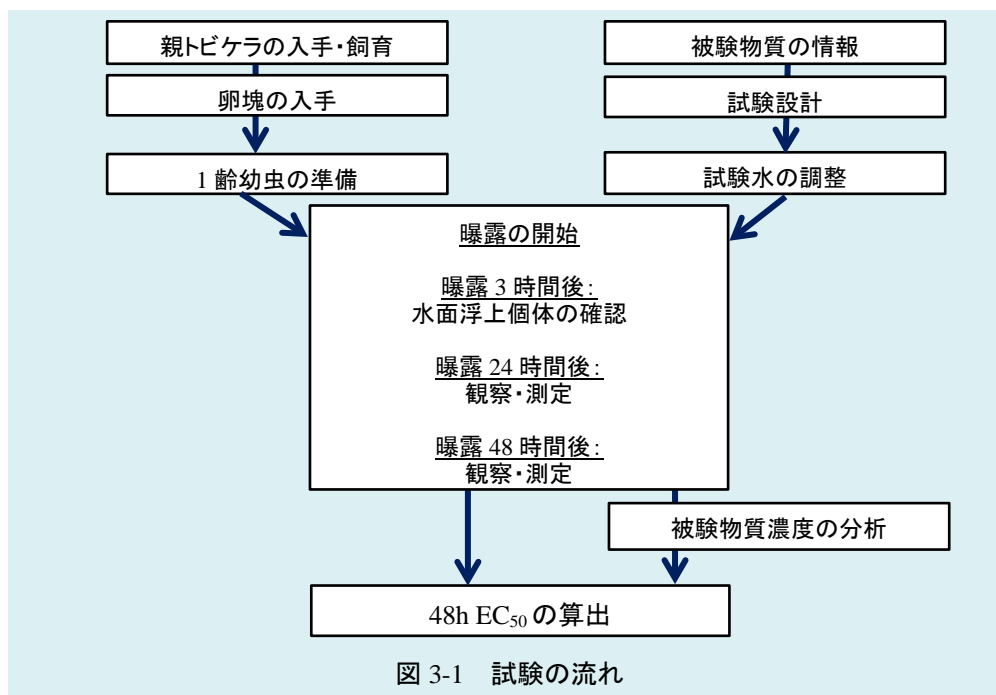
第3章 1 齢幼虫を用いた 急性毒性試験法

コガタシマトビケラ 1 齢幼虫に対する農薬の影響を評価する試験法である。本マニュアルは、2008 年に独立行政法人農業環境技術研究所（当時）が公開した「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」を改訂したものである。

水生昆虫の 1 齢幼虫期はその生活史において化学物質に対する感受性が高い傾向にある。本試験法は、水生無脊椎動物に対する農薬の生態リスク評価において、化学物質に影響を受けやすいと考えられる成長段階の貴重な毒性データを提供すると期待される。

3-1. 試験概要

ふ化 24 時間以内の 1 齢幼虫を、数段階の濃度の被験物質に 48 時間曝露する。曝露 24 時間および 48 時間後に試験個体の不動数を観察・記録し、48 時間曝露における半数影響濃度（EC₅₀）を算出する（図 3-1）。



3-2. 被験物質

試験設計に必要となる被験物質の情報（水溶解度、オクタノール-水分配係数、水中安定性、純度等）や、試験水中の被験物質濃度の測定法および回収率・定量限界等の情報を収集・整備しておく。これらの情報を基に、試験水の調製法や試験容器等の試験設計を検討する。

3-3. 基準物質

基準物質を用いた試験を実施し、試験系・試験条件の妥当性を確認することが望ましい。基準物質としては、本試験法のリングテストに用いられた塩化カリウムが推奨される。また、コガタシマトビケラ 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験結果が文献等で公開されている場合は、その被験物質を基準物質として用いても良い（例えば、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用をもつ有機リン系殺虫剤フェニトロチオンなど）。

3-4. 試験の妥当性

試験の妥当性基準は以下の通り

- 曝露期間中において対照区の不動率は 10 % を超えてはならない。
- 曝露期間中において対照区の水面浮上率（[3-9. 用語の定義](#)）が 10 % を超えてはならない。
- 溶存酸素濃度は曝露期間中、飽和濃度の 60 % 以上でなければならない。

3-5. 試験方法

（1）主な使用機器・器具類

試験容器には、ガラス製もしくは化学的に不活性な素材の容器を用いる。試験個体の体サイズが小さく、実体顕微鏡等を用いた観察の都合上、試験容器のサイズが制限される。試験容器のサイズが小さい場合、同一容器に複数個体を入れると共食いする可能性があるため、1 個体／容器の個体密度が望ましい。試験観察の際に実体顕微鏡を使用するため、上面から観察しやすいポリスチレン製 48 穴マルチディッシュ（平底ウェル）や、ガラス製バイアルが試験容器として推奨されるが（[図 3-2](#)、[附属資料 3-A 各試験容器の水面浮上率と底面連続光照射の効果](#)）、容器の材質は被験物質の物性に基づき選定する。一般的に、オクタノール-水分配係数の高い被験物質の毒性試験ではガラス製試験容器が望ましい。

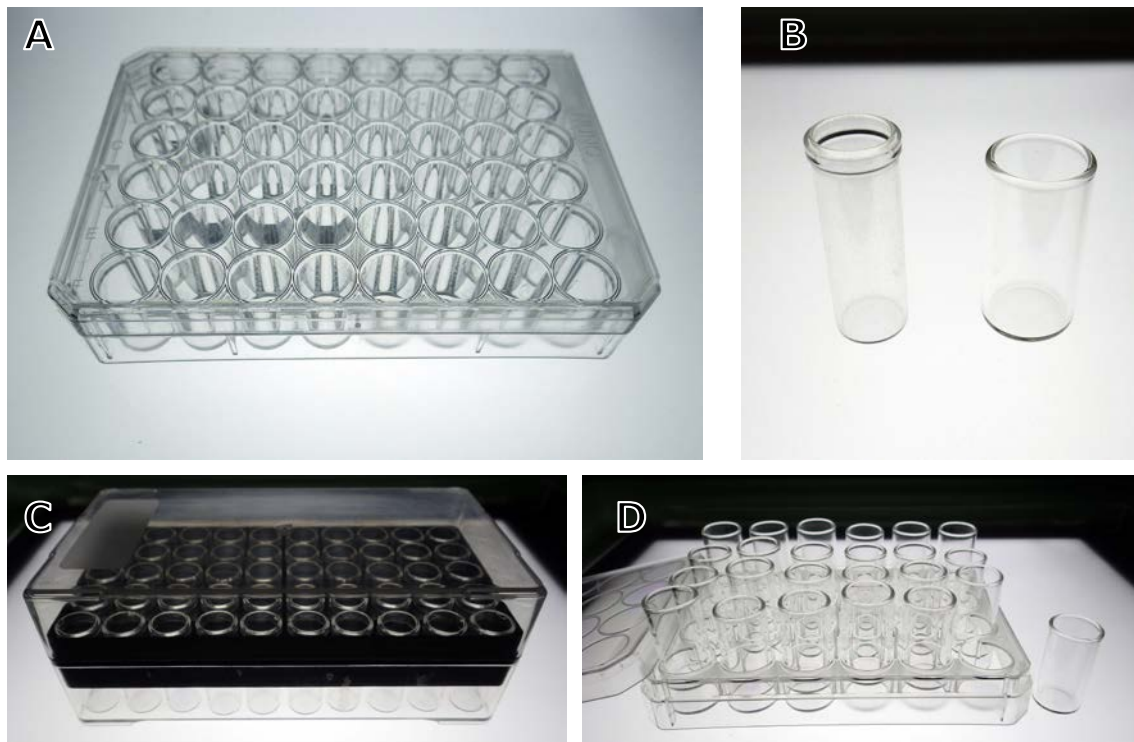


図 3-2 試験容器の例

- A : ポリスチレン製 48 穴マルチディッシュ（平底ウェル）. 取り扱いが簡便な試験容器.
 B : サンプル管瓶（左, H35 mm×外径 φ13 mm）とガラスカップ（右, H30 mm×外径 φ16 mm）.
 C : ラックに収容したサンプル管瓶での試験. 高さがあるので水面浮上個体が発生しにくい。
 D : 24 穴マルチディッシュに収容したガラスカップでの試験. 径が大きいため観察しやすい。

([附属資料 3-A 参照](#))

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。ガラス製器具類については、使用前に適切な方法で洗浄しておく。

<試験水の調製用>

- 残留塩素計： OYWT-31（株式会社オーヤラックス）
 天 秤： AG245（メトラー・トレド株式会社）
 ダイリューター： MICROLAB[®] 500 SERIES（Hamilton）
 マイクロピペット： Eppendorf Research Plus (100)
 ディスペンサー： Eppendorf Multipette Plus
 スターラー： MAGNETIC STIRRER REMIX RS-6D（アズワン株式会社）
 試験水調製用容器： ガラス製ビーカー

<曝露試験用>

卵塊蓄養用容器：	ポリスチレン製6穴マルチディッシュ (Nunc、平底ウェル)、 ガラス製結晶皿 (直径 12 cm)
曝露試験容器：	ポリスチレン製48穴マルチディッシュ (Nunc、平底ウェル) ガラスバイアル (ラボランサンプル管瓶、H 35 mm×外径 φ 13 mm) ガラスカップ (マルエム GC-16、H 30 mm×外径 φ 16 mm)
温度計：	Thermo Recorder RTR-52 (株式会社ティアンドデイ)
pH計：	LAQUA twin (株式会社堀場製作所)
溶存酸素計：	NeoFox (OceanOptics 社)
温度制御装置：	試験温度を一定に維持できる恒温室、インキュベーター等の装置
実体顕微鏡：	MZ75 (ライカマイクロシステムズ株式会社)
光学顕微鏡：	DMIRB (ライカマイクロシステムズ株式会社)
照明：	トレビュアーA4-500 (株式会社トライテック)

(2) 供試生物

■ 生物種

- ▶ コガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) を用いる。
- ▶ 供試生物は経歴 (入手源、飼育方法等) の明らかなものを用いる。農業環境変動研究センターでは、2004年より室内飼育システムを維持しており、卵塊の配布を行っている。
- ▶ 基準物質での半数影響濃度を確認することが望ましい。

■ 親トビケラの飼育

試験個体を得るための親トビケラの入手・飼育については、[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

■ 生育段階

ふ化24時間以内の1齢幼虫を用いる。

ふ化直後のコガタシマトビケラ1齢幼虫は胸部から頭部にかけて貯蔵物質である油滴を有しており、給餌しなくても48時間の絶食に耐えられる (図3-3)。また、20℃の温度環境下では2齢幼虫まで成長するのに約10日間かかる。したがって、48時間の急性毒性試験中に試験個体が脱皮することはない。

■ 性質

ふ化直後の1齢幼虫は遊泳・歩行運動し水面へ浮上・捕捉されることが多い。水面への浮上を防止するため、1齢幼虫の正の走光性を利用してふ化前日の卵塊の蓄養～試験個体の投入までの一連の操作において、容器底面から白色蛍光灯もしくは白色LEDによる連続光(2000～3000 lux)

を照射し、1 齢幼虫を容器底面へ誘引する（[附属資料 3-A 各試験容器の水面浮上率と底面連続光照射の効果](#)）。



図 3-3 1 齢幼虫の写真（胸部から頭部に見られる顆粒は油滴）バーは 200 μm

■ 試験個体の準備

コガタシマトビケラ卵のふ化所要日数は、20°Cの温度条件下で約 10 日間である¹（図 3-4）。約 10°C～25°Cの間では温度依存的に発生が速くなる。また、溶存酸素の供給が滞る場合は発生が遅くなる。逆に、産卵用基質から卵塊を剥離させて蓄養すると酸素供給効率が高まるためか、発生が速くなる。

供試予定の卵塊は産卵用基質から剥離させ、ポリスチレン製 6 穴マルチディッシュ（希积水 10 mL/ウェル）に入れ、試験と同じ条件（希积水・温度・光）で試験開始まで蓄養する。可能ならば、ロータリーシェーカー上で蓄養する。実体顕微鏡で卵塊を腹側から毎日観察する。大顎が呈色した状態の E9 期（前ふ化期～ふ化期。図 3- 5B および 5C。）に達したら、400 mL の希積水を満たしたガラス製結晶皿（直径 12 cm）に卵塊を移し、容器底面から連続光を照射しながら静置・蓄養させる（図 3- 6）。なお、刺毛が顕在化した状態ならば（図 3- 5C）、卵塊は一晩でふ化がほぼ完了する。また、剥離させた卵塊を腹側より光学顕微鏡（明視野）で観察したときに、咽頭搏動が確認された場合も 24 時間以内にふ化する（[附属資料 3-B 咽頭搏動とふ化のタイミング](#)）。

翌日、ふ化 24 時間以内の 1 齢幼虫の中から、自発的運動（遊泳・歩行）をしている個体を試験個体とする（[附属資料 3-C 試験個体の準備](#)）。試験個体の取り扱いには先端外径 2～3 mm 程度のガラスピペットを用い、気泡による幼虫の水面への浮上を防止するため、操作中は幼虫が空気に触れないように留意する。

¹ 農業環境変動研究センターの室内飼育では、毎日 1 回午前中に産卵された卵塊を回収しており、前日回収直後から当日回収直前までに産卵された卵塊は同一の産卵日として扱われる。したがって、同一産卵日であっても、ふ化所要日数は卵塊間で 1 日程度の差が生じる可能性がある。

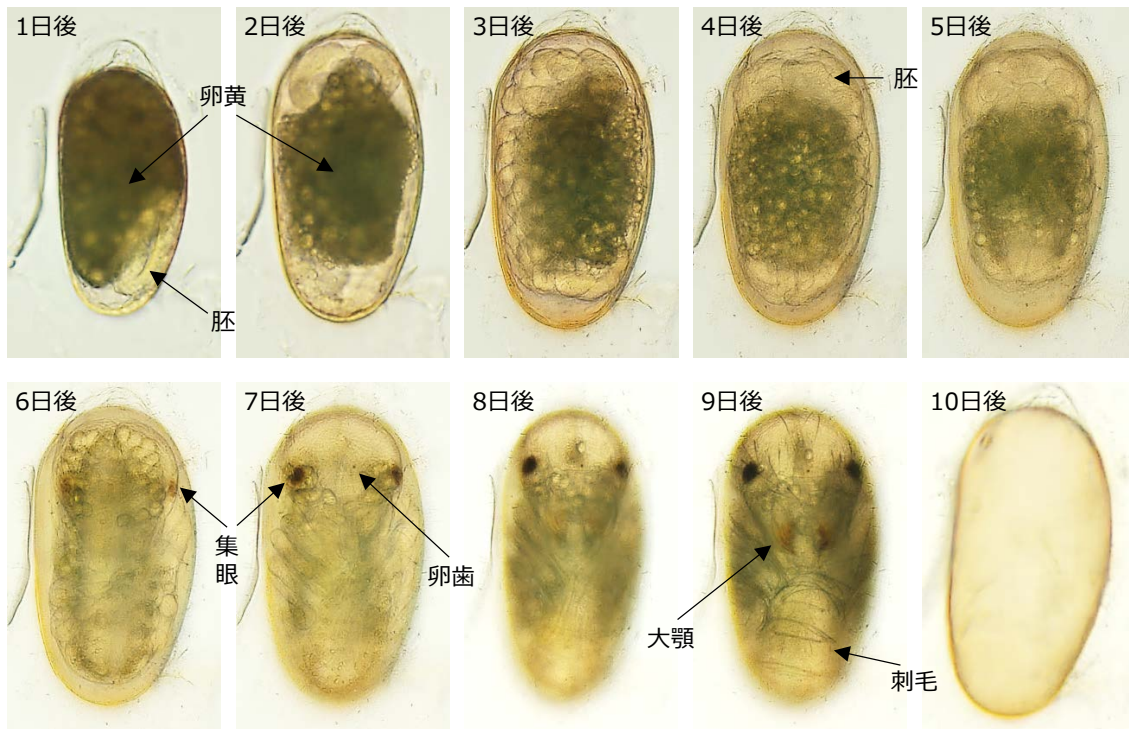
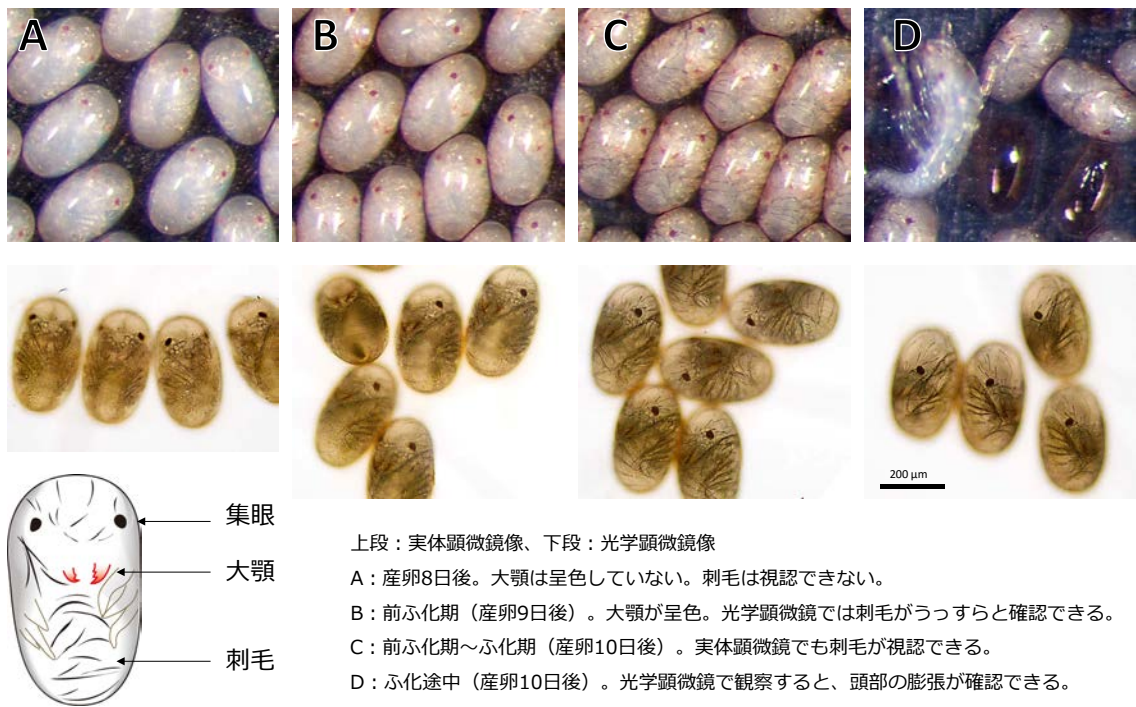


図 3-4 卵(腹側)の顕微鏡写真(20°Cで蓄養)



上段：実体顕微鏡像、下段：光学顕微鏡像

A：産卵8日後。大顎は呈色していない。刺毛は視認できない。

B：前ふ化期（産卵9日後）。大顎が呈色。光学顕微鏡では刺毛がうっすらと確認できる。

C：前ふ化期～ふ化期（産卵10日後）。実体顕微鏡でも刺毛が視認できる。

D：ふ化途中（産卵10日後）。光学顕微鏡で観察すると、頭部の膨張が確認できる。

図 3-5 発生後期の卵の状態(腹側)



図 3-6 供試用卵塊の蓄養

試験前日(写真左), 試験当日(同中, ふ化が始まっている), ふ化個体(同右).

(3) 曝露方法

止水式または半止水式により曝露試験を行う。

(4) 曝露期間

48 時間とする。

(5) 試験生物数および試験区の設定

■ 試験生物数

試験区ごとに少なくとも 20 個体の 1 齢幼虫を使用する。

■ 試験区の設定

➤ 試験濃度区の設定

- ・ 等比級数的に少なくとも 5 濃度区を設ける。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。ただし、被験物質の性状により広い濃度範囲で影響が認められる場合はもっと大きな公比でも良い。
- ・ 試験濃度および濃度公比は、予備試験の結果を参考にして決定する。
- ・ 濃度範囲には、試験個体のすべてに影響が見られる濃度と全く影響が見られない濃度が少なくともそれぞれ 1 濃度、一部に影響が見られる濃度が少なくとも 2 濃度含まれることが望ましい。

- ・試験濃度の上限は 100 mg/L とする。ただし、被験物質の性状によりこれらの濃度の試験が困難な場合は技術的に可能な濃度を上限とする。上限濃度で被験物質の毒性によると考えられる影響がみられた場合は、これらの上限濃度以上の濃度区を設定し可能な限り EC₅₀ 値を求めることが望ましい。
- 対照区の設定
 - ・被験物質を含まない無処理対照区を設ける。
 - ・試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区も設ける。

(6) 試験水の調製

試験水の調製方法は以下のとおりとする。なお、試験水および試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

- 易水溶性農薬の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験水又は試験原液を調製する。
- 難水溶性農薬の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験水または試験原液を調製するか、有機溶剤を助剤として用いて試験原液を調製する。助剤は供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ被験物質の性質を変えないものを用いる（[附属資料 3-D 各種助剤の 1 齢幼虫に対する急性毒性](#)）。
- 助剤の試験水中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100 mg/L（又は 0.1 mL/L）を超えないことが望ましい。

(7) 曝露の開始と試験条件

試験操作の流れを図 3-7 に示す。調製した試験水を試験容器にディスペンサーを用い分注する（図 3-8）。また、一時プール用に 50 mL ガラス製ビーカーにも試験水を分注しておく。ガラスピペットを用いて自発的運動（遊泳や歩行）をしている 1 齢幼虫を無作為に選び出し、少量の希釈水とともに一時プール用ビーカーに滴下して沈め、試験水になじませたのち、直ちに試験容器に移し曝露を開始する。試験個体の水面への浮上を抑制するために、一連の操作は、容器底面から白色蛍光灯もしくは白色 LED による連続光を照射しながら行う。試験個体を扱うピペッティングの際には、試験個体を空気に触れさせないように注意する。

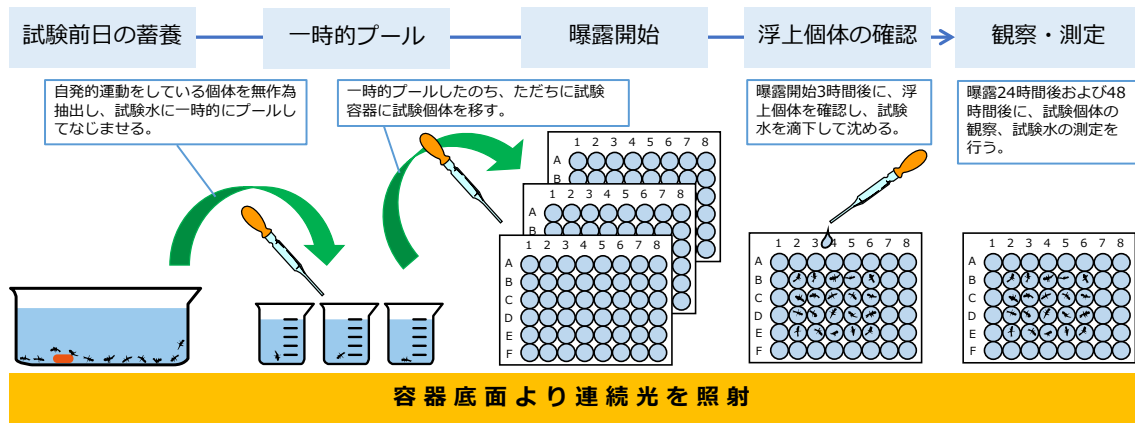


図 3-7 操作の流れ

曝露の環境条件は以下の通りである。

■ 試験水量

1 個体あたり 1.5 mL 以上とする。水深が深いほど水面への浮上個体の発生頻度は低くなる。

■ 試験個体密度

1 ウェル（もしくは 1 パイアル）あたり 1 個体とする。

■ 水温

設定濃度は 20℃ とし、曝露期間中の変動範囲は ±1℃ 以内とする。

■ 照明

曝露期間中、試験容器底面より連続光を照射。ただし、試験容器を光源に直置きせず、光源から熱が伝導しないように隙間をあけること（図 3-9）。

■ 給餌

曝露期間中は給餌を行わない。

■ 希釈水

- 脱塩素水道水を用いる。
- 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まない水質であること。
- 使用前には十分に曝気するとともに、温度調整を行う。

■ 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、曝露期間を通して試験温度での飽和濃度の 60% 以上を保つようにする。

■ pH

試験水の pH 調整は行わない。

■ 給気

曝露期間中は、試験水に給気しない。

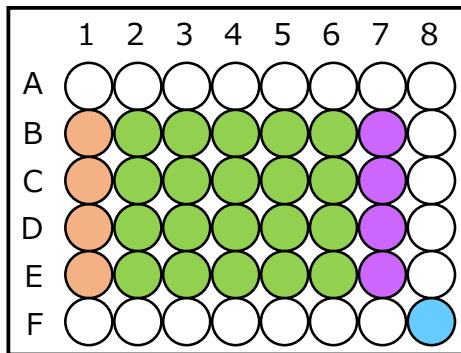


図 3-8 試験容器における試験個体の配置例

- : 試験個体投入ウェル.
- : ピペット洗浄用ウェル (試験個体は投入しない).
- : 溶存酸素濃度測定用ウェル (試験個体を投入する).
- * ● ● ● のウェルには試験水を分注する.
- : 水温測定用ウェル (希釈水を分注).

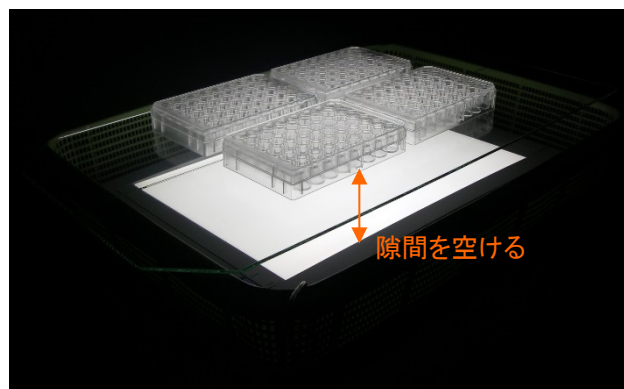


図 3-9 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験風景

試験容器を光源に直置きせず，光源から熱が伝導しないように隙間をあける。

(8) 観察と測定

■ 浮上個体の確認

曝露開始 3 時間後に、48 穴マルチディッシュを目視で観察し、水面に浮上したと見られる試験個体を、ガラスピペットで試験水を滴下して沈める。

■ 供試生物の一般状態の観察

曝露開始 24 時間後および 48 時間後における不動個体の有無について、実体顕微鏡で観察し記録する（総合倍率～10 倍程度）。明視野観察の方が判定しやすい。不動個体の判定は以下の通り。自発的運動により移動する個体（体をくねらせて遊泳もしくはウェル底面・壁面を歩行している個体）は正常とする。丸まっているもしくは弛緩している個体については、ガラスピペットを用いて試験水を攪拌して水流刺激を与え、屈伸開脚反応（刺激に対し体を伸ばしたり丸めたりする反応。体を伸ばす際は同時に脚をひろげる）を示した個体を正常と判定する（図 3-10 および[附属資料 3-E 試験個体の状態と不動の判定例](#)）。水流刺激に対し、屈伸開脚反応を示さない個体および屈伸するが開脚できない個体は不動個体と判定する。水面に浮上している個体は試験水を滴下して沈めてから判定を行う。その他、行動や外見に異常が確認された場合は記録する（[附属資料 3-F 農薬に 48 時間曝露したときの試験個体の症状例](#)）。

水流刺激を与える際は、激しいピペッティングは行わない。ピペッティングが激しいと、試験水の飛沫とともに、試験個体が跳ね上げられて水面より上の壁面に付着する、試験容器から飛び出す等により、試験個体が失われる可能性がある。

■ 被験物質濃度の測定

- ▶ 農薬を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質濃度を少なくとも、曝露開始時、曝露終了時、換水前および換水後に測定する。各ウェル（もしくは各バイアル）から試験水を等量採取・混合した試料を分析試料とする。
- ▶ 被験物質濃度は、曝露期間中、設定濃度の 80 % 以上であることが望ましい²。

■ 環境条件の測定

- ▶ 試験に先立って希積水の水質を確認する。
- ▶ 各試験区における試験水の水温、溶存酸素濃度および pH を曝露開始時、曝露終了時、24 時間毎に測定する。半止水式試験の場合は換水前および換水後も測定する。また、曝露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

² 本急性毒性試験法は、曝露期間中試験容器底面より連続光を照射している。水中光分解性が高いネオニコチノイド系殺虫剤の一部の剤については、本試験条件下で曝露期間中の水中安定性が確認されている（[附属資料 3-G 試験期間中の連続光照射と被験物質の安定性に関する事例](#)）。

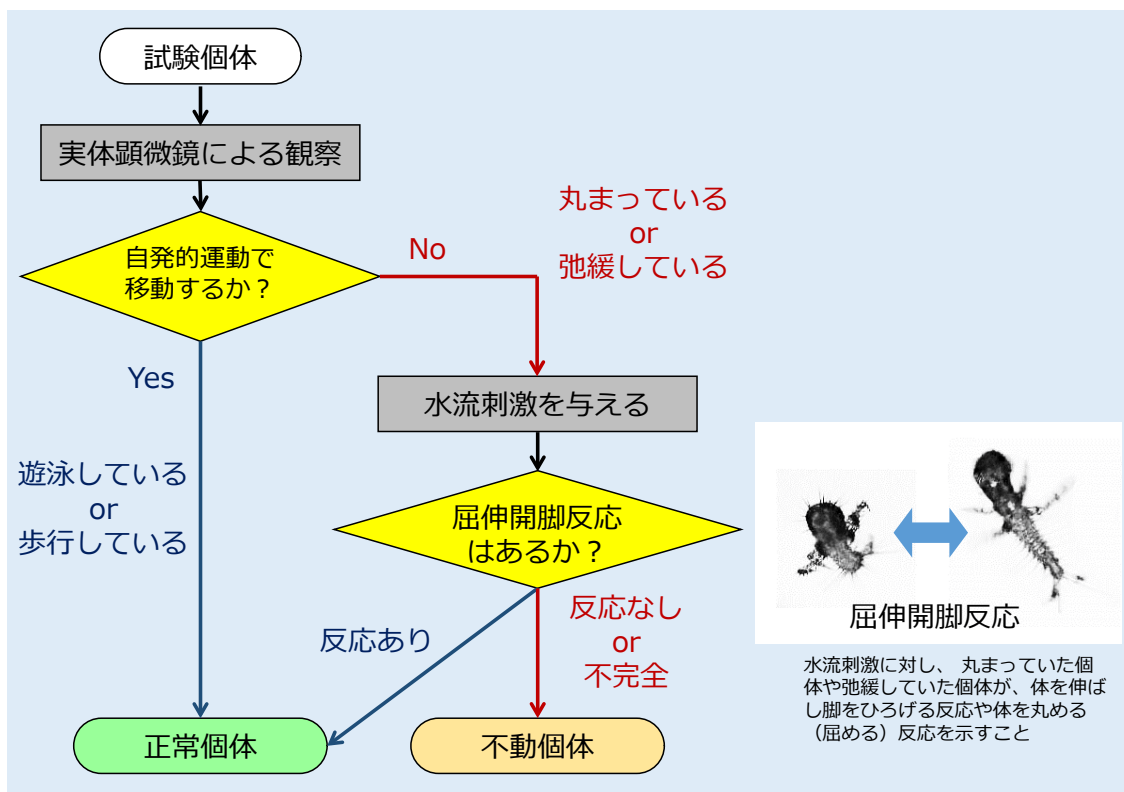


図 3-10 不動個体（影響個体）の判定フローチャート

3-6. 限度試験

3-5. 試験方法を用いて、被験物質のおおよその毒性を調べるために、被験物質濃度 100 mg/L もしくは被験物質の水溶解度が 100 mg/L 未満である場合はその水溶解度の濃度で限度試験を行ってもよい。限度試験には試験区・対照区ともに 20 個体の試験個体を用いる。試験終了時に試験区で不動個体が 10% を超えたときは、3-5. 試験方法による本試験を行う。

3-7. 結果の処理法

各濃度における不動率の結果から、半数影響濃度 (EC₅₀) を計算する。

EC₅₀ を算出するにあたり、Finney の図解法、対数正規確率紙上での作図法、プロビット法、ロジット法等一般に用いられているいずれの方法でも良い。可能ならばプロビット法やロジット法を用い、95% 信頼限界も算出するとともに EC₁₀ を無影響濃度として報告する。ただし、無影響濃度については、EC₁₀ の代わりに 0% 影響最高濃度を報告しても良い。

被験物質濃度の測定値が設定濃度から ±20% 以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき EC₅₀ を算出する。

3-8. 報告事項

試験報告書には次の項目について記載する。

- 1) 試験機関：名称、所在地
- 2) 試験責任者と試験担当者：氏名、所属および連絡先
- 3) 被験物質：化学物質の名称（一般名、商品名等も併記）、構造式（示性式、分子式及び分子量も併記）、入手先、製造年月日及びロット番号、純度及び不純物、水溶解度等の物性に関する資料、その他必須事項
- 4) 試験容器：製品名、材質、形状
- 5) 試験生物：
 - －種名（学名）および系統名
 - －由来（入手先）
 - －飼育方法（馴化中も含む。餌の種類と量、給餌頻度等）
 - －供試卵塊の産卵日・ふ化日・およびふ化率
- 6) 試験条件と方法：
 - －試験開始日、試験終了日および試験期間（本試験および予備試験の試験実施日も併記）
 - －試験温度
 - －希积水の入手源と水質
 - －試験水の状態（透明、白濁、沈殿等）、試験原液の保管方法および試験水への被験物質の添加法（助剤を用いた場合は、その名称・添加方法及び助剤濃度）
 - －試験容器あたり（またはウェルあたり）の試験水量および濃度区ごとの試験個体数
 - －濃度区の設定根拠および各濃度区の被験物質の濃度（設定値および実測値）
 - －光源の種類、光周期、照度
 - －試験期間中の溶存酸素濃度、pH の測定法
 - －試験結果の処理法
- 7) 試験結果：
 - －試験条件の測定値（試験温度、溶存酸素濃度、pH）
 - －被験物質濃度の分析結果
 - －各濃度区及び対照区の 24 時間後、48 時間後における水流刺激に対する不動数とその割合
 - －試験終了時の濃度－反応曲線を示す図
 - －EC₅₀ 値（可能であればそれらの 95 % 信頼限界）とその算出法
 - －可能であれば無影響濃度 (EC₁₀ 値) とその算出法 (代替として 0% 影響最高濃度でも良い)
 - －試験水の外観
 - －その他の観察された影響およびそれらが認められた濃度

3-9. 用語の定義

- 限度試験：適切な濃度において毒性の有無を調べる試験。
- 予備試験：本試験実施に先立ち、試験条件・試験方法・試験濃度範囲を決定するために行う試験。
- 本試験：予備試験で得られた情報を基に、最終的な急性毒性値を求めるために行う試験。
- 試験水：試験生物を曝露するために用いる被験物質を含んだ水。
- 希釈水：試験水の調製に用いる被験物質を含まない水。
- 試験原液：試験水の調製に用いる被験物質を含む溶液。
- 被験物質：毒性試験に用いる農薬。
- 有効成分：農薬としての薬効を発揮するための主たる成分。
- 濃度：この試験では、添加濃度、実測濃度、設定濃度等の区別を明確にし、それを表示する。
- 濃度の単位：化学物質の濃度は重量/容量（ $\mu\text{g/L}$ あるいは mg/L ）で表記する。
- 助剤：試験水を調製するために用いる有機溶剤
- 曝露期間： EC_{50} 値を求めるために試験生物を試験水に曝露した期間
- 止水式試験：曝露期間中、試験水を交換しない試験。
- 半止水式試験：曝露期間中、一定期間ごとに試験水を試験容器ごと交換する試験。
- EC_{50} ：試験個体の 50% に、水流刺激に対する屈伸開脚反応の阻害（不動）をもたらすと算定される被験物質の濃度をいう。試験時間を明記し表記する。（例：48h EC_{50} ）
- 蓄養：入手した試験生物をそれまでの生息環境と大きく異ならない状態で飼育すること。あるいは、試験生物を試験環境と大きく異ならない状態で飼育すること。
- 水面浮上率：水面に浮上している個体であって、水面直下に張り付く状態の個体を水面にトラップされたと見なし、浮上個体と判定する。水面直下で丸まっている状態もしくはぶら下がったような状態の個体は自力で水底に復帰することがあるため、水面浮上個体とはみなさない（図 3-11 および [附属資料 3-H 水面浮上個体と水面直下で丸まっている個体](#)）。各試験区の試験個体数に占める浮上個体の割合を水面浮上率という。



図 3-11 水面浮上個体のイメージ図

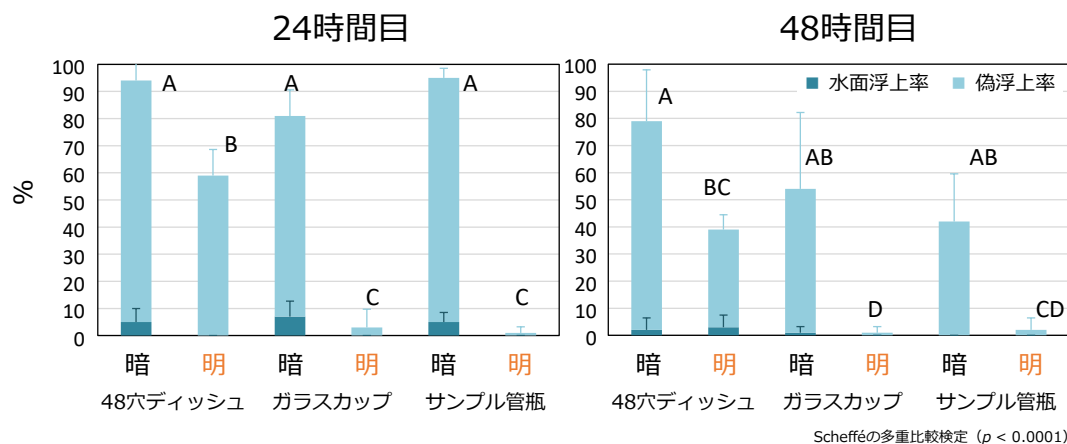
3-10. 参考文献

- Iwafune, T., Yokoyama, A., Nagai, T. and T. Horio (2011) Evaluation of the risk of mixtures of paddy insecticides and their transformation products to aquatic organisms in the Sakura River, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 1834–1842.
- Miyakawa, K. (1973) The embryology of the caddisfly *Stenopsyche griseipennis* MacLachlan (Trichoptera: Stenopsychidae) I. Early stages and changes in external form of embryo. *Kontyu*, 41: 413–425.
- Stuijzand, SC., Poort, L., Greve, GD., van der Geest, HG. And HS. Kraak (2000) Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: Taxon, development stage, and exposure time. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 582–587.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A useful new insecticide bioassay using first-instar larvae of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of Pesticide Science*, 34, 13–20.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains. *Journal of Pesticide Science*, 34, 21–26.
- Yokoyama, A., Hamaguchi, K., Ohtsu K., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A method for mass-rearing caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata)(Trichoptera: Hydropsychidae), as a new test organism for assessing the impact of insecticides on riverine insects. *Applied Entomology and Zoology*, 44, 195–201.

3-11. 附属資料

附属資料 3-A 各試験容器の水面浮上率と底面連続光照射の効果

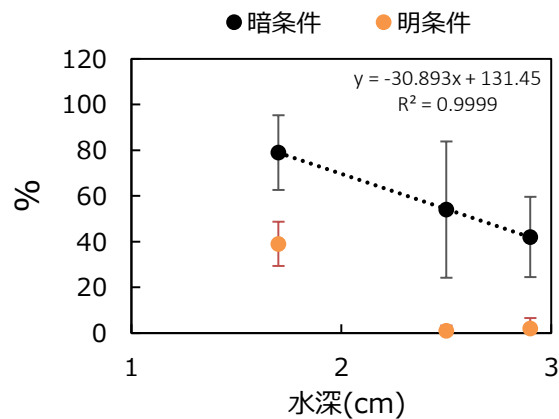
希釈水を分注したポリスチレン製48穴マルチディッシュ(1.5 mL/ウェル)、ガラスカップ(3.5 mL/カップ)およびサンプル管瓶(2.5 mL/瓶)(図3-2)を試験容器として使用し、ふ化24時間以内の1齢幼虫を各条件20個体ずつ48時間蓄養した。光条件は明条件(底面連続光照射)および暗条件とし、24時間毎に水面浮上率および水面浮上とは判定されないものの水面直下にいる個体の割合(偽浮上率)を調べた。試験は5回行い(平均不動率±標準偏差:0.33±1.27%)、各条件における水面浮上率および水面浮上率+偽浮上率の合算値について、観察時毎にSchefféの多重比較検定を行った。



各試験容器間で、水質(pHおよび溶存酸素濃度)に大きな違いは見られなかった。

水面浮上率は条件の違い(光条件や試験容器の種類)による有意差はなかった。明条件では、48穴マルチディッシュの48時間後(平均±標準偏差:3.0±4.5%)を除き、水面浮上率は0%であった。

水面浮上率+偽浮上率は、48穴マルチディッシュで他の試験容器よりも高く、光条件では暗条件の方が有意に高かった。明条件のガラスカップやサンプル管瓶では偽浮上率が明確に抑制された。これらの結果は、正の走光性により1齢幼虫が容器底面に引きつけられたためであると考えられた。



暗条件では 1 齢幼虫は上方向に自由に遊泳し、水面に達しない個体や達した個体の多くは遊泳を止めると沈降する。一部の水面に達した個体は、刺毛等の先端部が水面に捕捉され、その後、偽浮上もしくは水面浮上の状態になると推測される。

暗条件における各試験容器の水深と 48 時間目の水面浮上率+偽浮上率の合算値は負の相関を示した。回帰式から、蓄養 48 時間後の 1 齢幼虫は水深 4.3 cm 以上で偽浮上が完全に抑制されると推定された。これは、蓄養 48 時間後の 1 齢幼虫における連続遊泳の限界を示すものと考えられる。

各試験容器の特徴

試験容器	利便性	観察しやすさ	水面浮上の抑制*
48 穴マルチディッシュ	○	○	△
ガラスカップ	△	○	○
サンプル管瓶	△	△	○

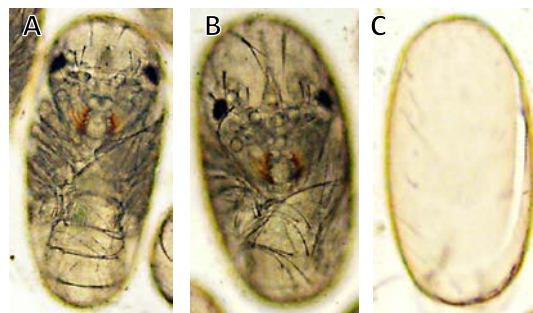
*明条件下（底面連続光照射）

各試験容器の特徴を上表にまとめた。試験における利便性（扱いやすさ、使い捨て、省スペース等）はポリスチレン製 48 穴マルチディッシュが相対的に優れているが、水面浮上の抑制という観点からは劣っている。サンプル管瓶は径が小さいため、実体顕微鏡下での上面からの観察の際に、試験個体に水流刺激を与えにくく、屈伸開脚反応を判定しづらい点がある。

使用する試験容器の選択は、被験物質の物化性等を考慮しつつ総合的に判断する。

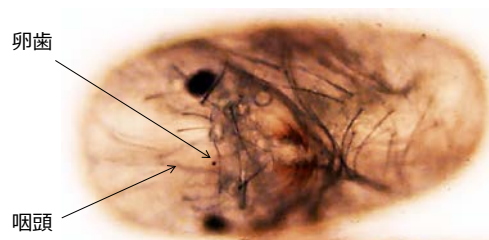
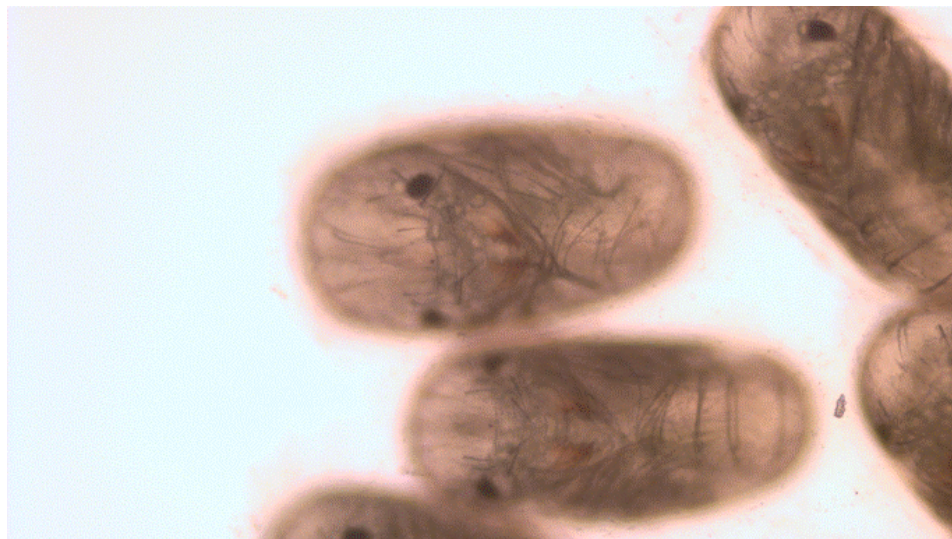
附属資料 3-B 咽頭搏動とふ化のタイミング

コガタシマトビケラ胚はふ化が近づくと、咽頭部を搏動させ水（羊水）を嚥下する。水の嚥下が進むと体圧が上昇し、頭部が膨張する（写真 B）。この時、左右の集眼の間に位置する卵歯を卵殻にこすりつけるように、筋肉を小刻みに振動させる。やがて卵殻が破れふ化が始まり、幼虫は数分で卵殻から完全に脱する（写真 C）。



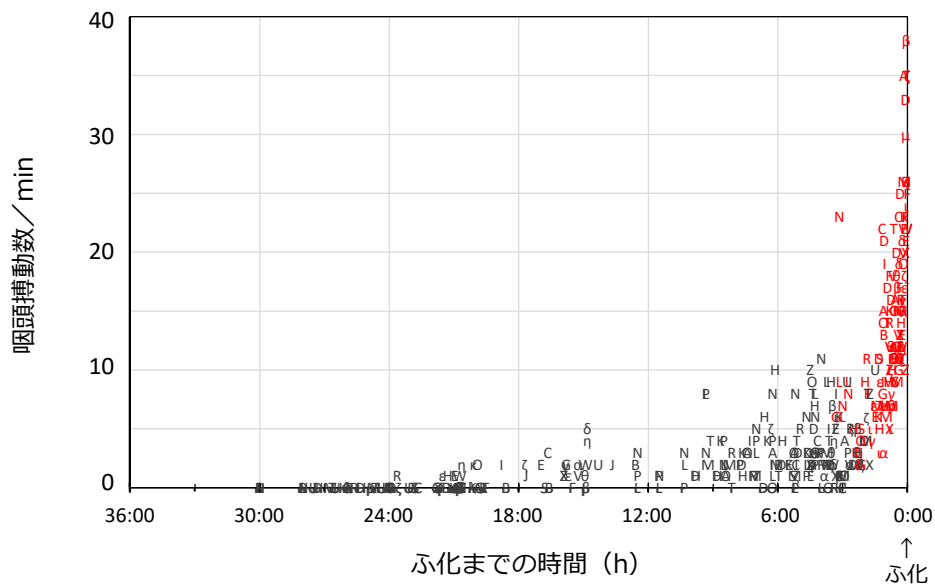
A : 頭部膨張前の E9 期卵
 B : 咽頭部の搏動により頭部が膨張した胚
 C : ふ化後の卵殻

動画 3-1 咽頭部の搏動（動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。）



ふ化のタイミングを計る指標として、咽頭部の搏動が活用できないか検討した。5 卵塊より裁断して得た計 37 卵を光学顕微鏡（明視野、総合倍率 100 倍）で観察し、ふ化するまで 1 分間当たりの咽頭搏動数を計測した。下図は、咽頭搏動数とふ化までの時間を卵別に文字でプロットしたものである。頭部膨張以降のデータは赤字で示している。

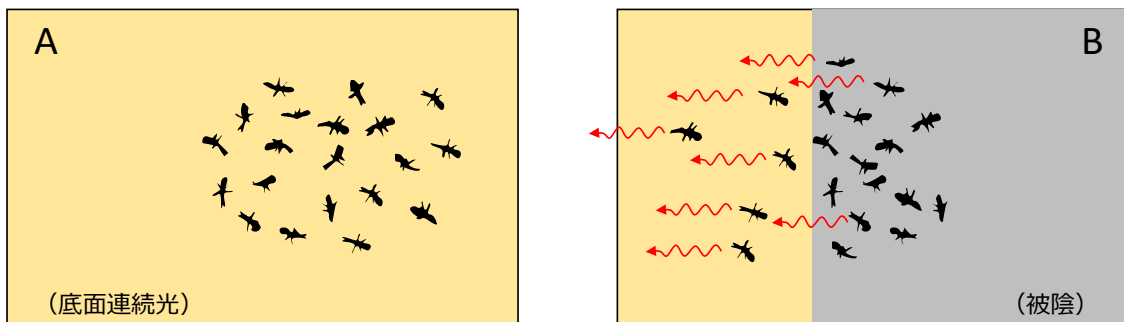
ふ化 24 時間前から咽頭部の搏動が開始され、ふ化 3 時間前には頭部膨張が確認される。ふ化 1 時間前には咽頭搏動数が 10 回以上/分となる。このように、刺毛の顕在化等の外部形態の特徴に加え、咽頭部の搏動でもふ化のおおよそのタイミングを知ることができる。



附属資料 3-C 試験個体の準備

試験個体には、ふ化 24 時間以内の自発的運動（遊泳・歩行）をしている個体を用いる。自発的運動の確認には、1 齢幼虫の正の走光性を利用すると効率的に行うことができる。

下図 A は、前日から E9 期の卵塊を底面連続光照射・静置して蓄養し、ふ化させた 1 齢幼虫の様子を示した模式図である。基本的には、1 齢幼虫は容器底面に付着しており活発に遊泳することは稀である。そこで、下図 B のように底面連続光を一部被陰すると、1 齢幼虫は明るい側へ遊泳・歩行しはじめる（赤波線）ので、ガラスピペットを用いてこれらの自発的運動個体を試験個体として選び出す。



動画 3-2 遊泳・歩行する 1 齢幼虫 (8 倍速)



(動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。)

附属資料 3-D 各種助剤の1 齢幼虫に対する急性毒性

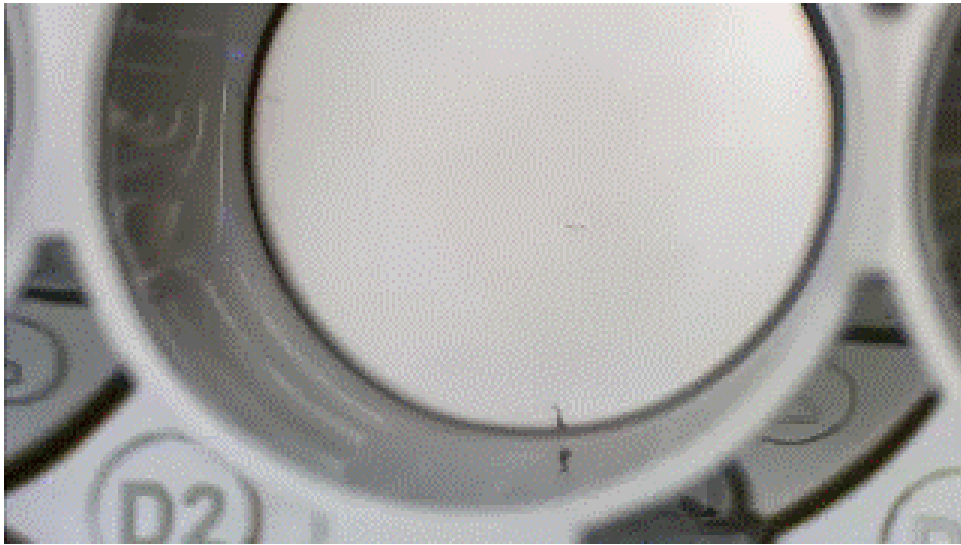
助剤名	NOEC (%, v/v)	48h EC ₅₀ (%, v/v)	95%信頼限界
アセトン	2.0	5.3	4.7~6.0
メタノール	1.7	2.1	—
エタノール	0.41	1.0	0.87~1.2
DMF	0.34	0.52	—
DMSO	0.65	1.1	—
Tween 20	0.63	2.9	2.5~3.4

アセトン、メタノールは NOEC および 48h EC₅₀ 値が高く、コガタシマトビケラに対し最も毒性の低い助剤であった。毒性の観点からはアセトン、メタノールが助剤として推奨されるが、被験物質の物性や保存安定性等の条件も考慮して助剤を決定する。

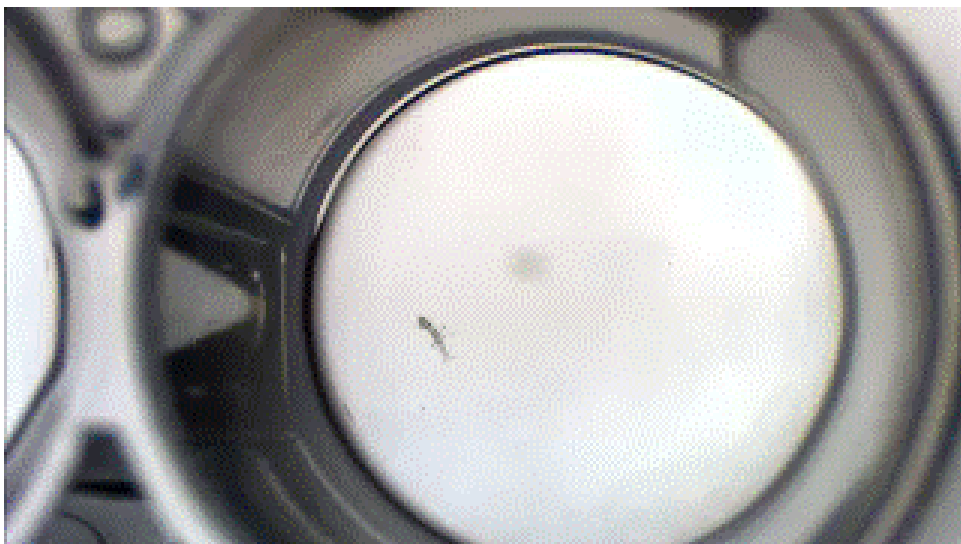
附属資料 3-E 試験個体の状態と不動の判定例

動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 3-3 正常個体（遊泳）

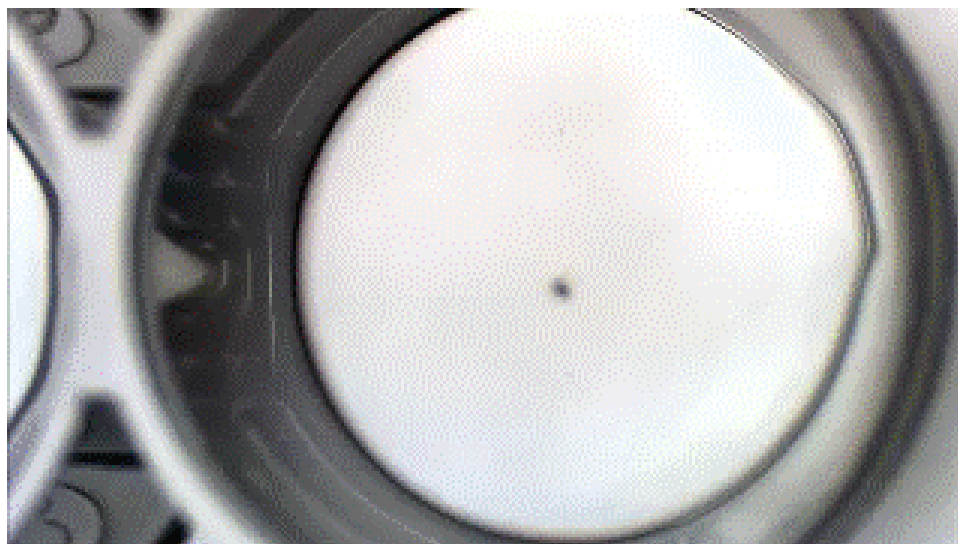


動画 3-4 正常個体（歩行）



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 3-5 水面直下で丸まっている正常個体
(試験水を滴下して沈め水流刺激を与える→屈伸開脚反応)



動画 3-6 正常個体 (丸まっている→屈伸開脚反応)
(ジノテフラン 10.4 µg/L 48 時間曝露)



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

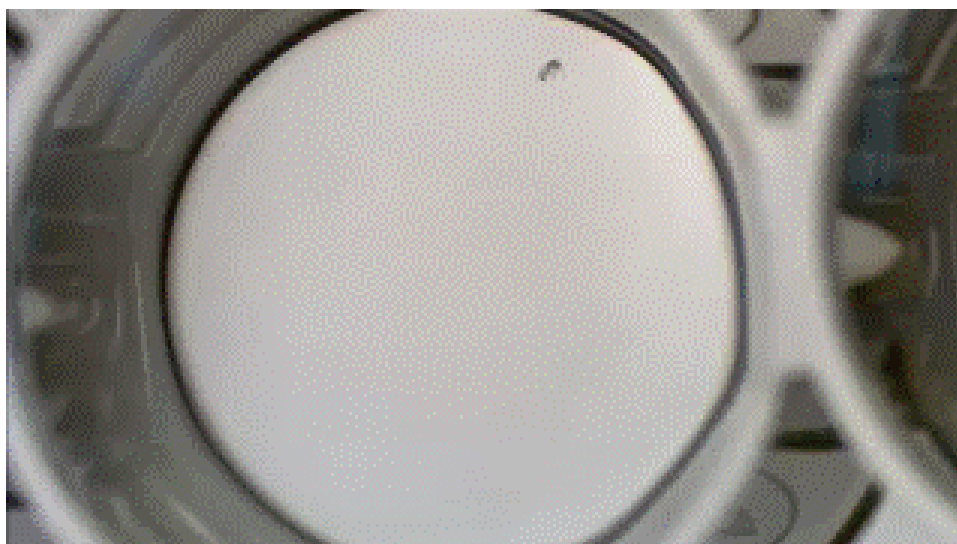
動画 3-7 正常個体（弛緩→屈伸開脚反応）

（ジノテフラン 8.6 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）

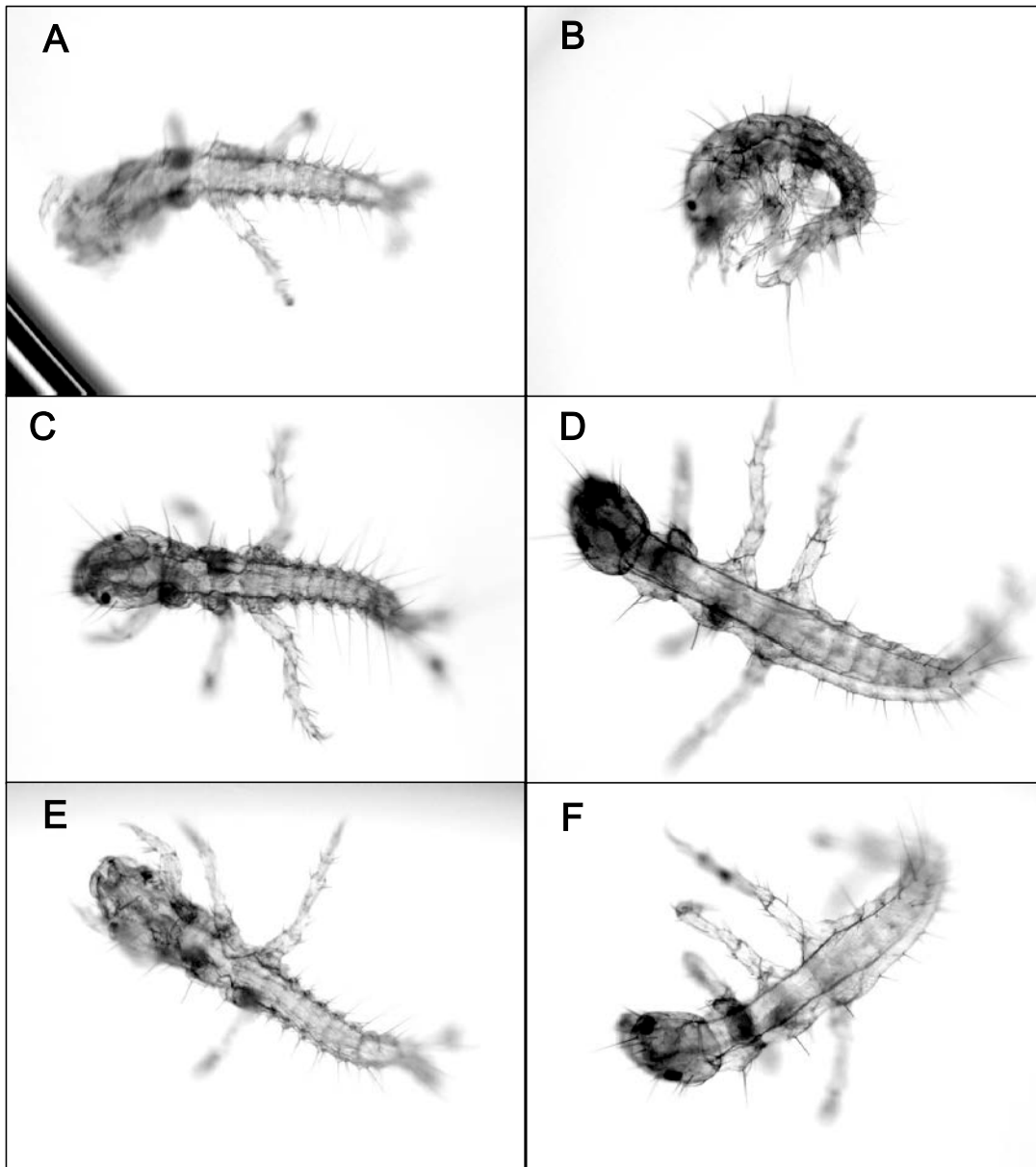


動画 3-8 不動個体（水流刺激に対し屈伸開脚反応せず）

（ジノテフラン 18 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）



附属資料 3-F 農薬に48時間曝露したときの試験個体の症状例



- A : 正常個体 (ベンスルタップ 127 µg/L) .
 B : 不動個体 (ベンスルタップ 200 µg/L) . 腹部萎縮。水流刺激に対し体を丸めたまま屈伸開脚反応を示さない (瀕死) .
 C : 正常個体 (スピロメシフェン 80 µg/L) .
 D : 不動個体 (スピロメシフェン 184 µg/L) . 胸部・腹部膨満状態。屈伸反応を示さない。
 E : 正常個体 (トルフェンピラド 0.76 µg/L) .
 F : 不動個体 (トルフェンピラド 0.48 µg/L) . 胸部・腹部膨満状態。屈伸反応を示さない。

附属資料 3-G 試験期間中の連続光照射と被験物質の安定性に関する事例

1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法では、水面浮上を防止するため 1 齢幼虫の正の走光性を利用して、曝露期間中に試験容器底面より連続光を照射する。被験物質によっては水中光分解性が高いものがあり、曝露期間中の濃度維持が問題となる。

ここでは、参考事例としてネオニコチノイド殺虫剤のクロチアニジンに対する曝露期間中の安定性を示す。「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料 クロチアニジン」 (<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/302clothianidin.pdf>) (2019 年 12 月閲覧)によれば、その水中光分解半減期は 1 時間未満である。

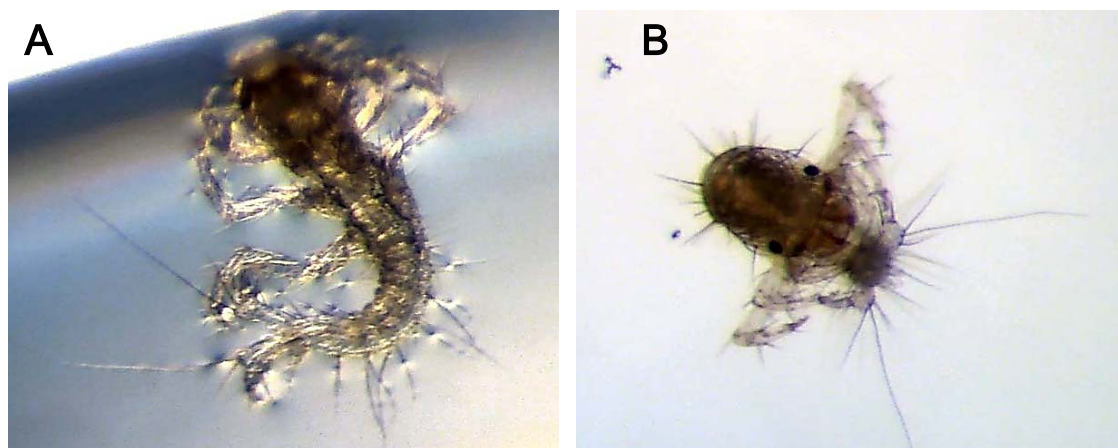
クロチアニジンの試験は、本マニュアルに基づき 2015 年 1 月 10 日～12 日に実施した。試験水中の被験物質濃度の分析結果のみ以下に示す。

濃度区	0 時間目	48 時間目	対開始時 (%)
対照区	測定せず	測定せず	—
助剤対照区	測定せず	測定せず	—
3.40	3.65	3.83	105
4.06	4.57	4.59	101
4.89	5.37	5.41	101
5.88	6.50	6.47	99.6
7.04	8.05	8.14	101
8.45	9.73	9.77	100
10.1	11.3	11.6	103

曝露期間中、試験容器底面より連続光照射していたにもかかわらず、被験物質は試験水中で安定だった（対開始時 99.6～105 %）。その他の幾つかのネオニコチノイド殺虫剤についても同様の傾向を示しており、本急性毒性試験法の光条件は、ネオニコチノイド系殺虫剤の安定性に大きな影響を及ぼさないと考えられる。

しかしながら、用いる光源の波長や殺虫剤の種類によっては曝露期間中に分解する可能性もあるため、試験を実施するにあたり試験条件下での被験物質の安定性や試験設計について事前に十分検討を行う必要がある（3-2. 被験物質）。

附属資料 3-H 水面浮上個体と水面直下で丸まっている個体



A : 水面浮上個体. 水面直下に張り付くような状態で, 体の一部が水面上に露出しており, 表面張力により水面が歪んで見える.

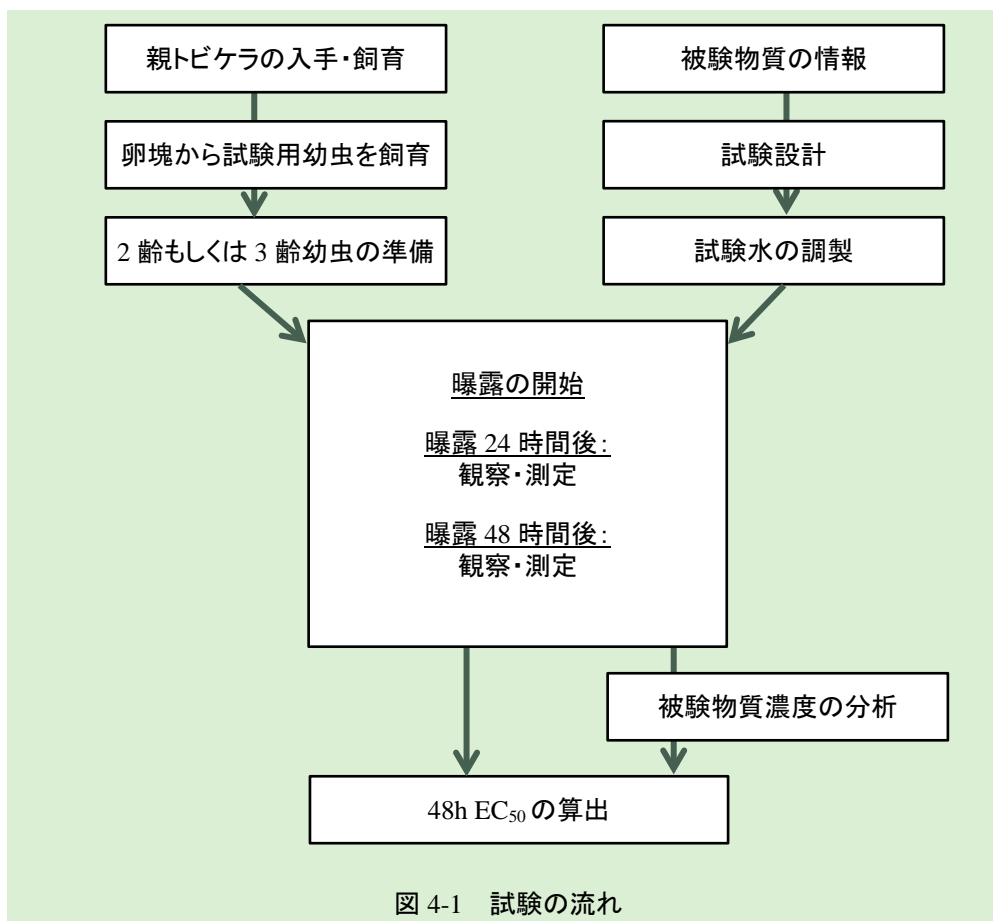
B : 水面直下で丸まっている個体. 水面浮上個体とは見なさない.

第4章 2 齢・3 齢幼虫を用いた 急性毒性試験法

コガタシマトビケラ 2 齢および 3 齢幼虫に対する農薬の影響を評価する試験法である。水生昆虫は成長に伴い化学物質に対する感受性が変化する可能性がある。本試験法は、遊泳性の高い 1 齢幼虫の急性毒性試験法を改良し 2 齢および 3 齢幼虫に適用したものであり、幼虫の成長に伴う感受性変動を評価することにより、より現実的な農薬の生態影響を評価することができる。

4-1. 試験概要

2 齢もしくは 3 齢幼虫（頭幅をもとに齢数を判定）を、数段階の濃度の被験物質に 48 時間曝露する。試験中、試験水を攪拌し流水環境を再現する。曝露 24 時間および 48 時間後に試験個体の不動数を観察・記録し、48 時間曝露における半数影響濃度（EC₅₀）を算出する（図 4-1）。



4-2. 被験物質

試験設計に必要な被験物質の情報（水溶解度、オクタノール-水分配係数、水中安定性、純度等）や、試験水中の被験物質濃度の測定法および回収率・定量限界等の情報を収集・整備しておく。これらの情報を基に、試験水の調製法や試験容器等の試験設計を検討する。

4-3. 基準物質

基準物質を用いた試験を実施し、試験系・試験条件の妥当性を確認することが望ましい。基準物質としては、1齢幼虫を用いた急性毒性試験のリングテストに用いられた塩化カリウムが挙げられる。また、コガタシマトビケラ幼虫を用いた急性毒性試験結果が文献等で公開されている場合は、その被験物質を基準物質として用いても良い（例えば、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用をもつ有機リン系殺虫剤フェントロチオンなど）。

4-4. 試験の妥当性

試験の妥当性基準は以下の通り

- 曝露期間中において対照区の不動率は10%を超えてはならない。
- 溶存酸素濃度は曝露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

4-5. 試験方法

(1) 主な使用機器・器具類

試験容器には、ガラス製もしくは化学的に不活性な素材の容器を用いる。試験個体の体サイズが小さく、実体顕微鏡等を用いた観察の都合上、試験容器のサイズが制限される。試験容器のサイズが小さい場合、同一容器に複数個体を入れると共食いする可能性があるため、1個体/容器の個体密度が望ましい。試験観察の際に実体顕微鏡を使用するため、上面から観察しやすいポリスチレン製マルチディッシュ（平底ウェル）が試験容器として推奨される（図4-2）。ただし、被験物質の物性によっては、被験物質が試験容器に吸着する可能性があるため、被験物質濃度の維持に留意する。

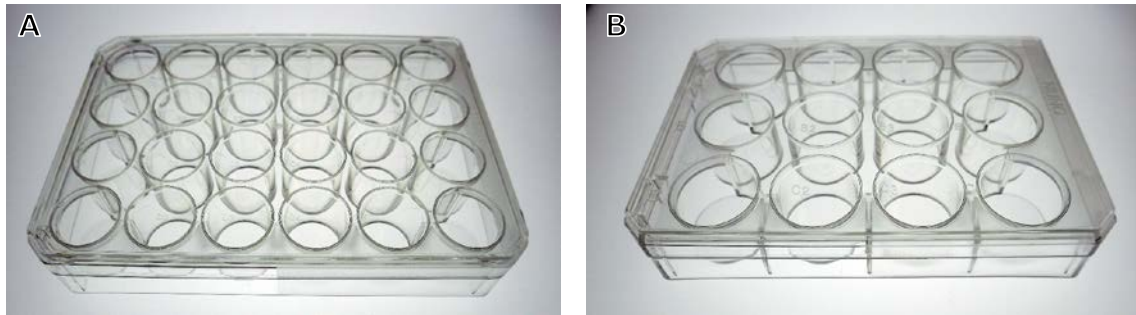


図4-2 試験容器の例

A：ポリスチレン製 24 穴マルチディッシュ（平底ウェル）．2 齢幼虫試験用。
 B：ポリスチレン製 12 穴マルチディッシュ（平底ウェル）．3 齢幼虫試験用。

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。ガラス製器具類については、使用前に適切な方法で洗浄しておく。注記がない限り、2 齢・3 齢幼虫試験で共通の使用器具である。

<試験水の調製用>

残留塩素計： OYWT-31（株式会社オーヤラックス）
 天秤： AG245（メトラー・トレド株式会社）
 ダイリューター： MICROLAB[®] 500 SERIES（Hamilton）
 マイクロピペット： Eppendorf Research Plus (100)
 ディスペンサー： Eppendorf Multipette Plus
 スターラー： MAGNETIC STIRRER REMIX RS-6D（アズワン株式会社）
 試験水調製用容器： ガラス製ビーカー

<試験個体の準備用>

容器： ガラス製結晶皿（直径 12 cm）
 採取器具： スパチュラ、柄付き針、ガラスピペット（先端外径 2～3 mm）
 実体顕微鏡： MZ75（ライカマイクロシステムズ株式会社）
 照明： トレビュアーA4-500（株式会社トライテック）

<曝露試験用>

曝露試験容器： ポリスチレン製 24 穴マルチディッシュ（Nunc、平底ウェル）2 齢用
 ポリスチレン製 12 穴マルチディッシュ（Nunc、平底ウェル）3 齢用
 温度計： Thermo Recorder RTR-52（株式会社ティアンドデイ）
 pH 計： LAQUA twin（株式会社堀場製作所）

溶存酸素計： NeoFox (OceanOptics 社)
温度制御装置： 試験温度を一定に維持できる恒温室、インキュベーター等の装置
実体顕微鏡： MZ75 (ライカマイクロシステムズ株式会社)
光学顕微鏡： DMIRB (ライカマイクロシステムズ株式会社)
照明： トレビュアーA4-500 (株式会社トライテック)
ロータリーシェーカー： RS-200 (柴田科学株式会社)

(2) 供試生物

■ 生物種

- ▶ コガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) を用いる。
- ▶ 供試生物は経歴 (入手源、飼育方法等) の明らかなものを用いる。農業環境変動研究センターでは、2004年より室内飼育系統を維持しており、卵塊の配布を行っている。
- ▶ 基準物質での半数影響濃度を確認することが望ましい。

■ トビケラの飼育

試験個体を得るための卵塊の入手・幼虫の飼育については、[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

■ 生育段階

2齢幼虫もしくは3齢幼虫を用いる。

頭幅を観察し齢期の判定を行う ([附属資料4-A 各齢期の幼虫の頭幅](#))。

なお、1齢幼虫の腹部には気管鰓が突出していないため、容易に2齢以降の幼虫との区別ができる (図4-3D, E)。齢期が進むにつれ気管鰓数が増大するものの、基本的な外部形態は大きく変化しない (図4-3E, F)。キチン板で覆われていない幼虫の腹部は、同一齢期の個体間でも肥大成長による変異が大きいため、幼虫の体サイズでは正確な齢期の判定はできない。したがって、齢期を適確に判別するためには頭幅を観察する必要がある (図4-3B, C、[附属資料4-A 各齢期の幼虫の頭幅](#))。頭幅はおよそ0.19 mm (1齢)、0.27 mm (2齢)、0.42 mm (3齢) で、齢が進むにつれ1.5倍程度大きくなるため、実体顕微鏡で観察すれば頭幅をいちいち計測しなくても容易に齢期を区別できる。

■ 性質

河川におけるコガタシマトビケラ幼虫は、砂粒等の底質を用いて固着巣を作り、巣の入り口に捕獲網を展開して流下してきた餌を捕集・摂食して生活している。ふ化直後の1齢幼虫に比べ、営巣・固着傾向が強まる2齢以降の幼虫を用いた急性毒性試験においては、この性質を考慮しつつ試験個体に可能な限りストレスを与えないように曝露期間中試験水を回転攪拌して擬似的な流水環境を再現する。

また室内条件下では、ふ化直後の1 齢幼虫は試験容器内で活発な遊泳・歩行運動が観察されるが、2 齢以降の幼虫は遊泳性が弱まり、歩行運動を示す個体や試験容器内で営巣する個体（図4-4）が多く観察される。しかしながら、1 齢幼虫ほどではないにせよ、水面へ浮上・捕捉される個体も観察されることから、水面への浮上を防止するため、幼虫の正の走光性を利用して曝露開始～曝露期間中の一連の操作において、容器底面から白色蛍光灯もしくは白色LEDによる連続光（2000～3000 lux）を照射し、幼虫を容器底面へ誘引する。



図4-3 1 齢～3 齢幼虫の形態

A：1 齢幼虫頭部， B：2 齢幼虫頭部， C：3 齢幼虫頭部。
 D：1 齢幼虫(全体)， E：2 齢幼虫(全体)， F：3 齢幼虫(全体)。
 矢印①：刺毛， 矢印②：気管鰓。

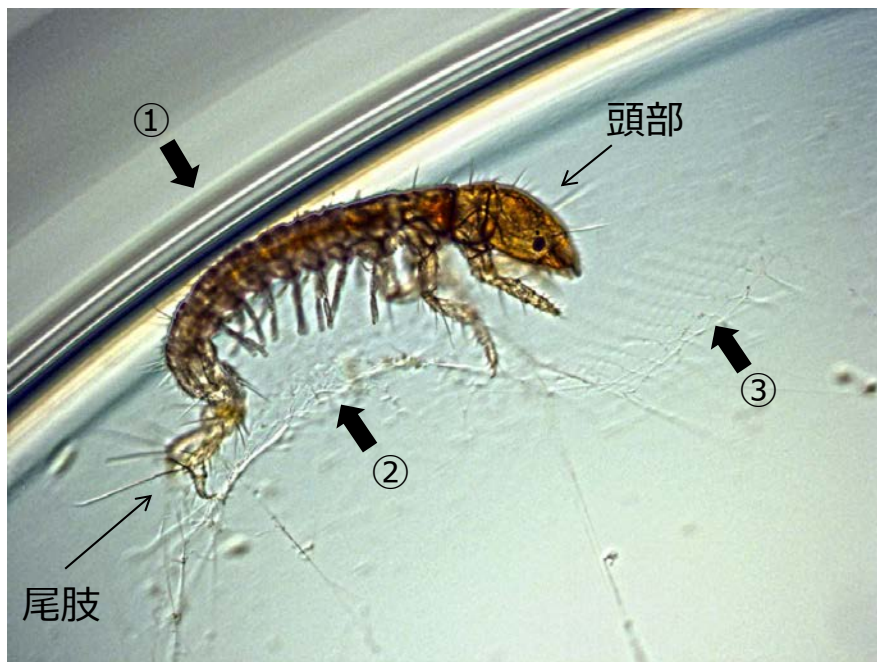


図4-4 試験容器内で栄養した2齢幼虫

矢印①：ウェル内壁面，矢印②：絹糸で作ったトンネル状の巣，矢印③：捕獲網。

■ 試験個体の準備

2齢幼虫もしくは3齢幼虫の試験個体を得るために、卵塊から幼虫をふ化させて所定の齢期まで室内飼育する必要がある。飼育の方法は[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照されたい。[附属資料4-B 試験個体（2齢および3齢幼虫）の準備事例](#)に毒性試験用の2齢および3齢幼虫を得るための飼育事例を掲載する。

試験当日に、所定の齢期に達した幼虫を目視で多く確認できる幼虫飼育水槽から試験個体を採取する。幼虫飼育水槽の底質（ガラスビーズ）を、幼虫の巣と一緒にミクロスパーテル等のヘラ部分で適量すくい取り、飼育水を満たしたガラス製結晶皿（直径12cm）に入れる。これを実体顕微鏡下で観察し目的の齢期の幼虫を選別する。頭部のサイズと気管鰓の有無を基に齢期を判定する（図4-3、[附属資料4-A 各齢期の幼虫の頭幅](#)）。頭幅は齢期によって約1.5倍異なるので、齢期を容易に判定できる。幼虫はガラスビーズを絹糸でつなぎ合わせた巣の中に入っていることが多い。その場合は、柄付き針で優しく巣を刺激して幼虫を追い出し、幼虫が逃げ出したところをピペットで吸い取って、別に用意した飼育水入ったガラス製結晶皿に移す（図4-5）。柄付き針で刺激する際は幼虫を傷つけないように注意する。必要数の個体が採取できたら、実体顕微鏡で齢期を再度確認し、自発的運動（遊泳・歩行）をしている個体を試験個体とする。試験個体の取り扱いには先端外径2～3mm程度のガラスピペットを用いる。

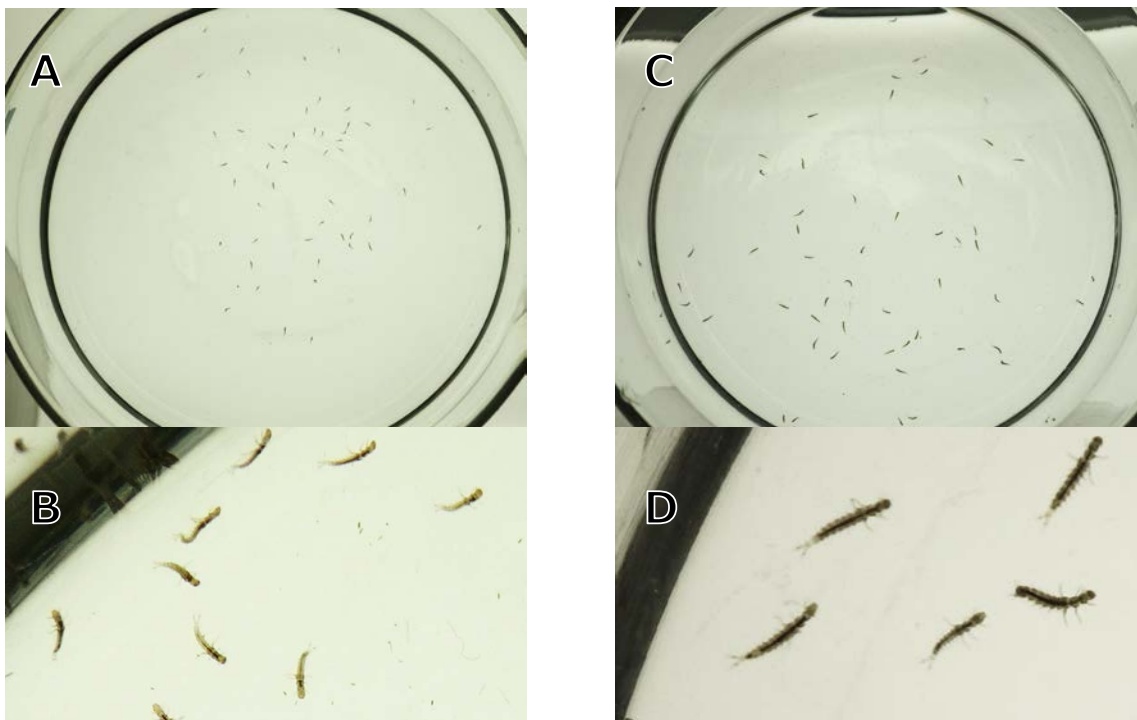


図 4-5 試験個体として採取した幼虫

A, B : 2 齢幼虫. C, D : 3 齢幼虫.

(3) 曝露方法

止水式または半止水式により曝露試験を行う。

(4) 曝露期間

48 時間とする。

(5) 試験生物数および試験区の設定

■ 試験生物数

試験区ごとに少なくとも 20 個体の幼虫を使用する。

■ 試験区の設定

➤ 試験濃度区の設定

- ・等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。ただし、被験物質の性状により広い濃度範囲で影響が認められる場合はもっと大きな公比でも良い。
- ・試験濃度および濃度公比は、予備試験の結果を参考にして決定する。
- ・濃度範囲には、試験個体のすべてに影響が見られる濃度と全く影響が見られない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部に影響が見られる濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。
- ・試験濃度の上限は100 mg/Lとする。ただし、被験物質の性状によりこれらの濃度の試験が困難な場合は技術的に可能な濃度を上限とする。上限濃度で被験物質の毒性によると考えられる影響がみられた場合は、これらの上限濃度以上の濃度区を設定し可能な限りEC₅₀値を求めることが望ましい。

➤ 対照区の設定

- ・被験物質を含まない無処理対照区を設ける。
- ・試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区も設ける。

(6) 試験水の調製

試験水の調製方法は以下のとおりとする。なお、試験水および試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

- 易水溶性農薬の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験水又は試験原液を調製する。
- 難水溶性農薬の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験水または試験原液を調製するか、有機溶剤を助剤として用いて試験原液を調製する。助剤は供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ被験物質の性質を変えないものを用いる。1齢幼虫に対する助剤の有害性情報が参考となる([附属資料4-C 各種助剤の1齢幼虫に対する急性毒性](#))。
- 助剤の試験水中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100 mg/L (又は0.1 mL/L) を超えないことが望ましい。

(7) 曝露の開始と試験条件

試験操作の流れを図4-6に示す。調製した試験水を試験容器にディスペンサーを用い分注する(図4-7)。また、一時プール用に50 mL ガラス製ビーカーにも試験水を分注しておく。ガラスピペットを用いて自発的運動(遊泳や歩行)をしている幼虫を無作為に選び出し、少量の希釈水とともに一時プール用ビーカーに滴下して沈め、試験水になじませたのち、直ちに試験容器に移し曝露を開始する。試験個体の水面への浮上を抑制するために、一連の操作は、容器底面から白色蛍光灯もしくは白色LEDによる連続光を照射しながら行う。試験個体を扱うピペッティングの際には、試験個体を空気に触れさせないように注意する。

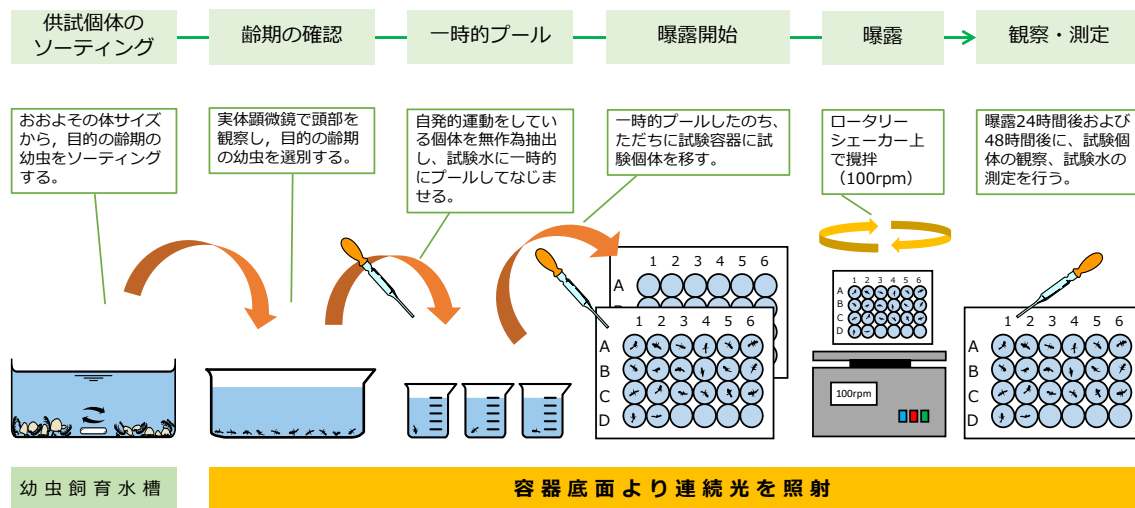


図4-6 操作の流れ

曝露の環境条件は以下の通りである。

■ 試験水量

2 齢幼虫 1 個体あたり 3 mL 以上とする。

3 齢幼虫 1 個体あたり 5 mL 以上とする。

■ 試験個体密度

1 ウェルあたり 1 個体とする。

■ 水温

設定濃度は 20℃とし、曝露期間中の変動範囲は±1℃以内とする。

■ 照明

曝露期間中、試験容器底面より連続光を照射。ただし、試験容器を光源に直置きせず、光源から熱が伝導しないように隙間をあけること（図 4-8）。

■ 試験水の攪拌

曝露期間中、試験容器および照明装置をロータリーシェーカーに載せ、100 rpm で回転攪拌する。

■ 給餌

曝露期間中は給餌を行わない。

■ 希釈水

- 脱塩素水道水を用いる。
- 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まない水質であること。
- 使用前には十分に曝気するとともに、温度調整を行う。

■ 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、曝露期間を通して試験温度での飽和濃度の 60 % 以上を保つようにする。

■ pH

試験水の pH 調整は行わない。

■ 給気

曝露期間中は、試験水に給気しない。

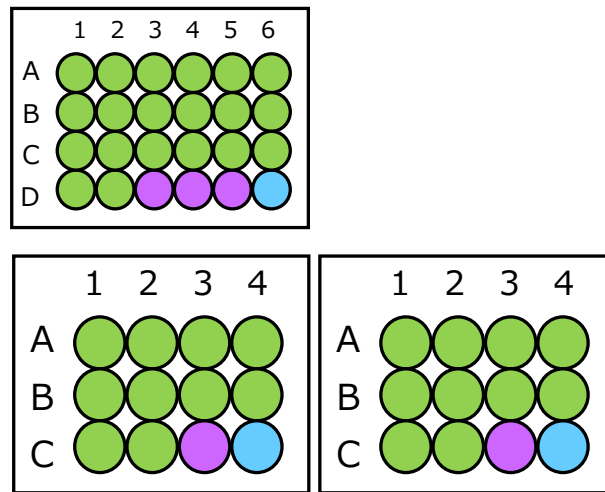


図 4-7 試験容器における試験個体の配置例（上段：24 穴，下段 12 穴マルチディッシュ）

- ：試験個体投入ウェル。
- ：ピペット洗浄用兼溶存酸素濃度測定用ウェル（試験個体を投入する）。
- *●のウェルには試験水を分注する。
- ：水温測定用ウェル（希釈水を分注）。



図 4-8 2 齢幼虫を用いた急性毒性試験風景

試験容器を光源に直置きせず，光源から熱が伝導しないように隙間をあける。
ロータリーシェーカー上で試験水を攪拌する。

(8) 観察と測定

■ 供試生物の一般状態の観察

曝露開始 24 時間後および 48 時間後における不動個体の有無について、実体顕微鏡で観察し記録する（総合倍率～10 倍程度）。明視野観察の方が判定しやすい。不動個体の判定フローを（図 4-9 および [附属資料 4-D 試験個体の状態と不動の判定例](#)）に示す。

自発的運動により移動する個体（体をくねらせて遊泳もしくはウェル底面・壁面を歩行している個体）は正常とする。

自発的に移動していない個体（丸まっているもしくは弛緩している、など）については、営巣の有無を確認する。絹糸でつくられた巣の中にいる場合は営巣個体と判定し、それ以外は営巣していない個体と判断する。本毒性試験系では通常、営巣個体はウェル底面の縁に沿って営巣する（図 4-4）。

営巣個体については、巣の入り口で頭部を振る行動（捕獲網に捕捉された食物粒子を集めるための採餌行動）¹を自発的に示す場合は正常と判定する。前述の行動が確認されない営巣個体について、頭側もしくは尾肢側の巣の入り口をパスツールピペット等で優しく刺激した時に、速やかに身構えて体を縮めるような反応を示す場合は正常と判定する。刺激に対し上記のような反応を示さない場合は、被験物質の影響を受けた不動個体とみなす。また、体色が変色している個体は死亡と判定する。

自発的運動により移動せず、かつ営巣していない個体については、ガラスピペットを用いて試験水を攪拌して水流刺激を与え、屈伸開脚反応（刺激に対し体を伸ばしたり丸めたりする反応。体を伸ばす際は同時に脚をひろげる）を示した個体を正常と判定する。水流刺激に対し、屈伸開脚反応を示さない個体および屈伸するが開脚できない個体は不動個体と判定する。

水面に浮上している個体は試験水を滴下して沈めてから判定を行う。また、行動や外見に異常が確認された場合は記録する。その他、脱皮等の事象も記録する。

水流刺激を与える際は、激しいピペッティングは行わない。ピペッティングが激しいと、試験水の飛沫とともに、試験個体が跳ね上げられて水面より上の壁面に付着する、試験容器から飛び出す等により、試験個体が失われる可能性がある。

¹ 巣内の正常個体であっても、頭部を静止していることがある。そのような個体については、しばらく観察していると頭部を振る行動を示す。

■ 被験物質濃度の測定

- 農薬を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質濃度を少なくとも、曝露開始時、曝露終了時、換水前および換水後に測定する。各ウェルから試験水を等量採取・混合した試料を分析試料とする。
- 被験物質濃度は、曝露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい²。

■ 環境条件の測定

- 試験に先立って希积水の水質を確認する。
- 各試験区における試験水の水温、溶存酸素濃度およびpHを曝露開始時、曝露終了時、24時間毎に測定する。半止水式試験の場合は換水前および換水後も測定する。また、曝露期間中、pHは通常の場合1.5以上変動してはならない。

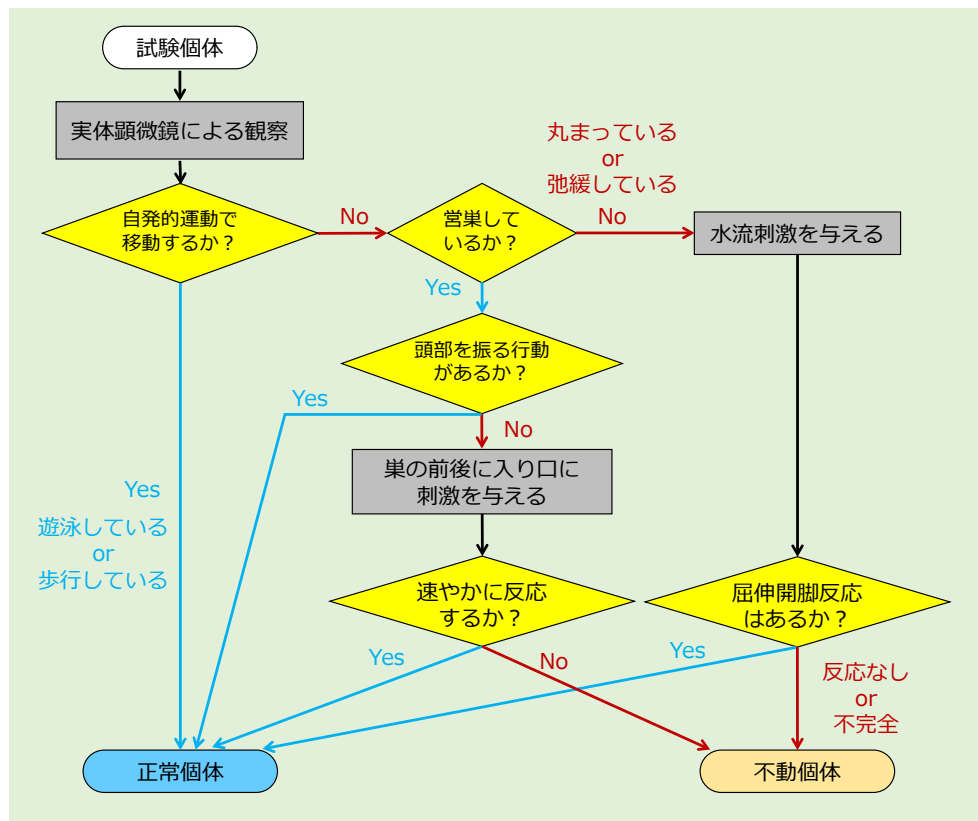


図 4-9 不動個体（影響個体）の判定フローチャート

² 本急性毒性試験法は、曝露期間中試験容器底面より連続光を照射している。水中光分解性が高いネオニコチノイド系殺虫剤の一部の剤については、本試験条件下で曝露期間中の水中安定性が確認されている(附属資料 4-E 試験期間中の連続光照射と被験物質の安定性に関する事例)。

4-6. 限度試験

4-5. 試験方法を用いて、被験物質のおおよその毒性を調べるために、被験物質濃度 100 mg/L もしくは被験物質の水溶解度が 100 mg/L 未満である場合はその水溶解度の濃度で限度試験を行ってもよい。限度試験には試験区・対照区ともに 20 個体の試験個体を用いる。試験終了時に試験区で不動個体が 10 %を超えたときは、4-5. 試験方法による本試験を行う。

4-7. 結果の処理法

各濃度における不動率の結果から、半数影響濃度 (EC_{50}) を計算する。

EC_{50} を算出するにあたり、Finney の図解法、対数正規確率紙上での作図法、プロビット法、ロジット法等一般に用いられているいずれの方法でも良い。可能ならばプロビット法やロジット法を用い、95 %信頼限界も算出するとともに EC_{10} を無影響濃度として報告する。ただし、無影響濃度については、 EC_{10} の代わりに 0 %影響最高濃度を報告しても良い。

被験物質濃度の測定値が設定濃度から ± 20 %以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき EC_{50} を算出する。

4-8. 報告事項

試験報告書には次の項目について記載する。

- 1) 試験機関：名称、所在地
- 2) 試験責任者と試験担当者：氏名、所属および連絡先
- 3) 被験物質：化学物質の名称（一般名、商品名等も併記）、構造式（示性式、分子式及び分子量も併記）、入手先、製造年月日及びロット番号、純度及び不純物、水溶解度等の物性に関する資料、その他必須事項
- 4) 試験容器：製品名、材質、形状
- 5) 試験生物：
 - 種名（学名）および系統名
 - 由来（入手先）
 - 飼育方法（馴化中も含む。餌の種類と量、給餌頻度等）
- 6) 試験条件と方法：
 - 試験開始日、試験終了日および試験期間（本試験および予備試験の試験実施日も併記）
 - 試験温度
 - 希釈水の入手源と水質
 - 試験水の状態（透明、白濁、沈殿等）、試験原液の保管方法および試験水への被験物質の添加法（助剤を用いた場合は、その名称・添加方法及び助剤濃度）

- －試験容器あたり（またはウェルあたり）の試験水量および濃度区ごとの試験個体数
- －濃度区の設定根拠および各濃度区の被験物質の濃度（設定値および実測値）
- －光源の種類、光周期、照度
- －試験期間中の溶存酸素濃度、pH の測定法
- －試験結果の処理法

7) 試験結果：

- －試験条件の測定値（試験温度、溶存酸素濃度、pH）
- －被験物質濃度の分析結果
- －各濃度区及び対照区の 24 時間後、48 時間後における不動数とその割合
- －試験終了時の濃度－反応曲線を示す図
- －EC₅₀ 値（可能であればそれらの 95 % 信頼限界）とその算出法
- －可能であれば無影響濃度 (EC₁₀ 値) とその算出法 (代替として 0% 影響最高濃度でも良い)
- －試験水の外観
- －その他の観察された影響およびそれらが認められた濃度

4-9. 用語の定義

- 限度試験：適切な濃度において毒性の有無を調べる試験。
- 予備試験：本試験実施に先立ち、試験条件・試験方法・試験濃度範囲を決定するために行う試験。
- 本試験：予備試験で得られた情報を基に、最終的な急性毒性値を求めるために行う試験。
- 試験水：試験生物を曝露するために用いる被験物質を含んだ水。
- 希釈水：試験水の調製に用いる被験物質を含まない水。
- 試験原液：試験水の調製に用いる被験物質を含む溶液。
- 被験物質：毒性試験に用いる農薬。
- 有効成分：農薬としての薬効を発揮するための主たる成分。
- 濃度：この試験では、添加濃度、実測濃度、設定濃度等の区別を明確にし、それを表示する。
- 濃度の単位：化学物質の濃度は重量/容量（ $\mu\text{g/L}$ あるいは mg/L ）で表記する。
- 助剤：試験水を調製するために用いる有機溶剤
- 曝露期間： EC_{50} 値を求めるために試験生物を試験水に曝露した期間
- 止水式試験：曝露期間中、試験水を交換しない試験。
- 半止水式試験：曝露期間中、一定期間ごとに試験水を試験容器ごと交換する試験。
- 不動：営巣個体においては、頭部を振る行動や刺激に対し身構える反応を示さない状態。
営巣していない個体においては、遊泳・歩行などの自発的な運動がなく、水流刺激に対する屈伸開脚反応を示さない状態をいう。
- EC_{50} ：試験個体の50%に、不動をもたらすと算定される被験物質の濃度をいう。試験時間を明記し表記する。（例：48h EC_{50} ）
- 蓄養：入手した試験生物をそれまでの生息環境と大きく異ならない状態で飼育すること。あるいは、試験生物を試験環境と大きく異ならない状態で飼育すること。

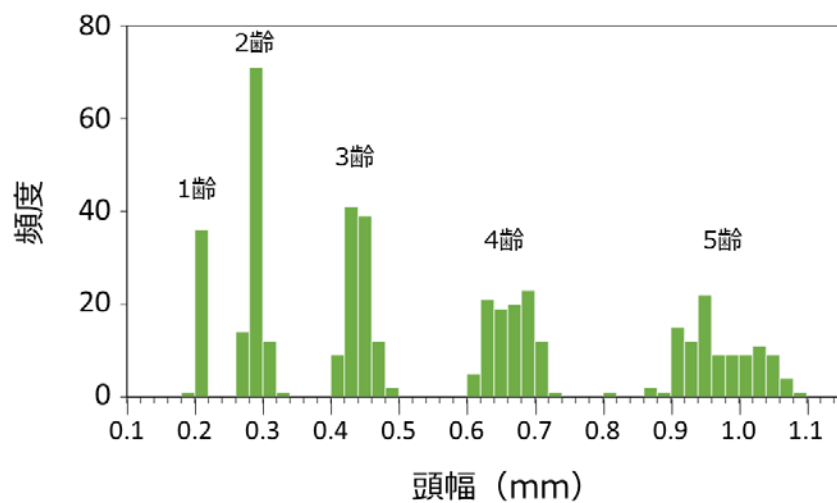
4-10. 参考文献

- Stuijzand, SC., Poort, L., Greve, GD., van der Geest, HG. And HS. Kraak (2000) Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: Taxon, development stage, and exposure time. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 582–587.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A useful new insecticide bioassay using first-instar larvae of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of Pesticide Science*, 34, 13–20.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains. *Journal of Pesticide Science*, 34, 21–26.
- Yokoyama, A., Hamaguchi, K., Ohtsu, K., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A method for mass-rearing caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata)(Trichoptera: Hydropsychidae), as a new test organism for assessing the impact of insecticides on riverine insects. *Applied Entomology and Zoology*, 44, 195–201.
- 横山淳史 (2017) 生物個体群の回復性と成長による感受性の変動を考慮した毒性評価の試みーコガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを活用してー, *日本農薬学会誌*, 42, 112–118.

4-11. 附属資料

附属資料 4-A 各齢期の幼虫の頭幅

農業環境変動研究センターで維持されている室内飼育系統から各齢期の幼虫を採取し、80%アルコールで固定した。実体顕微鏡下でタングステン針やピンセットを用いて、アルコール固定した幼虫の頭部を胸部から切断した。光学顕微鏡で頭部を観察し、接眼マイクロメーターを用いて最大となる頭部の幅を測定してmm単位に換算した。



頭幅の頻度分布は5つの山に明確に区別された（ヒストグラム図）。平均頭幅は1齢、2齢および3齢幼虫で各々0.187、0.272および0.420mmであり、齢が進むにつれ個体差が大きくなる傾向があった。頭幅の成長比は約1.5であり（脱皮の度に頭幅が1.5倍に増大することを意味する）、実体顕微鏡や光学顕微鏡を用いれば頭のサイズで齢期を明確に区別することができる。また慣れてくると、目視でおおよその齢期判定が可能である。

各齢期のコガタシマトビケラ幼虫の頭幅データ

齢	測定数	平均(mm)	標準偏差	変動係数%	頭幅の成長比
1 齢	37	0.187	0.004	2.1	—
2 齢	98	0.272	0.010	3.6	1.45 (2 齢/1 齢)
3 齢	103	0.420	0.016	3.8	1.55 (3 齢/2 齢)
4 齢	102	0.647	0.032	4.9	1.54 (4 齢/3 齢)
5 齢	104	0.953	0.050	5.3	1.47 (5 齢/4 齢)

附属資料 4-B 試験個体（2齢および3齢幼虫）の準備事例

2015年2月12日に幼虫飼育容器（直径30cmの亚克力製円形水槽）を準備し、2月14日～28日にかけて計135個の卵塊を飼育容器に投入した。2月26日から適量のテトラフィン粉末等を毎日給餌した。3月3日には2齢幼虫を目視で初めて確認し、3月6日以降、容易に確認できるほど2齢幼虫が増加したので、3月9日および12日に、急性毒性試験の試験個体として各々150および160個体の2齢幼虫を飼育容器から採取した。3月13日以降3齢幼虫が増加したので、16日に急性毒性試験の試験個体として180個体の3齢幼虫を採取した。

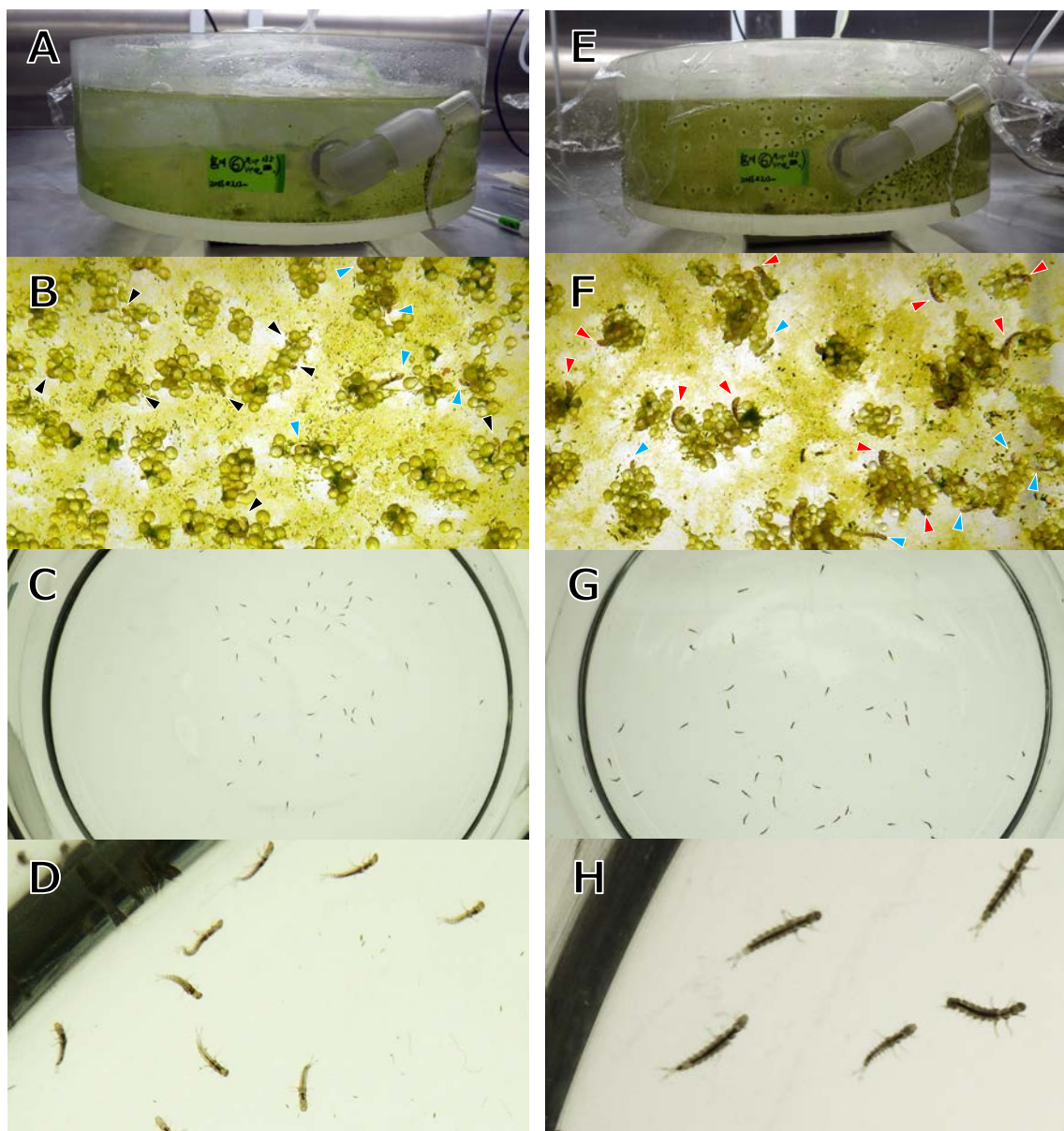
幼虫飼育容器の準備から2齢幼虫および3齢幼虫を用いた急性毒性試験を実施できるまでに要した日数は26日および33日であった。この事例では、135個の卵塊を2週間にわたり投入したが、投入卵塊数を増やし投入期間を短くすれば、本事例よりも所要日数を短縮することができると考えられる。

月 日	飼育記録
2/12	幼虫飼育容器の準備 飼育水は常時掛け流し、通気
2/14	卵塊の投入開始
2/26	給餌開始（毎日、テトラフィン粉末等）
2/28	卵塊の投入終了（計135個投入）
3/3	2齢幼虫を初確認
3/6	2齢幼虫 増加
3/9	3齢幼虫を初確認 試験用に2齢幼虫を150個体採取
3/12	試験用に2齢幼虫を160個体採取
3/13	3齢幼虫 増加
3/16	試験用に3齢幼虫を180個体採取
3/17	4齢幼虫を初確認
3/20 （後略）	5齢幼虫を初確認 （後略）

*飼育法については、[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

2015年3月9日

2015年3月16日



- A, E : 幼虫飼育容器全景（それぞれ3月9日および16日）.
B, F : 飼育容器上面より撮影（それぞれ3月9日および16日）.
底質のガラスビーズの直径は約0.6 mm, 黒矢印 : 1 齢, 青矢印 : 2 齢, 赤矢印 : 3 齢.
C, D : 飼育容器から採取した毒性試験用の2 齢幼虫.
G, H : 飼育容器から採取した毒性試験用の3 齢幼虫.

附属資料 4-C 各種助剤の1齢幼虫に対する急性毒性

助剤名	NOEC (%, v/v)	48h EC ₅₀ (%, v/v)	95%信頼限界
アセトン	2.0	5.3	4.7~6.0
メタノール	1.7	2.1	—
エタノール	0.41	1.0	0.87~1.2
DMF	0.34	0.52	—
DMSO	0.65	1.1	—
Tween 20	0.63	2.9	2.5~3.4

アセトン、メタノールは NOEC および 48h EC₅₀ 値が高く、コガタシマトビケラに対し最も毒性の低い助剤であった。毒性の観点からはアセトン、メタノールが助剤として推奨されるが、被験物質の物性や保存安定性等の条件も考慮して助剤を決定する。

附属資料 4-D 試験個体の状態と不動の判定例

動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 4-1 正常個体（遊泳）（光学顕微鏡観察）

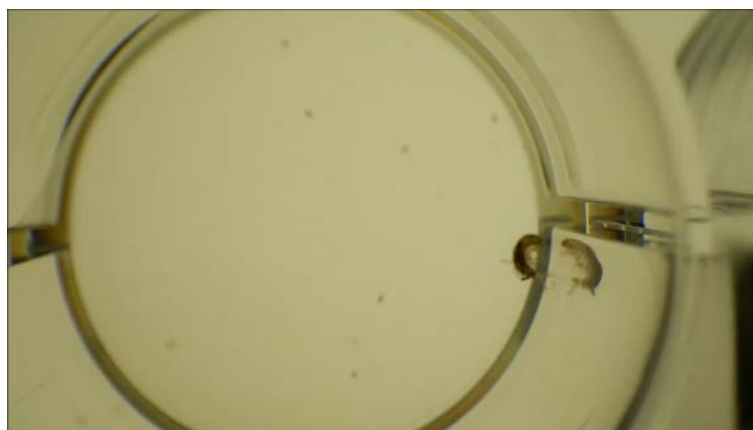


動画 4-2 正常個体（歩行）（光学顕微鏡観察）



動画 4-3 正常個体（歩行）（実体顕微鏡観察）

(3 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：7.04 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露)



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 4-4 営巣した正常個体（頭部を振る行動）（実体顕微鏡観察）

（3 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：10.3 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露、曝露期間中に 4 齢に脱皮）



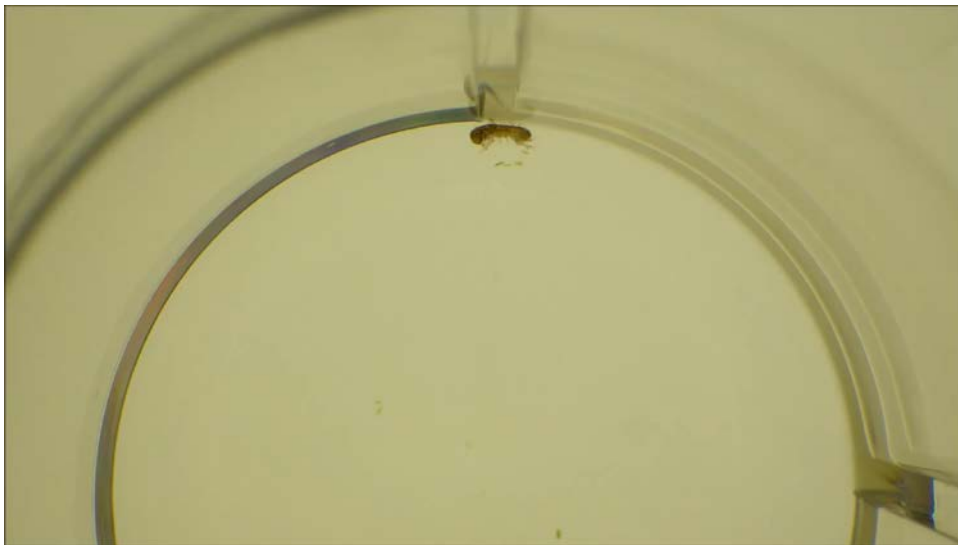
動画 4-5 営巣した正常個体（頭部を振る行動）（光学顕微鏡観察）

（3 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：19.4 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）

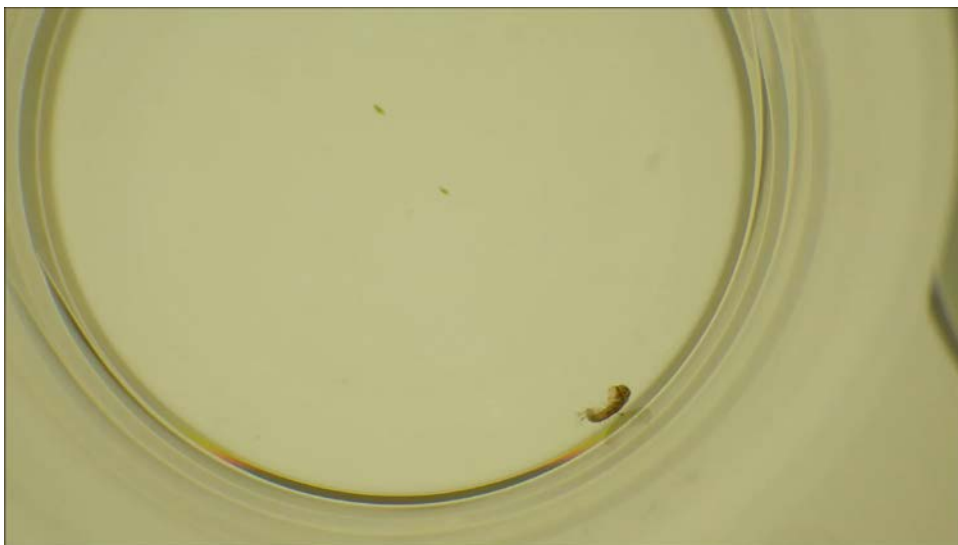


動画は本マニュアルのPDF版で閲覧できます。マニュアルのPDF版はWEBサイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 4-6 営巣した正常個体（刺激に対し反応あり）（実体顕微鏡観察）
（3 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：17.8 µg/L 48 時間曝露）



動画 4-7 営巣した正常個体（刺激に対し反応あり）（実体顕微鏡観察）
（3 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：助剤対照区 48 時間曝露）



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 4-8 営巣個体：不動の判定（刺激に対し反応なし）（実体顕微鏡観察）
（3 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：33.5 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）

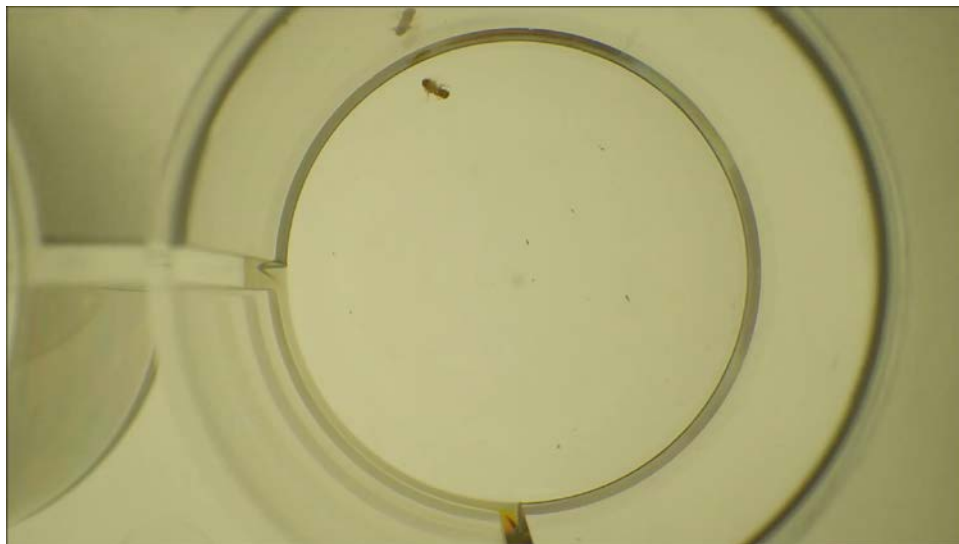


動画 4-9 営巣個体：不動の判定（光学顕微鏡観察）
（3 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：27.6 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）

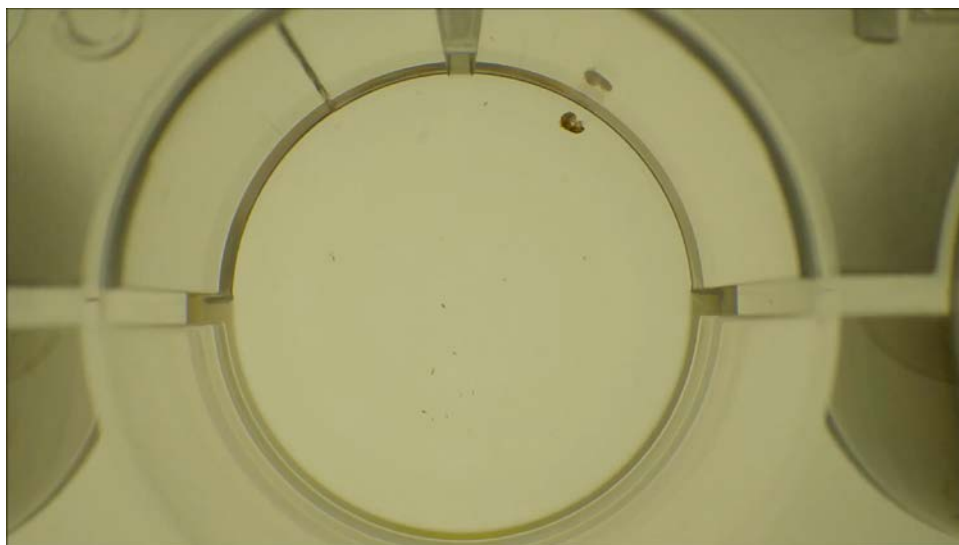


動画は本マニュアルのPDF版で閲覧できます。マニュアルのPDF版はWEBサイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 4-10 営巣していない正常個体
(水流刺激に対し屈伸開脚反応を示す) (実体顕微鏡観察)
(3 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：17.8 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露)



動画 4-11 営巣していない不動個体
(水流刺激に対し屈伸開脚反応せず) (実体顕微鏡観察)
(3 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：17.8 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露)



附属資料 4-E 試験期間中の連続光照射と被験物質の安定性に関する事例

2齢・3齢幼虫を用いた急性毒性試験法では、水面浮上を防止するため試験個体の正の走光性を利用して、曝露期間中に試験容器底面より連続光を照射する。被験物質によっては水中光分解性が高いものがあり、曝露期間中の濃度維持が問題となる。

ここでは、参考事例としてネオニコチノイド殺虫剤のクロチアニジンに対する曝露期間中の安定性を示す。「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料 クロチアニジン」 (<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/302clothianidin.pdf>) (2019年12月閲覧)によれば、その水中光分解半減期は1時間未満である。

クロチアニジンの試験は、本マニュアルに基づき2齢幼虫を試験個体として用い、2015年3月12日～14日に実施した。試験水中の被験物質濃度の分析結果のみ以下に示す。

濃度区	0時間目	48時間目	対開始時 (%)
対照区	検出限界未満	検出限界未満	—
助剤対照区	検出限界未満	検出限界未満	—
7.97	8.41	8.44	100
10.5	11.2	11.1	99.2
13.6	15.1	15.0	99.2
17.5	19.2	19.2	100
22.8	25.1	26.2	104
29.7	33.3	33.9	102

曝露期間中、試験容器底面より連続光照射していたにもかかわらず、被験物質は試験水中で安定だった(対開始時99.2～104%)。その他の幾つかのネオニコチノイド殺虫剤についても同様の傾向を示しており、本急性毒性試験法の光条件は、ネオニコチノイド系殺虫剤の安定性に大きな影響を及ぼさないと考えられる。

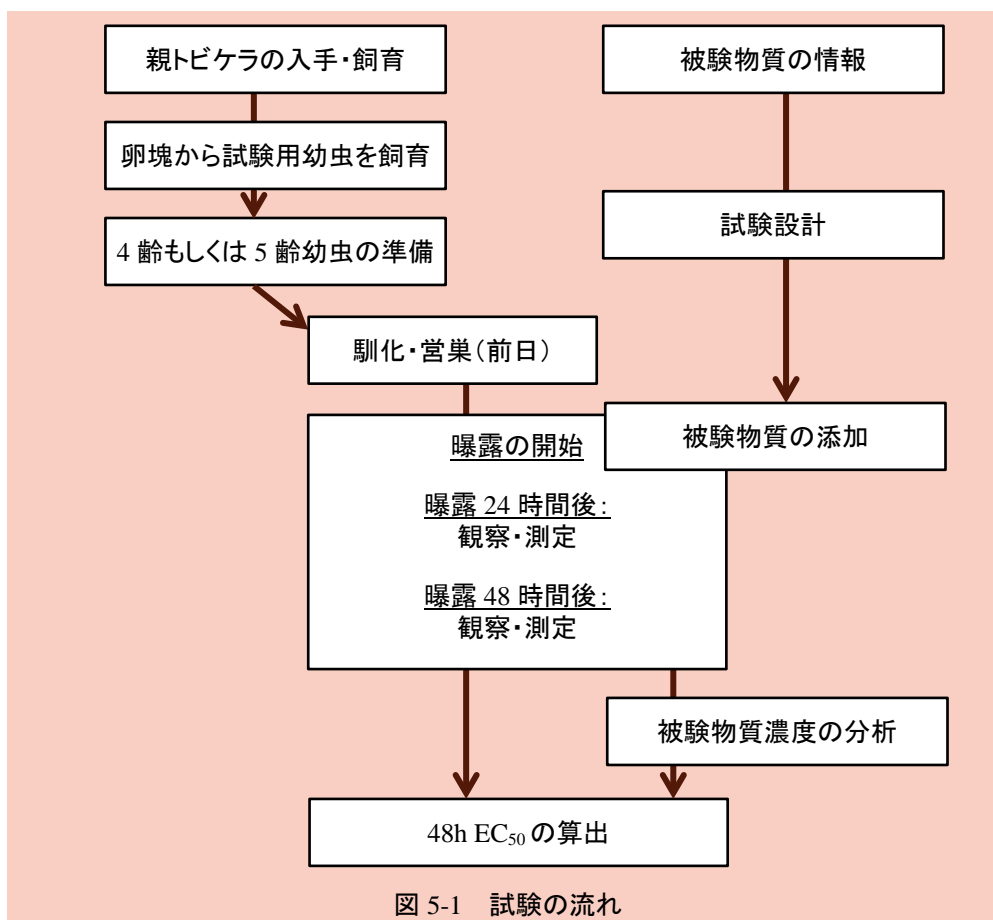
しかしながら、用いる光源の波長や殺虫剤の種類によっては曝露期間中に分解する可能性もあるため、試験を実施するにあたり試験条件下での被験物質の安定性や試験設計について事前に十分検討を行う必要がある(4-2. 被験物質)。

第5章 4 齢・5 齢幼虫を用いた 急性毒性試験法

コガタシマトビケラ 4 齢および 5 齢幼虫に対する農薬の影響を評価する試験法である。水生昆虫は成長に伴い化学物質に対する感受性が変化する可能性がある。本試験法は、コガタシマトビケラの生息環境を考慮して擬似的な流水環境下で実施する。本試験法を活用し、幼虫の成長に伴う感受性変動を評価することにより、より現実的な農薬の生態影響を評価することができる。

5-1. 試験概要

4 齢もしくは 5 齢幼虫を、数段階の濃度の被験物質に 48 時間曝露する。曝露期間中、試験水を回転攪拌し流水環境を再現する。曝露 24 時間および 48 時間後に試験個体の不動数を観察・記録し、48 時間曝露における半数影響濃度 (EC₅₀) を算出する (図 5-1)。



5-2. 被験物質

試験設計に必要となる被験物質の情報（水溶解度、オクタノール-水分配係数、水中安定性、純度等）や、試験水中の被験物質濃度の測定法および回収率・定量限界等の情報を収集・整備しておく。これらの情報を基に、試験水の調製法や試験容器等の試験設計を検討する。

5-3. 基準物質

基準物質を用いた試験を実施し、試験系・試験条件の妥当性を確認することが望ましい。基準物質としては、1 齢幼虫を用いた急性毒性試験のリングテストに用いられた塩化カリウムが挙げられる。また、コガタシマトビケラ幼虫を用いた急性毒性試験結果が文献等で公開されている場合は、その被験物質を基準物質として用いても良い（例えば、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用をもつ有機リン系殺虫剤フェントロチオンなど）。

5-4. 試験の妥当性

試験の妥当性基準は以下の通り

- 曝露期間中において対照区の不動率は 10 % を超えてはならない。
- 溶存酸素濃度は曝露期間中、飽和濃度の 60 % 以上でなければならない。

5-5. 試験方法

(1) 主な使用機器・器具類

試験容器には、ガラス製もしくは化学的に不活性な素材の容器を用いる。4 齢および 5 齢幼虫を試験個体とする場合は目視による試験観察が可能であり、実体顕微鏡による観察を前提とした若齢幼虫（1 齢～3 齢）の急性毒性試験法に比べ試験容器サイズの制約は少ない。目視観察のしやすさや、マグネチックスターラーにより擬似的な流水環境を再現する試験系であることを考慮し、ガラス製結晶皿や 1 L 容量のビーカーが試験容器として推奨される（図 5-2）。

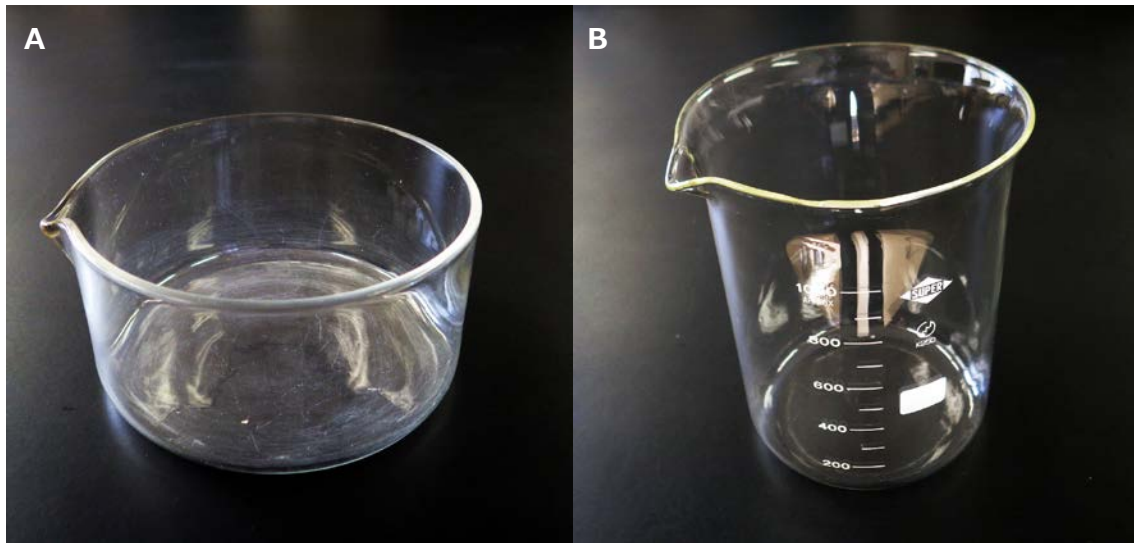


図 5-2 試験容器の例

A : ガラス製結晶皿 (直径 12 cm × 高さ 6 cm) .
 B : 1 L ガラス製ビーカー.

参考として農業環境変動研究センターで使用しているメーカー・型番を以下に記載したが、同等の機能を有していれば他製品でも使用可能である。ガラス製器具類等については、使用前に適切な方法で洗浄しておく。注記がない限り、4 齢・5 齢幼虫試験で共通の使用器具である。

<試験水の調製用>

残留塩素計： OYWT-31 (株式会社オーヤラックス)
 天 秤： AG245 (メトラー・トレド株式会社)
 ダイリユーター： MICROLAB[®] 500 SERIES (Hamilton)
 マイクロピペット： Eppendorf Research Plus (100)
 スターラー： MAGNETIC STIRRER REMIX RS-6D (アズワン株式会社)

<試験個体の準備用>

容 器： ガラス製結晶皿 (直径 12 cm × 高さ 6 cm)
 採 取 器 具： 昆虫ピンセット (4 齢用)
 ルーツェピンセット (5 齢用)
 実 体 顕 微 鏡： MZ75 (ライカマイクロシステムズ株式会社)

<曝露試験用>

曝露試験容器：	ガラス製結晶皿（直径 12 cm×高さ 6 cm）
底質：	ガラスビーズ（3 種類：粒径 7 mm、4 mm、0.6 mm）
温度計：	Thermo Recorder RTR-52（株式会社ティアンドデイ）
pH 計：	LAQUA twin（株式会社堀場製作所）
溶存酸素計：	NeoFox（OceanOptics 社）
温度制御装置：	試験温度を一定に維持できる恒温室、インキュベーター等の装置
スターラー：	MAGNETIC STIRRER REMIX RS-6D（アズワン株式会社） 20mm 回転子（4 齢用） 30mm 回転子（5 齢用）

（2）供試生物

■ 生物種

- ▶ コガタシマトビケラ (*Cheumatopsyche brevilineata*) を用いる。
- ▶ 供試生物は経歴（入手源、飼育方法等）の明らかなものを用いる。農業環境変動研究センターでは、2004 年より室内飼育系統を維持しており、卵塊の配布を行っている。
- ▶ 基準物質での半数影響濃度を確認することが望ましい。

■ トビケラの飼育

試験個体を得るための卵塊の入手・幼虫の飼育については、[第1章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

■ 生育段階

4 齢幼虫もしくは 5 齢幼虫を用いる。

頭幅を観察し齢期の判定を行う（[附属資料 5-A 各齢期の幼虫の頭幅](#)）。

2 齢以降の幼虫は、齢期が進むにつれ気管鰓数が増大するものの、基本的な外部形態は大きく変化しない（図 5-3D~F）。キチン板で覆われていない幼虫の腹部は、同一齢期の個体間でも肥大成長による変異が大きいため、幼虫の体サイズでは正確な齢期の判定はできない。したがって、齢期を適確に判別するためには頭幅を観察する。頭幅はおよそ 0.42 mm（3 齢）、0.65 mm（4 齢）、0.95 mm（5 齢）であり、齢期が進むにつれ 1.5 倍程度大きくなるため、目視で判別可能である（図 5-3A~C、[附属資料 5-A 各齢期の幼虫の頭幅](#)）。

■ 性質

河川におけるコガタシマトビケラ幼虫は、砂粒等の底質を用いて固着巣を作り、巣の入り口に捕獲網を展開して流下してきた餌を捕集・摂食して生活している。流水環境下で幼虫にガラスビーズを巣材として与えると、すみやかに固着巣を作る（図 5-4）。

目視による試験観察が可能な 4 齡以降の幼虫を試験個体とする本試験法は、曝露期間中試験水を回転攪拌して擬似的な流水環境を再現するとともに、幼虫に底質・巢材としてガラスビーズを与えて営巣させることで、より河川環境に近い状態で急性毒性評価が可能となる。

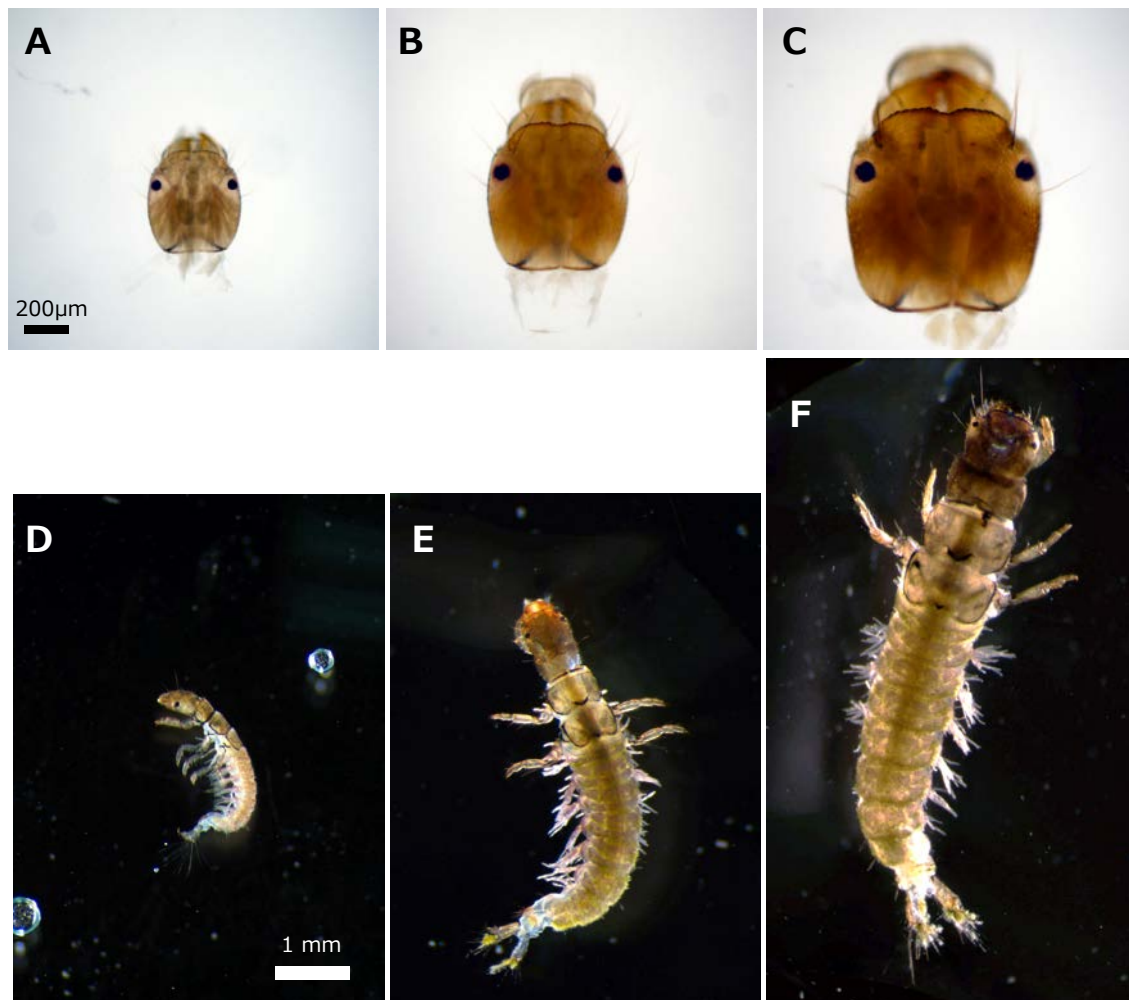


図 5-3 3 齡～5 齡幼虫の形態

A : 3 齡幼虫頭部, B : 4 齡幼虫頭部、C : 5 齡幼虫頭部。
D : 3 齡幼虫(全体), E : 4 齡幼虫(全体), F : 5 齡幼虫(全体) .

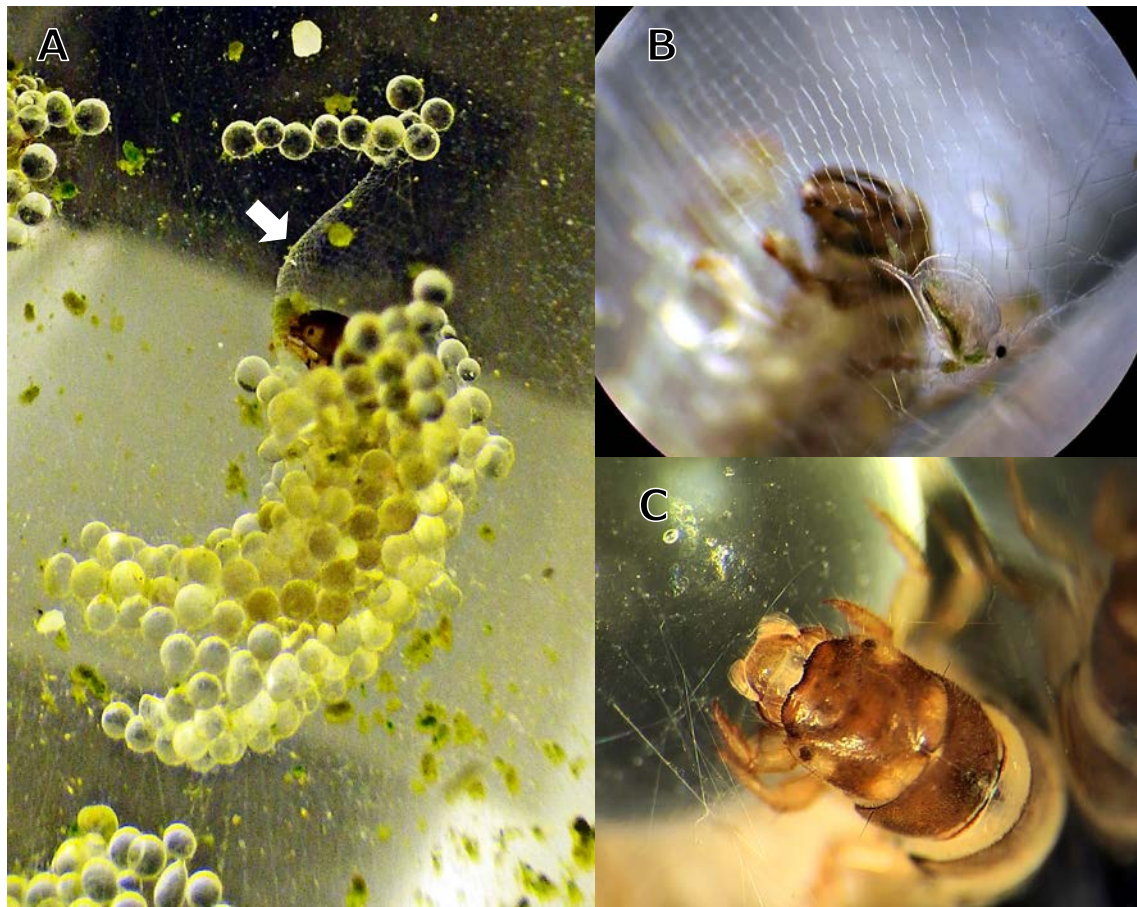


図 5-4 室内飼育環境下で営巣した 5 齢幼虫

- A : 固着巣の全体像（側面）。ガラスビーズを巣材としてトンネル状の巣を作り、入り口に捕獲網（矢印）を展開している。
- B : 捕獲網（拡大）。奥側にいるのが 5 齢幼虫。手前にミジンコが網に捕捉されている。
- C : 5 齢幼虫の正面。

■ 試験個体の準備

4 齢幼虫もしくは 5 齢幼虫の試験個体を得るために、卵塊から幼虫をふ化させて所定の齢期まで室内飼育する必要がある。飼育の方法は[第 1 章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照されたい。[附属資料 5-B 試験個体（4 齢および 5 齢幼虫）の準備事例](#)に毒性試験用の試験個体を得るための飼育事例を掲載する。

試験前日に、所定の齢期に達した幼虫が多い幼虫飼育水槽から試験個体を採取する。水槽の底に付着している固着巣の前後の入り口をピンセットで優しく刺激して幼虫を巣から追い出す。固着巣から這い出してきた幼虫を傷つけないようにピンセットで優しく摘み取り、飼育水を満たしたガラス製結晶皿（直径 12 cm）に入れる。このとき、ガラス製結晶皿には幼虫の足場と

なるような紙片を敷いておく¹ (図 5-5)。4 齢および 5 齢の判別は目視で可能だが、正確を期すため実体顕微鏡下で観察し、頭部のサイズを基に目的の齢期の幼虫を選別する (図 5-3、[附属資料 5-A 各齢期の幼虫の頭幅](#))。頭幅は齢期によって約 1.5 倍異なるので、齢期を容易に判定できる。自発的運動 (遊泳・歩行) をしている個体を試験個体とする。試験個体を取り扱うピンセットは幼虫を傷つけないように先端が尖っておらず、腰 (バネ) の柔らかなピンセットを用いる。

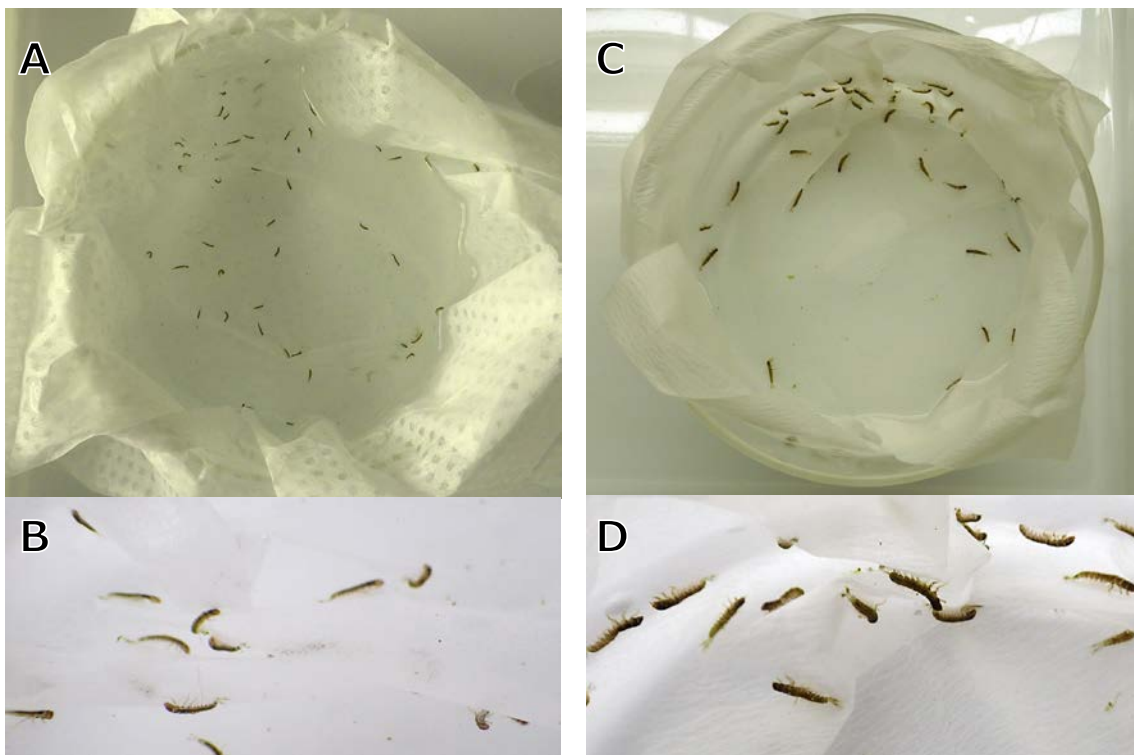


図 5-5 試験個体として採取した幼虫

- A : 4 齢幼虫。ガラス製結晶皿には三角コーナー用の紙製の水切り袋をかぶせ、飼育水で満たしてある。
 B : 水切り袋上を歩行する 4 齢幼虫 (拡大)。
 C : 5 齢幼虫。飼育水を満たしたガラス製結晶皿には紙片を敷いてある。
 D : 紙片上を歩行する 5 齢幼虫 (拡大)。

¹ 幼虫はしがみつくと足場がないと、幼虫同士で団子状に集まってしまい、噛みつき合うなどして負傷・衰弱する恐れがある。足場として紙片を入れておくと、これを回避できる。

(3) 曝露方法

止水式または半止水式により曝露試験を行う。

(4) 曝露期間

48 時間とする。

(5) 試験生物数および試験区の設定

■ 試験生物数

試験区ごとに少なくとも 20 個体の幼虫を使用する。

■ 試験区の設定

➤ 試験濃度区の設定

- ・等比級数的に少なくとも 5 濃度区を設ける。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。ただし、被験物質の性状により広い濃度範囲で影響が認められる場合はもっと大きな公比でも良い。
- ・試験濃度および濃度公比は、予備試験の結果を参考にして決定する。
- ・濃度範囲には、試験個体のすべてに影響が見られる濃度と全く影響が見られない濃度が少なくともそれぞれ 1 濃度、一部に影響が見られる濃度が少なくとも 2 濃度含まれることが望ましい。
- ・試験濃度の上限は 100 mg/L とする。ただし、被験物質の性状によりこれらの濃度の試験が困難な場合は技術的に可能な濃度を上限とする。上限濃度で被験物質の毒性によると考えられる影響がみられた場合は、これらの上限濃度以上の濃度区を設定し可能な限り EC₅₀ 値を求めることが望ましい。

➤ 対照区の設定

- ・被験物質を含まない無処理対照区を設ける。
- ・試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区も設ける。

(6) 試験個体の馴化

試験開始前日(12時間以上前)から、試験条件に試験個体を馴化させる。ただし、希釈水の攪拌速度は試験条件よりも低速とする。

■ 試験容器の準備

試験容器をスターラー上に設置する。試験容器とスターラーの間に白色板を敷くと、試験個体の観察がしやすくなる。底質として所定量のガラスビーズを試験容器に投入し、一定量の希釈水²を満たす。このとき、ガラスビーズが水面に浮くことがあるので、ピペットで希釈水を滴下して沈める。ガラスビーズの投入量は(8)試験条件を参照のこと。スターラーの回転辺縁部にガラスビーズが均一に分布するように、ルーツェピンセット等を使ってならず(図5-6)。次に回転子を入れ、試験条件よりも低速(100~150 rpm)³で希釈水を攪拌する。

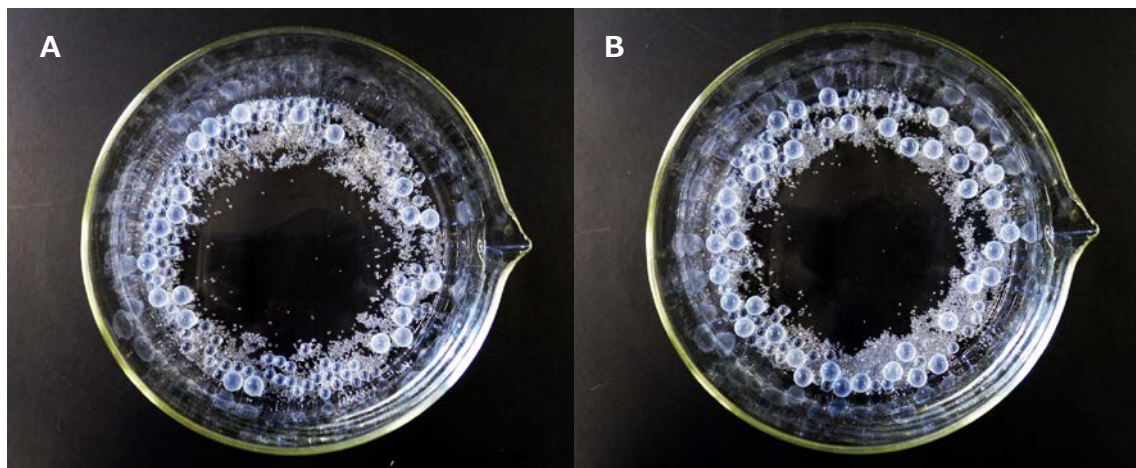


図5-6 試験容器に投入したガラスビーズ(容器の中心はスターラーの回転域になる)

- A : 4 齢幼虫用 (ガラスビーズ φ7 mm : 10g, φ4 mm : 8g, φ0.6 mm : 3g) .
 B : 5 齢幼虫用 (ガラスビーズ φ7 mm : 18g, φ4 mm : 5g, φ0.6 mm : 3g) .

² 試験水調製時の試験原液の添加量に合わせて、満たす希釈水量を適宜調整し、最終的な試験水量が全試験濃度区で同等となるようにする。1 試験容器あたり 20 個体の試験個体を収容する場合、最終的な試験水量は 400 mL である((8) 試験条件を参照のこと)。

³ 回転速度が低速の方が試験個体は営業しやすい。

■ 試験個体の投入

幼虫飼育水槽から採取し齢期を判別した試験個体を、ピンセットを用いて所定の個体密度になるように試験容器へランダムに投入し、試験開始までに試験容器底に営巣させる（図 5-7）。幼虫同士が団子状に絡まるのを防ぐため、数回に分けて試験個体を投入する。馴化期間中、希積水の蒸発を防止するために試験容器に蓋をしておく。

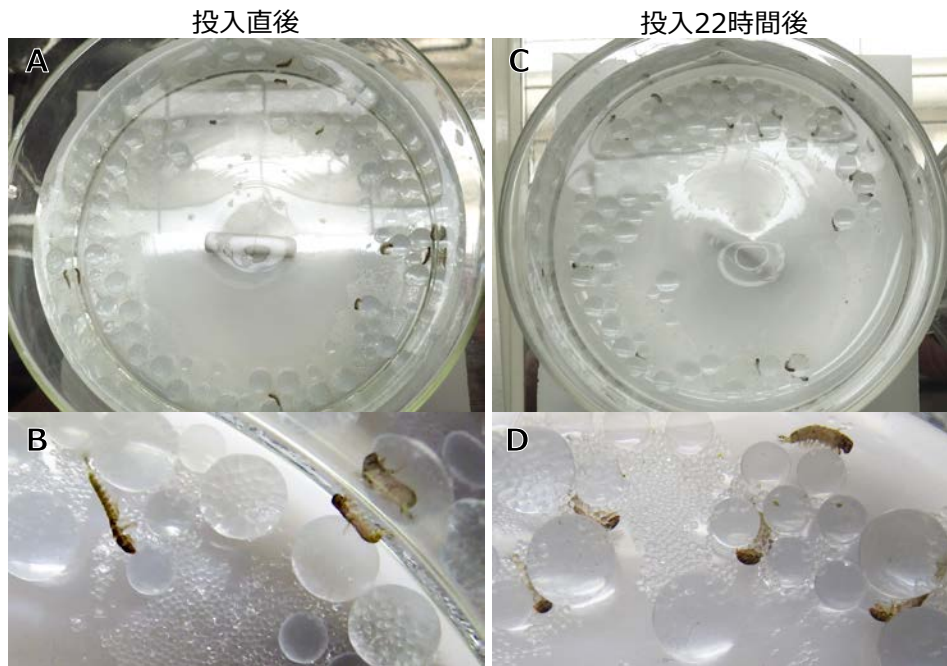


図 5-7 試験個体の馴化

- A : 試験個体投入直後の試験容器の様子。
- B : 投入直後の一部拡大写真。試験個体は営巣していない。
- C : 投入 22 時間後の試験容器の様子。
- D : 投入 22 時間後の一部拡大写真。ほぼ全ての試験個体が営巣している。

■ 試験開始前の確認

試験開始直前に、試験容器毎に営巣状態を確認・記録する。衰弱・瀕死等の症状がある個体および死亡個体は記録するとともに、試験開始前に除去する。営巣していない個体であって、正常と判断される個体は除去しない（判定基準は（9）観察と測定を参照のこと）。

次に、希積水の攪拌速度を試験条件と同じ速度まで徐々に増速させる⁴。

⁴ 急激に回転速度を上げると、回転子をはねる可能性がある。

(7) 曝露の開始 (試験水の調製)

試験個体を馴化させた試験容器に試験原液を直接添加して試験水を調製する。試験原液を添加した時点で曝露開始とする。調製法は以下の通りとする。なお、試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

- 易水溶性農薬の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験原液を調製する。曝露開始時に所要量の試験原液を試験容器に徐々に添加する。最終的な試験水量が全試験濃度区で一定となるように、馴化時の希釈水量を調整しておく。
- 難水溶性農薬の場合は、有機溶剤を助剤として用いて被験物質を機械的な手法により試験原液を調製する。助剤は供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ被験物質の性質を変えないものを用いる。1 齢幼虫に対する助剤の有害性情報が参考となる ([附属資料 5-C 各種助剤の 1 齢幼虫に対する急性毒性](#))。曝露開始時に所要量の試験原液を試験容器に直接添加して試験水を調製する。

上述の方法で設定濃度が適切に得られない場合は、被験物質を希釈水に設定濃度の 2 倍濃度となるように溶解させた試験原液を別途調製し、曝露開始時に所要量の試験原液を試験容器に徐々に添加し混和させる。目的の設定濃度となるように、馴化時の希釈水量を調整しておく。

- 助剤の試験水中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100 mg/L (又は 0.1 mL/L) を超えないことが望ましい。

(8) 試験条件

曝露の環境条件は以下の通りである。図 5-8 に 5 齢幼虫を用いた急性毒性試験事例を示す。

■ 試験水量

1 個体あたり 20 mL 以上とする (1 試験容器当たり 400 mL)。

試験水の蒸発を防止するため、曝露期間中は試験容器に蓋をする。

■ 試験個体密度

1 試験容器あたり 20 個体とする。スターラー等の試験設備に余裕がある場合は、1 試験容器あたり 10 個体とし 2 連に分けることが望ましい。

■ 底質

ガラスビーズを用いる。底質の重量は以下の通り。

- 1 試験容器当たり粒径 7 mm : 10 g、粒径 4 mm : 8 g、粒径 0.6 mm : 3 g (4 齢幼虫)
- 1 試験容器当たり粒径 7 mm : 18 g、粒径 4 mm : 5 g、粒径 0.6 mm : 3 g (5 齢幼虫)

■ 水温

設定濃度は 20℃とし、曝露期間中の変動範囲は±1℃以内とする。

■ 照明

12 時間～16 時間明期が望ましい。ただし、被験物質の水中光分解性が高い場合は暗所試験を実施しても良い。暗所でも試験個体は若齢幼虫のように水面に浮上しない。

■ 試験水の攪拌

曝露期間中、マグネチックスターラーを用いて試験水を回転攪拌する。回転速度は以下の通り。

- 200 rpm (4 齢幼虫)
- 300 rpm (5 齢幼虫)

■ 給餌

曝露期間中は給餌を行わない。

■ 希釈水

- 脱塩素水道水を用いる。
- 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まない水質であること。
- 使用前には十分に曝気するとともに、温度調整を行う。

■ 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、曝露期間を通して試験温度での飽和濃度の 60 % 以上を保つようにする。

■ pH

試験水の pH 調整は行わない。

■ 給気

曝露期間中は、試験水に給気しない。

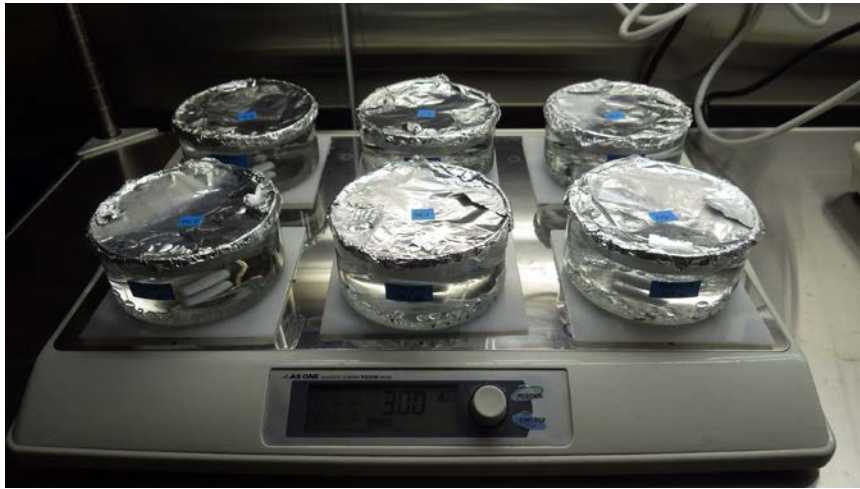


図 5-8 5 齢幼虫を用いた急性毒性試験風景

試験個体を観察しやすくするために、試験容器とスターラーの間に白色板を敷く。

(9) 観察と測定

■ 供試生物の一般状態の観察

曝露開始 24 時間後および 48 時間後における不動個体の有無について、目視で観察し記録する。不動個体の判定フローを（図 5-9 および[附属資料 5-D 試験個体の状態と不動の判定例](#)）に示す。

まず、試験個体が固着巣内か、巣外にいるか判定する⁵。

固着巣内の個体については、巣の入り口で頭部を振る行動（捕獲網に捕捉された食物粒子を集めるための採餌行動）⁶を自発的に示す場合は正常と判定する。前述の行動が確認されない営巣個体について、頭側もしくは尾肢側の巣の入り口をパスツールピペット等で優しく刺激した時に、速やかに身構えて体を縮めるような反応を示す場合は正常と判定する。刺激に対し上記のような反応を示さない場合は、被験物質の影響を受けた不動個体と判定する。

⁵ 試験個体が試験容器で営巣する場合、通常、大きなビーズの間に小さなビーズを絹糸でつなぎ合わせた固着巣を作る。また、試験容器壁面とビーズの間に絹糸のみで固着巣を作る場合がある。この場合、絹糸が見えづらいため、営巣個体かどうかを判定するときに十分注意する。

⁶ 巣内の正常個体であっても、頭部を静止していること場合がある。そのような個体については、しばらく観察していると頭部を振る行動を示す。

巢外にいる個体については、試験水の回転流に対して底質や試験容器壁面にしがみついて姿勢を維持している、または自発的な運動（歩行・体をくねらせて遊泳）により移動する個体は正常とする。上記の状態とは異なり、丸まっている・弛緩している等の個体についてはパスツールピペット等を用いて優しく触れて刺激を与えた時、前述の姿勢の維持や自発的な運動が確認されない場合は被験物質の影響を受けた不動個体と判定する。他個体から食害されて死亡が自明の個体も不動個体と判定し取り除く。

行動や外見に異常が確認された場合は記録する。その他、脱皮・蛹化等の事象も記録する。

■ 被験物質濃度の測定

- ▶ 農薬を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質濃度を少なくとも、曝露開始時（試験原液添加 10 分後）、曝露終了時、換水前および換水後に測定する。試験容器の中層から試験水を採取した試料を分析試料とする。
- ▶ 被験物質濃度は、曝露期間中、設定濃度の 80 % 以上であることが望ましい。

■ 環境条件の測定

- ▶ 試験に先立って希積水の水質を確認する。
- ▶ 各試験区における試験水の水温、溶存酸素濃度および pH を曝露開始時、曝露終了時、24 時間毎に測定する。半止水式試験の場合は換水前および換水後も測定する。また、曝露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

以上の試験操作について、図 5-10 に流れをまとめた。

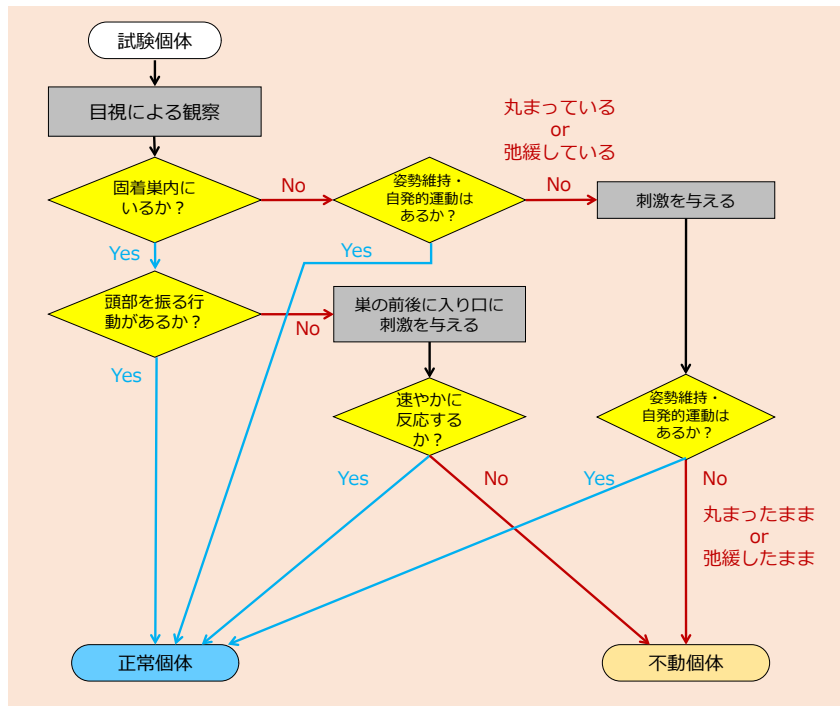


図 5-9 不動個体（影響個体）の判定フローチャート

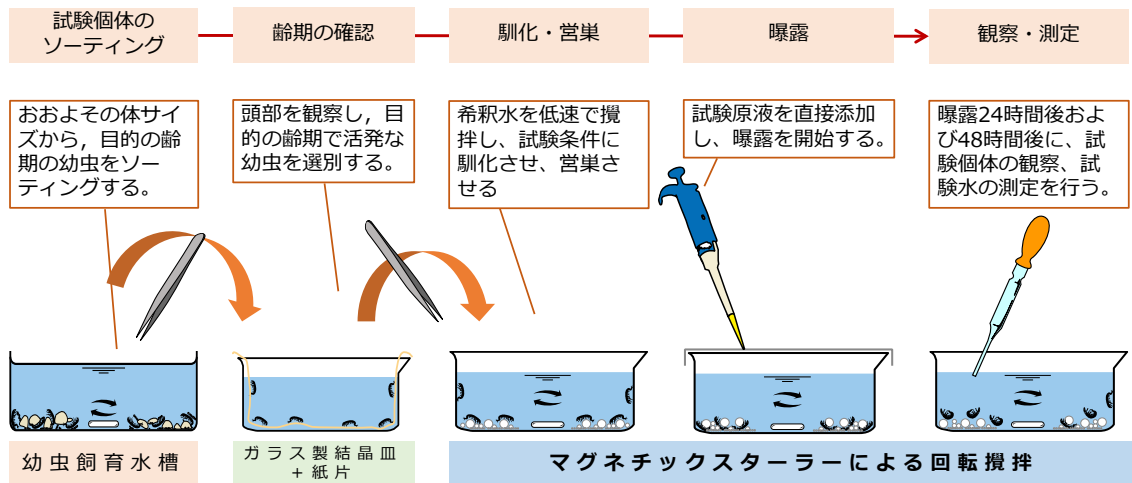


図 5-10 試験操作の流れ

5-6. 限度試験

5-5. 試験方法を用いて、被験物質のおおよその毒性を調べるために、被験物質濃度 100 mg/L もしくは被験物質の水溶解度が 100 mg/L 未満である場合はその水溶解度の濃度で限度試験を行ってもよい。限度試験には試験区・対照区ともに 20 個体の試験個体を用いる。試験終了時に試験区で不動個体が 10 %を超えたときは、5-5. 試験方法による本試験を行う。

5-7. 結果の処理法

各濃度における不動率の結果から、半数影響濃度 (EC₅₀) を計算する。

EC₅₀ を算出するにあたり、Finney の図解法、対数正規確率紙上での作図法、プロビット法、ロジット法等一般に用いられているいずれの方法でも良い。可能ならばプロビット法やロジット法を用い、95 %信頼限界も算出するとともに EC₁₀ を無影響濃度として報告する。ただし、無影響濃度については、EC₁₀ の代わりに 0 %影響最高濃度を報告しても良い。

被験物質濃度の測定値が設定濃度から ±20 %以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき EC₅₀ を算出する。

5 - 8 . 報告事項

試験報告書には次の項目について記載する。

- 1) 試験機関：名称、所在地
- 2) 試験責任者と試験担当者：氏名、所属および連絡先
- 3) 被験物質：化学物質の名称（一般名、商品名等も併記）、構造式（示性式、分子式及び分子量も併記）、入手先、製造年月日及びロット番号、純度及び不純物、水溶解度等の物性に関する資料、その他必須事項
- 4) 試験容器：製品名、材質、形状
- 5) 試験生物：
 - －種名（学名）および系統名
 - －由来（入手先）
 - －飼育方法（馴化中も含む。餌の種類と量、給餌頻度等）
- 6) 試験条件と方法：
 - －試験開始日、試験終了日および試験期間（本試験および予備試験の試験実施日も併記）
 - －試験温度
 - －希积水の入手源と水質
 - －試験水の状態（透明、白濁、沈殿等）、試験原液の保管方法および試験水への被験物質の添加法（助剤を用いた場合は、その名称・添加方法及び助剤濃度）
 - －試験容器あたりの試験水量および濃度区ごとの試験個体数
 - －濃度区の設定根拠および各濃度区の被験物質の濃度（設定値および実測値）
 - －光源の種類、光周期、照度
 - －試験期間中の溶存酸素濃度、pH の測定法
 - －試験結果の処理法
- 7) 試験結果：
 - －試験条件の測定値（試験温度、溶存酸素濃度、pH）
 - －被験物質濃度の分析結果
 - －各濃度区及び対照区の 24 時間後、48 時間後における不動数とその割合
 - －試験終了時の濃度－反応曲線を示す図
 - －EC₅₀ 値（可能であればそれらの 95 % 信頼限界）とその算出法
 - －可能であれば無影響濃度 (EC₁₀ 値) とその算出法 (代替として 0% 影響最高濃度でも良い)
 - －試験水の外観
 - －その他の観察された影響・事象およびそれらが認められた濃度

5-9. 用語の定義

- 限度試験：適切な濃度において毒性の有無を調べる試験。
- 予備試験：本試験実施に先立ち、試験条件・試験方法・試験濃度範囲を決定するために行う試験。
- 本試験：予備試験で得られた情報を基に、最終的な急性毒性値を求めるために行う試験。
- 試験水：試験生物を曝露するために用いる被験物質を含んだ水。
- 希釈水：試験水の調製に用いる被験物質を含まない水。
- 試験原液：試験水の調製に用いる被験物質を含む溶液。
- 被験物質：毒性試験に用いる農薬。
- 有効成分：農薬としての薬効を発揮するための主たる成分。
- 濃度：この試験では、添加濃度、実測濃度、設定濃度等の区別を明確にし、それを表示する。
- 濃度の単位：化学物質の濃度は重量/容量（ $\mu\text{g/L}$ あるいは mg/L ）で表記する。
- 助剤：試験水を調製するために用いる有機溶剤
- 曝露期間： EC_{50} 値を求めるために試験生物を試験水に曝露した期間
- 止水式試験：曝露期間中、試験水を交換しない試験。
- 半止水式試験：曝露期間中、一定期間ごとに試験水を試験容器ごと交換する試験。
- 不動：営巣個体においては、頭部を振る行動や刺激に対し身構える反応を示さない状態。営巣していない個体においては、遊泳・歩行などの自発的な運動がなく、回転流に対して姿勢維持ができない状態をいう。
- EC_{50} ：試験個体の 50 % に、不動をもたらすと算定される被験物質の濃度をいう。試験時間を明記し表記する。（例：48h EC_{50} ）
- 蓄養：入手した試験生物をそれまでの生息環境と大きく異ならない状態で飼育すること。あるいは、試験生物を試験環境と大きく異ならない状態で飼育すること。
- 固着巣：コガタシマトビケラ属の幼虫は、河川において、砂粒や植物片等を絹糸でつなぎあわせたトンネル状の巣を礫等に固着させて固着巣を作る。固着巣の入り口に捕獲網を展開し、流下してきた餌粒子を濾過して摂食する。

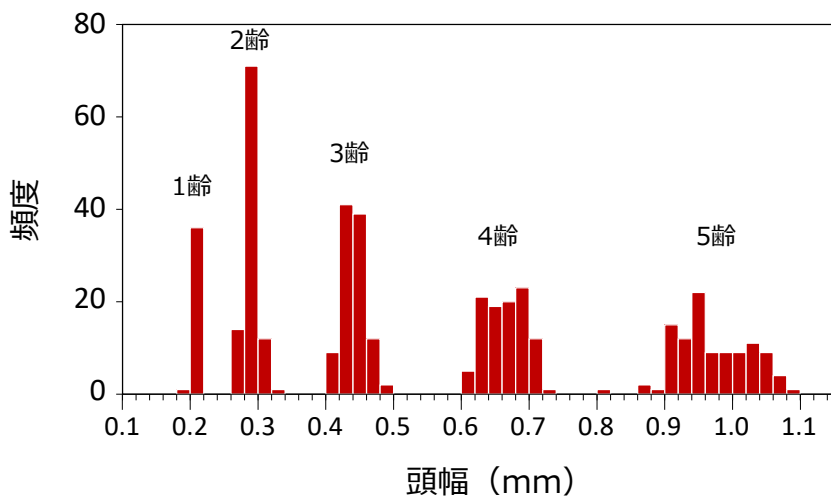
5-10. 参考文献

- Stuijzand, SC., Poort, L., Greve, GD., van der Geest, HG. And HS. Kraak (2000) Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: Taxon, development stage, and exposure time. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 582–587.
- 多田満 (2002) 回転流水式水槽を用いたシマトビケラ幼虫の営巣個体に対する殺虫剤の影響, *環境毒性学会誌*, 5, 13–19.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A useful new insecticide bioassay using first-instar larvae of a net-spinning caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of Pesticide Science*, 34, 13–20.
- Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains. *Journal of Pesticide Science*, 34, 21–26.
- Yokoyama, A., Hamaguchi, K., Ohtsu K., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) A method for mass-rearing caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Iwata)(Trichoptera: Hydropsychidae), as a new test organism for assessing the impact of insecticides on riverine insects. *Applied Entomology and Zoology*, 44, 195–201.
- 横山淳史 (2017) 生物個体群の回復性と成長による感受性の変動を考慮した毒性評価の試みーコガタシマトビケラの室内個体群動態モデルを活用してー, *日本農薬学会誌*, 42, 112–118.

5-11. 附属資料

附属資料 5-A 各齢期の幼虫の頭幅

農業環境変動研究センターで維持されている室内飼育系統から各齢期の幼虫を採取し、80%アルコールで固定した。実体顕微鏡下でタングステン針やピンセットを用いて、アルコール固定した幼虫の頭部を胸部から切断した。光学顕微鏡で頭部を観察し、接眼マイクロメーターを用いて最大となる頭部の幅を測定して mm 単位に換算した。



頭幅の頻度分布は5つの山に明確に区別された（ヒストグラム図）。4 齢および5 齢幼虫の平均頭幅は各々0.647 および 0.953 mm であり、若齢幼虫に比べると比較的個体差が大きい。頭幅の成長比は約 1.5 であり（脱皮の度に頭幅が 1.5 倍に増大することを意味する）、4 齢以降になると目視により頭のサイズで齢期を明確に区別することができる。

各齢期のコガタシマトビケラ幼虫の頭幅データ

齢	測定数	平均(mm)	標準偏差	変動係数%	頭幅の成長比
1 齢	37	0.187	0.004	2.1	—
2 齢	98	0.272	0.010	3.6	1.45 (2 齢/1 齢)
3 齢	103	0.420	0.016	3.8	1.55 (3 齢/2 齢)
4 齢	102	0.647	0.032	4.9	1.54 (4 齢/3 齢)
5 齢	104	0.953	0.050	5.3	1.47 (5 齢/4 齢)

附属資料 5-B 試験個体（4 齢および 5 齢幼虫）の準備事例

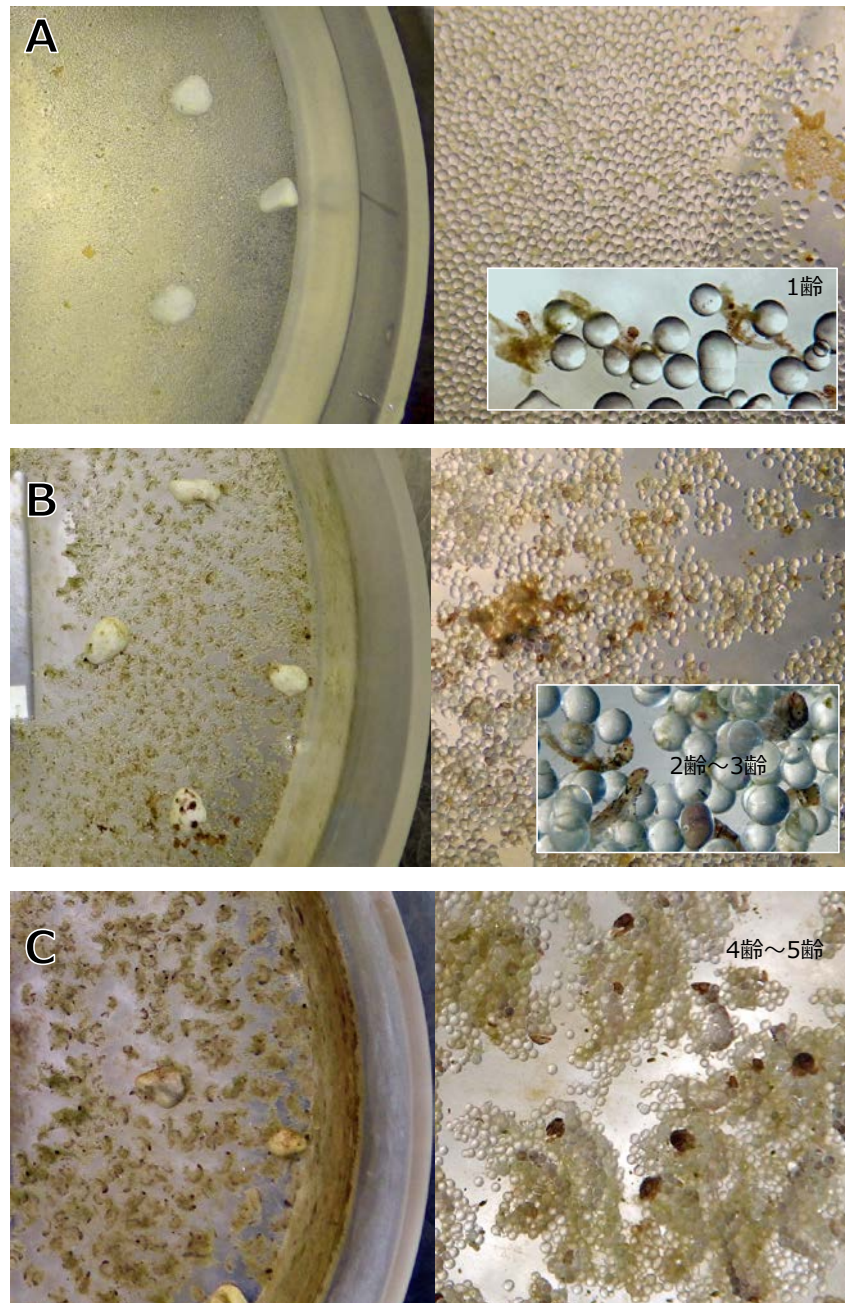
コガタシマトビケラ幼虫の成長は個体間差が大きい。ガラス製結晶皿（直径 12 cm）を飼育容器として用い、水温 20℃の室内環境において 1 齢幼虫（50 匹）の飼育実験を行ったところ、各齢期が初確認された日数（ふ化からの経過日数）は約 10 日（2 齢）、約半月（3 齢）、約 3 週間（4 齢）、1 ヶ月前後（5 齢）および 2 ヶ月前後（蛹）であった。これは成長が速い個体のケースにあたる。しかし前述の通り、成長の個体間差が大きいため、各齢期の平均的な期間（ふ化もしくは脱皮から次の脱皮までの期間）は 1 齢、2 齢、3 齢、4 齢および 5 齢で、各々 15.1 日、10.5 日、11.0 日、37.7 日および 71.7 日であった。したがって、この飼育実験では、ふ化から蛹化するまでの平均的な所要日数は 146 日であった。所要日数は飼育個体密度、給餌量や餌の質によって大きく変動すると考えられる。このような成長のバラツキは試験個体の確保に不利だが、下記の飼育事例のようにある程度の規模で飼育すれば、十分な試験個体を確保することができる。

2016 年 6 月 10 日に幼虫飼育容器（直径 30 cm のアクリル円形水槽）を準備し、6 月 13 日～25 日にかけて計 94 個の卵塊を飼育容器に投入した。6 月 16 日から適量のテトラフィン粉末等を毎日給餌した。7 月 3 日には 4 齢を、7 月 7 日には 5 齢幼虫をそれぞれ目視で初めて確認した。7 月 18 日以降、容易に確認できるほど 5 齢幼虫が増加したので、7 月 25 日に、毒性試験の供試個体とし 105 個体の 5 齢幼虫を飼育容器から採取した。

月 日	飼育記録
6/10	幼虫飼育容器の準備 飼育水は常時掛け流し、通気
6/13	卵塊の投入開始
6/16	給餌開始（毎日、テトラフィン粉末等）
6/24	2 齢幼虫を初確認
6/25	卵塊の投入終了（計 94 個投入）
6/28	3 齢幼虫を初確認
7/3	4 齢幼虫を初確認
7/7	5 齢幼虫を初確認
7/11	4 齢幼虫 増加
7/17	蛹を初確認
7/18	5 齢幼虫 増加
7/25 (後略)	試験用に 5 齢幼虫を 105 個体採取、成虫（♂）を初確認 (後略)

*飼育法については、[第 1 章 コガタシマトビケラの入手法・室内飼育法](#)を参照のこと。

幼虫飼育容器の準備から5 齢幼虫を用いた毒性試験を実施できるまでに要した日数は45 日であった。この事例では、4 齢幼虫を用いた毒性試験は実施しなかったが、7 月11 日（31 日目）以降は試験が可能であったと考えられる。この飼育事例では、94 個の卵塊を2 週間近くにかけて投入したが、投入卵塊数を増やし投入期間を短くすれば、本事例よりも所要日数を短縮することができると考えられる。



幼虫飼育容器の様子

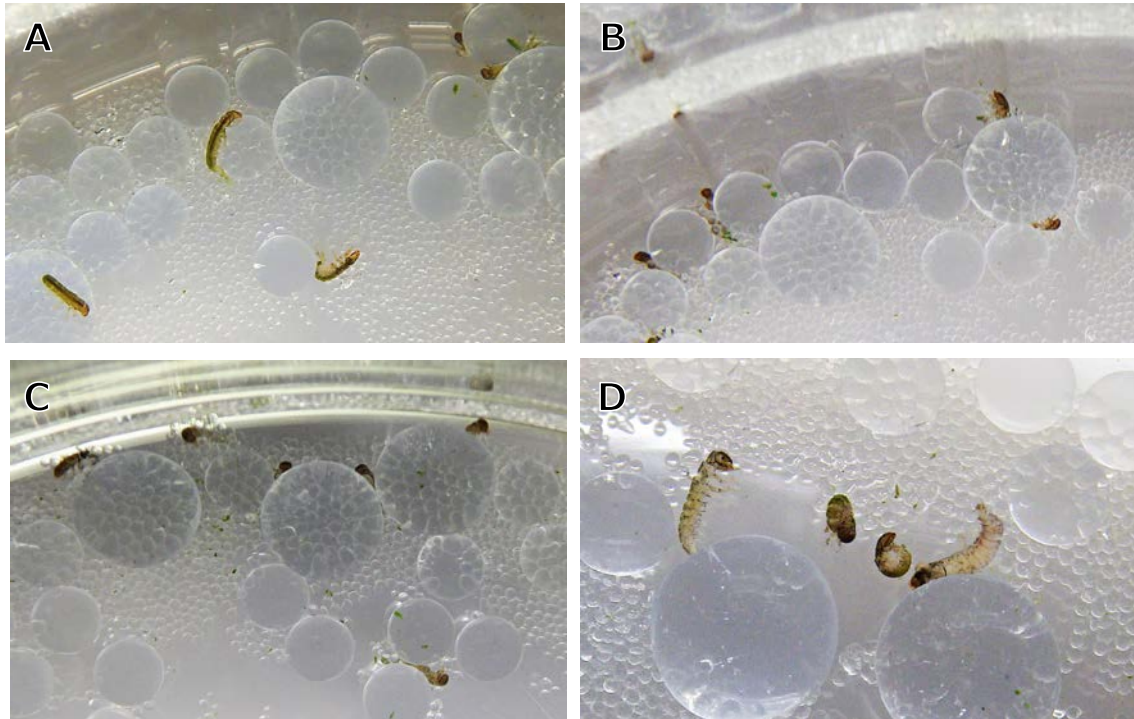
A：飼育開始7 日後， B：26 日後， C：43 日後。

附属資料 5-C 各種助剤の1 齢幼虫に対する急性毒性

助剤名	NOEC (%, v/v)	48h EC50 (%, v/v)	95%信頼限界
アセトン	2.0	5.3	4.7~6.0
メタノール	1.7	2.1	—
エタノール	0.41	1.0	0.87~1.2
DMF	0.34	0.52	—
DMSO	0.65	1.1	—
Tween 20	0.63	2.9	2.5~3.4

アセトン、メタノールは NOEC および 48h EC₅₀ 値が高く、コガタシマトビケラに対し最も毒性の低い助剤であった。毒性の観点からはアセトン、メタノールが助剤として推奨されるが、被験物質の物性や保存安定性等の条件も考慮して助剤を決定する。

附属資料 5-D 試験個体の状態と不動の判定例



4 齡幼虫を用いた急性毒性試験

- A：馴化開始直後。まだ、試験個体は固着巣を作っていない。
- B：馴化 21 時間後。多くの試験個体は固着巣内にいる。
- C：ジノテフラン急性毒性試験（助剤対照区 曝露 48 時間後）。多くの試験個体は固着巣内にいる。
- D：ジノテフラン急性毒性試験（33.8 $\mu\text{g/L}$ 曝露 48 時間後）。巣外の丸まった個体と弛緩した個体。

動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 5-1 営巣した正常個体（頭部を振る行動）

（4 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：助剤対照区 48 時間曝露）



動画 5-2 営巣した正常個体（頭部を振る行動）と巢外の不動個体（弛緩）

（4 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：33.8 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 5-3 巢外の不動個体（丸まっている）

（4 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：50.6 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露）



動画 5-4 営巣した正常個体（頭部を振る行動）

（5 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：馴化後・曝露開始前）



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 5-5 営巣した正常個体（頭部を振る行動）
（5 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：対照区 24 時間曝露）



動画 5-6 営巣した正常個体（頭部を振る行動・ただし緩慢な動作）
（5 齢幼虫ジノテフラン急性毒性試験：33.8 $\mu\text{g/L}$ 24 時間曝露）



動画は本マニュアルの PDF 版で閲覧できます。本マニュアルの PDF 版は WEB サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niaes/contents/manuals.html> から入手できます。

動画 5-7 営巣していない正常個体（歩行して自発的に移動）
 (5 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：50.7 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露)



動画 5-8 営巣していない不動個体 3 個体（矢印：姿勢の維持ができない）
 またこの試験では、巣内の個体も不動個体と判定された。
 (5 齢幼虫クロチアニジン急性毒性試験：114 $\mu\text{g/L}$ 48 時間曝露)



第6章 資料編

6-1. リングテスト結果

コガタシマトビケラ成長段階別毒性試験法のうち、第2章の「[卵を用いた毒性試験法](#)」および第3章の「[1齢幼虫を用いた急性毒性試験法](#)」について、3つの外部機関と連携してリングテストを実施した。ここではその結果概要を解説する。

リングテストに協力した外部機関については機関A、B、Cと、農業環境変動研究センターについては自機関と表記する。リングテストは各機関に配布した試験法マニュアル「卵を用いた毒性試験法（ドラフト版）」および「1齢幼虫を用いた急性毒性試験法（ドラフト版）」に基づき実施した。リングテストに供した試験個体は、農業環境変動研究センターから卵塊の状態で作成済みもしくは直接持ち込みにより配布した。配布した系統は茨城県石岡市野田の河川を起源として2004年に確立された室内飼育系統である。その他、リングテストに使用する試験容器等の消耗品類および被験物質は機関の間で共通とし、農業環境変動研究センターから各機関に配布した。リングテスト実施後、各機関からリングテストの生データを取り寄せ、農業環境変動研究センターが半数影響濃度（EC₅₀）の計算を一括して行い、比較検証した。EC₅₀は、被験物質の設定濃度と総合影響率（卵を用いた毒性試験）もしくは不動個体率（1齢幼虫を用いた急性毒性試験）からロジット法により算出した。算出には統計ソフト SAS ver.9.4 の probit procedure を用いた。各機関におけるリングテスト実施概要を表6-1に示す。

表 6-1 リングテストの実施概要

卵を用いた毒性試験（E4期卵）	実施時期
機関A	2018年1月18日～30日
自機関（反復試験1）	2018年1月21日～2月2日
自機関（反復試験2）	2019年2月10日～23日
自機関（反復試験3）	2019年2月10日～23日
自機関（反復試験4）	2019年2月10日～23日
卵を用いた毒性試験（E7期卵）	実施時期
機関B	2018年2月27日～3月9日
機関C	2017年11月28日～12月8日
自機関	2018年1月21日～28日
1齢幼虫を用いた急性毒性試験	実施時期
機関A	2018年1月18日～20日
機関B	2018年2月20日～22日
機関C	2017年11月28日～30日
自機関	2017年9月27日～29日

(1) 卵を用いた毒性試験法のリングテスト結果

卵を用いた毒性試験法のリングテストでは、2つの発生段階（E4期およびE7期）の卵を用いた毒性試験を実施した（表6-1）。各機関が実施したリングテストの曝露条件を表6-2に示す。曝露条件は各機関に配布したマニュアルに基づいて決定されており、試験水量や照明等の一部の条件で差異があるが、マニュアルに記載された条件からの逸脱はない。

表6-2 各機関の曝露条件

被験物質	ジフルベンズロン標準品 (純度96.8%, Lot.No. 801H7205, 関東化学株式会社)	
供試生物	コガタシマトビケラ卵 (E4期およびE7期)	
設定水温	20℃	
試験容器	ガラス製ビーカー (300–500mL容量)	
試験個体数	20卵/試験区	
試験水量	機関A	200mL
	機関B	300mL
	機関C	200mL
	自機関	500mL
設定濃度	各機関が予備試験に基づいて設定	
濃度公比	各機関が予備試験に基づいて設定	
対照区	被験物質および助剤を添加しない試験区	
助剤対照区	助剤としてアセトン0.1mL/Lのみを添加した試験区	
換水条件	止水式	
曝露期間	48時間	
環境条件		
曝気	なし	
給餌	なし	
照明	機関A	16h明期・8h暗期
	機関B	暗所
	機関C	24h明期
	自機関 (反復試験1)	16h明期・8h暗期
	自機関 (反復試験2–4)	12h明期・12h暗期
pH調製	なし	
試験水の攪拌	70rpm	

* 被験物質、供試生物、照明装置は農業環境変動研究センターより共通のものを配布

被験物質には、コガタシマトビケラ卵に対し毒性の強い殺虫剤ジフルベンズロンを選定し、農業環境変動研究センターが同一 Lot 番号の標準品を一括購入して各機関へ冷蔵しながら宅配便で配布した。設定濃度や濃度公比は、各機関で実施された予備試験結果に基づいてそれぞれ設定された。助剤については、すべての機関でアセトンが使用され、助剤濃度（0.1 mL/L）も共通であった。

E4 期卵を用いたリングテストは機関 A および自機関で実施した。特に、自機関では反復試験を 4 回行い、同一機関における結果のバラツキを検証した。E7 期卵を用いたリングテストは機関 B、C および自機関で 1 回実施し、機関間のバラツキを検証した。

表 6-3 から表 6-7 に E4 期卵を用いたリングテストの試験結果を示す。設定濃度 0.2～1.26 µg/L の範囲でリングテストが実施されており、濃度依存的なふ化阻害が観察され、総合影響率はふ化阻害率とほぼ同じであった。対照区の背景異常卵率および総合影響率はそれぞれ 10 % を超えておらず、試験の妥当性基準を満たしていた。

表 6-3 リングテスト結果（E4 期卵・機関 A）

設定濃度 (µg/L)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.26	20	0	0
0.36	20	5	5
0.5	20	13	14
0.7	20	20	20
0.98	20	20	20

表 6-4 リングテスト結果（E4 期卵・自機関-反復試験 1）

設定濃度 (µg/L)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.2	20	0	0
0.31	20	0	0
0.5	20	10	10
0.79	20	16	17
1.26	20	20	20

表 6-5 リングテスト結果 (E4 期卵・自機関-反復試験 2)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.2	20	0	0
0.31	20	0	0
0.5	20	8	9
0.78	20	18	20
1.25	20	20	20

表 6-6 リングテスト結果 (E4 期卵・自機関-反復試験 3)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.2	20	0	0
0.31	20	2	2
0.5	20	11	11
0.78	20	19	19
1.25	20	19	19

表 6-7 リングテスト結果 (E4 期卵・自機関-反復試験 4)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.2	20	0	0
0.31	20	3	4
0.5	20	14	14
0.78	20	19	19
1.25	20	18	20

表 6-8 から表 6-10 に E7 期卵を用いたリングテストの試験結果を示す。設定濃度 0.13~10 $\mu\text{g/L}$ の範囲でリングテストが実施された。おおまかな傾向として、1 $\mu\text{g/L}$ 以下の試験区では殆どふ化阻害が起こらなかった。ふ化個体に注目すると、1 $\mu\text{g/L}$ 以上の試験区において多くの個体に異常が認められ、結果的に総合影響率は濃度依存的となった。対照区の背景異常卵率および総合影響率はそれぞれ 10% を超えておらず、試験の妥当性基準を満たしていた。

表 6-8 リングテスト結果 (E7 期卵・機関 B)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.13	20	0	0
0.25	20	1	1
0.5	20	1	6
1	20	1	19
2	20	2	20
4	20	11	20

表 6-9 リングテスト結果 (E7 期卵・機関 C)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	1
助剤対照区	20	0	0
0.313	20	0	4
0.625	20	1	9
1.25	20	2	9
2.5	20	2	16
5	20	10	18
10	20	12	18

表 6-10 リングテスト結果 (E7 期卵・自機関)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験卵数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	20	0	0
助剤対照区	20	0	0
0.2	20	0	0
0.31	20	0	1
0.5	20	0	11
0.79	20	0	17
1.26	20	1	20

表 6-11 および表 6-12 に、上記のデータから算出した EC_{50} を示す。E4 期卵を用いたリングテストにおいて、農業環境変動研究センターの 4 回の反復試験の平均 EC_{50} (±標準偏差) は、0.46 (±0.06) $\mu\text{g/L}$ で、最大値/最小値は 1.3 であった。機関 A と農業環境変動研究センターの間の最大値/最小値比は 1.4 であり、自機関内で見られた比とほぼ同じ値であった。E7 期卵を用いたリングテストでは、機関間の最大値/最小値比は 1.7 であった。以上のように、 EC_{50} 値の機関内および機関間の変動幅はほぼ同じであり 2 倍を超えなかった。これは、OECD テストガイドライン 202 (ミジンコ類急性遊泳阻害試験) における重クロム酸カリウムに対する感受性変動の許容範囲である EC_{50} : 0.6–2.1 mg/L (最大値/最小値比 3.5 に相当) と比べ変動幅が小さく、リングテストの参画機関が少ないという課題は残るものの、用いる卵の発生段階にかかわらず再現性の高い毒性試験法であることが示唆された。

表 6-11 E4 期卵を用いたリングテストの半数影響濃度

実施機関	EC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	95%信頼限界
機関A	0.43	0.39–0.48
自機関 (反復試験1)	0.55	0.48–0.63
自機関 (反復試験2)	0.43	0.38–0.49
自機関 (反復試験3)	0.46	0.40–0.54
自機関 (反復試験4)	0.40	0.35–0.47
自機関内の平均 (±標準偏差)	0.462 (±0.062)	
全体の平均 (±標準偏差)	0.456 (±0.055)	

表 6-12 E7 期卵を用いたリングテストの半数影響濃度

実施機関	EC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	95%信頼限界
機関B	0.57	0.48–0.69
機関C	0.98	0.60–1.43
自機関	0.64	0.56–0.74
平均 (±標準偏差)	0.731 (±0.216)	

リングテスト実施時の試験水の水質等のデータを表 6-13 から表 6-17 に示す。水温は 19.5–21.1 $^{\circ}\text{C}$ 、pH は 7.20–8.25、溶存酸素濃度は 6.8–9.24 mg/L の範囲でリングテストが実施されており、マニュアルの試験条件 (水温および pH の変動範囲はそれぞれ $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内および 1.5 未満で、溶存酸素濃度も飽和濃度の 60% 以上) からの逸脱はなかった。

表 6-13 曝露時の水質データ (E4 期卵・機関 A)

設定濃度(μg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.5-20.3	7.6-8.2	8.7-8.8
助剤対照区	19.5-20.3	7.6-8.2	8.7-8.8
0.26	19.5-20.3	7.7-8.2	8.6-8.8
0.36	19.5-20.3	7.6-8.2	8.6-8.8
0.5	19.5-20.3	7.7-8.2	8.5-8.8
0.7	19.5-20.3	7.6-8.2	8.5-8.8
0.98	19.5-20.3	7.6-8.2	8.5-8.8

表 6-14 曝露時の水質データ (E4 期卵・自機関-反復試験 1) *

設定濃度(μg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L) **
対照区	19.9-20.6	7.8-8.1	8.85
助剤対照区	20.1-20.9	8.0-8.1	8.82
0.2	19.9-20.8	8.0-8.1	8.80
0.31	20.0-20.9	8.1-8.1	8.80
0.5	19.9-21.1	8.1-8.1	8.80
0.79	19.9-21.0	8.1-8.2	8.78
1.26	19.9-20.5	8.1-8.2	8.82

* E7 期卵・自機関のリングテストと共通のデータ

** 曝露終了時にのみ測定

表 6-15 曝露時の水質データ (E4 期卵・自機関-反復試験 2~4 共通)

設定濃度(μg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	20.1-20.3	7.7-7.8	8.63-9.22
助剤対照区	20.3-20.5	7.7-7.8	8.62-9.24
0.2	20.1-20.3	7.7-7.8	8.63-9.16
0.32	20.1-20.5	7.8-7.8	8.62-9.15
0.5	20.1-20.5	7.8-7.9	8.63-9.13
0.78	20.3-20.7	7.9-8.0	8.68-9.14
1.25	20.3-20.5	7.8-7.9	8.64-9.12

表 6-16 曝露時の水質データ (E7 期卵・機関 B)

設定濃度(μg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.5-20.4	7.7-7.8	6.8-7.4
助剤対照区	19.6-20.5	7.6-7.8	7.0-7.7
0.12	19.6-20.5	7.6-7.8	7.0-7.7
0.24	19.5-20.5	7.6-7.8	7.1-7.8
0.47	19.7-20.4	7.6-7.8	7.2-7.7
0.97	19.7-20.5	7.6-7.8	7.1-7.8
2	19.8-20.5	7.6-7.8	7.2-7.7
4	19.9-20.5	7.6-7.8	7.2-7.6

表 6-17 曝露時の水質データ (E7 期卵・機関 C)

設定濃度(μg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.8-21.3	7.24-8.22	8.79-8.84
助剤対照区	20.0-21.3	7.22-8.08	8.78-8.85
0.313	20.0-21.1	7.20-7.91	8.75-8.88
0.625	19.6-21.1	7.20-8.25	8.77-8.79
1.25	19.8-21.2	7.20-7.82	8.78-8.92
2.5	19.8-21.2	7.21-8.21	8.76-8.93
5	19.8-21.2	7.24-7.79	8.76-8.94
10	19.7-21.2	7.27-8.17	8.76-8.92

(2) 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法のリングテスト結果

1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法のリングテストは各機関でそれぞれ 1 回実施された（表 6-1）。各機関が実施したリングテストの曝露条件を表 6-18 に示す。曝露条件は各機関に配布したマニュアルに基づいて決定されており、マニュアルに記載された条件からの逸脱はなかった。

表 6-18 各機関の曝露条件

被験物質	塩化カリウム (純度99.9%, Lot.No. LKM6575, 和光純薬工業株式会社)
供試生物	コガタシマトビケラ1齢幼虫 (ふ化24時間以内)
設定水温	20℃
試験容器	ポリスチレン製48穴マルチディッシュ (Thermo SCIENTIFIC)
試験個体数	20個体/試験区 (1個体/穴×20穴)
試験水量	30mL/試験区 (1.5mL/穴×20穴)
設定濃度	各機関が予備試験に基づいて設定
濃度公比	各機関が予備試験に基づいて設定
対照区	被験物質を添加しない試験区
換水条件	止水式
曝露期間	48時間
環境条件	
曝気	なし
給餌	なし
照明	白色LEDイルミネーター (トレビュアーA4-500、トライテック社) を用いて試験容器底面から連続照明
pH調製	なし

* 被験物質、供試生物、試験容器、照明装置は農業環境変動研究センターより共通のものを配布

被験物質には化学的に安定な塩化カリウムを選定した。塩化カリウムは OECD テストガイドライン 235 (ユスリカ幼虫急性毒性試験) の国際リングテストにおいて被験物質として用いられており、今回実施したコガタシマトビケラのリングテスト結果との比較検証が可能である。各機関が同一 Lot 番号の試薬を被験物質として使用できるように、農業環境変動研究センターが塩化カリウム試薬を購入して小分け配布した。設定濃度や濃度公比は、各機関で実施された予備試験結果に基づいてそれぞれ設定された。

表 6-19 から表 6-22 にリングテストの試験結果を示す。設定濃度 0.625～10 g/L の範囲でリングテストが実施されており、濃度依存的な不動個体数の増加が観察された。対照区の不動率は 10 % を超えておらず試験の妥当性基準を満たしていた。対照区の水面浮上率については一部のリングテストで基準を満たしていなかった（機関 A は試験報告書に言及がなく不明。自機関で行ったリングテストでは対照区の水面浮上率が 10 % であった）。機関 B および C のリングテストでは対照区の水面浮上率が 10 % を超えておらず試験の妥当性基準を満たしていた。

表 6-19 リングテスト結果（機関 A）

設定濃度 (g/L)	試験 個体数	不動個体数	
		24時間	48時間
対照区	20	0	0
2.6	20	0	0
3.6	20	2	5
5.0	20	3	8
7.0	20	20	20
9.8	20	20	20

表 6-20 リングテスト結果（機関 B）

設定濃度 (g/L)	試験 個体数	不動個体数	
		24時間	48時間
対照区	20	0	0
0.63	20	0	0
1.3	20	1	4
2.5	20	3	4
5	20	2	7
10	20	20	20

表 6-21 リングテスト結果（機関 C）

設定濃度 (g/L)	試験 個体数	不動個体数	
		24時間	48時間
対照区	20	0	0
0.625	20	0	0
1.25	20	0	0
2.5	20	0	0
5	20	4	10
10	20	20	20

表 6-22 リングテスト結果（自機関）

設定濃度 (g/L)	試験 個体数	不動個体数	
		24時間	48時間
対照区	20	0	0
2.6	20	0	0
3.6	20	0	1
5.1	20	4	7
7.1	20	20	20
10	20	20	20

表 6-23 に、上記のデータから算出した EC₅₀ を示す。EC₅₀ の平均値（±標準偏差）は 4.85 g/L（±0.377）であった。最大値は農業環境変動研究センターの 5.3 g/L、最小値は機関 B の 4.4 g/L であった。したがって、機関間の最大値／最小値比は 1.3 であった。OECD が 2010～2011 年にかけて実施したユスリカ幼虫急性毒性試験の国際リングテスト（14 機関が参画、被験物質は塩化カリウムおよび 3,5-DCP）の結果では、塩化カリウムの EC₅₀ の平均値（±標準偏差）は 1.37 g/L（±0.492）であり、最大値は 2.185 g/L、最小値は 0.33 g/L、最大値／最小値比は 6.6 であった（外れ値 4.664 g/L）。ユスリカの場合は国際リングテストであり、コガタシマトビケラの場合は国内リングテストで参画機関も少ないことから単純比較はできないが、コガタシマトビケラの 1 齢幼虫を用いた急性毒性試験法は、試験結果の変動が小さく再現性の高い試験法であることが示唆された。

表 6-23 1 齢幼虫を用いたリングテストの 48 時間半数影響濃度

実施機関	EC ₅₀ (g/L)	95%信頼限界
機関A	4.8	4.3—5.3
機関B	4.4	3.3—6.0
機関C	5.0	4.9—5.1
自機関	5.3	4.8—5.7
平均（±標準偏差）	4.85（±0.377）	

リングテスト実施時の試験水の水質等のデータを表 6-24 から表 6-27 に示す。水温は 19.1—22.2℃、pH は 7.14—8.1、溶存酸素濃度は 7.0—9.05 mg/L の範囲でリングテストが実施された。各リングテスト別にみると、マニュアルの試験条件（水温および pH の変動範囲はそれぞれ±1℃以内および 1.5 未満で、溶存酸素濃度も飽和濃度の 60%以上）からの逸脱はなかった。

表 6-24 曝露時の水質データ（機関 A）

設定濃度(g/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.9-20.2	7.9-8.1	8.7-8.8
2.6	19.9-20.2	8.0-8.1	8.8-8.8
3.6	19.9-20.2	8.0-8.1	8.8-8.8
5.0	19.9-20.2	8.0-8.0	8.8-8.8
7.0	19.9-20.2	7.9-8.0	8.8-8.8
9.8	19.9-20.2	7.9-8.0	8.8-8.8

表 6-25 曝露時の水質データ（機関 B）

設定濃度(g/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.3-20.9	7.6-7.8	7.2-7.4
0.63	19.2-20.8	7.4-7.7	7.1-7.2
1.3	19.2-20.8	7.5-7.7	7.1-7.2
2.5	19.2-20.9	7.4-7.7	7.0-7.2
5.0	19.2-20.9	7.4-7.7	7.0-7.4
10	19.1-20.9	7.3-7.6	7.0-7.6

表 6-26 曝露時の水質データ（機関 C）

設定濃度(g/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	20.1-21.8	7.34-7.74	8.85-9.05
0.625	20.1-21.8	7.27-7.65	8.83-8.97
1.25	20.0-21.7	7.27-7.63	8.85-8.92
2.5	19.9-22.2	7.25-7.53	8.84-9.01
5.0	19.8-22.2	7.20-7.42	8.98-8.87
10	19.9-22.2	7.14-7.35	8.81-9.00

表 6-27 曝露時の水質データ（自機関）

設定濃度(g/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)
対照区	19.9-20.0	7.8-8.1	7.55-8.46
2.6	19.8-20.0	7.9-8.0	7.33-8.50
3.6	19.8-20.2	7.9-8.0	7.05-8.53
5.1	19.8-20.2	7.8-8.0	6.85-8.54
7.1	20.0-20.0	7.8-8.0	6.72-8.51
10	19.9-20.0	7.7-7.9	6.60-8.46

6-2. 卵を用いた毒性試験における殺虫剤の適用事例

農薬に対する従来の生態影響評価では水生昆虫の卵期は評価対象ではなく、水生昆虫卵に対する農薬の影響についてはまだ未解明な点が多い。今回開発した第2章「[卵を用いた毒性試験法](#)」は、これまで考慮されてこなかった卵期に対する毒性評価を可能とする新しい試験法であるため、どのような種類の殺虫剤に対してこの試験法が有効なのか（換言すると卵の感受性が高いのか）、試験法の適用性（パフォーマンス）を明らかにする必要がある。

そこで、殺虫剤抵抗性対策委員会（IRAC）による殺虫剤の分類リスト（ver.9.3）に基づいて作用機作の異なる殺虫剤14剤を選び、卵を用いた毒性試験を実施した。具体的には、標準品を被験物質とし、各剤に対して3つの異なる発生段階（E1、E4 および E7 期）の卵を用いて48時間曝露の毒性試験を実施し、総合影響率で半数影響濃度の算出を試みた。次に、試験法の適用性について、その被験物質の水溶解度未満で明瞭な濃度-反応関係が確認され半数影響濃度を算出可能な場合を「+」、そうでない場合を「-」と評価した。表6-28に各種殺虫剤に対する試験法の適用性の評価結果を示す。IRACコードが7C、10B、15~18 および 23 の剤は、成長を阻害する殺虫剤に分類される。IRACコードが1B、3A および 4A は神経系に作用する殺虫剤、28 は筋肉に作用する殺虫剤である。

脱皮ホルモン受容体アゴニストの剤は水溶解度付近の設定濃度で曝露を行っても影響は確認されなかった。その他の殺虫剤では濃度依存的なふ化阻害が観察された。また、ふ化した場合でも、ふ化個体の形態異常、不動化、死亡等の影響が観察された。感受性が高い発生段階は殺虫剤の種類によって異なっていた（表6-28）。神経系に作用する殺虫剤（IRACコード：1B、3A および 4A）に対しては、胚発生が進んだE7期卵の感受性が最も高かった。成長を阻害する殺虫剤のうち、IRACコード16 および 17 の剤に対しては発生早期のE1期卵が、7C、10B および 15 の剤に対しては発生中期のE4期以降の卵が高感受性であった。IRACコード23 および 28 の剤については、発生段階による感受性の変動は小さかった。このような剤は曝露期間を延長すると半数影響濃度が低下する傾向があった（data not shown）。以上のように、卵を用いた毒性試験法は多くの作用機作の剤に適用可能である。また、試験を実施する際は、高感受性の発生段階が殺虫剤によって異なる可能性があることに留意する必要がある。

表 6-28 各種殺虫剤に対する卵を用いた毒性試験法の適用性

殺虫剤の種類	供試剤	卵を用いた毒性試験	症 状	高感受性の発生段階	(参考) ミジンコ類遊泳阻害試験
7C 幼若ホルモン類似剤	・ピリプロキシフェン	+	・胚の著しい形態異常 ・濃度依存的ふ化阻害	E4	+
10B ダニ類成長阻害剤	・エトキサゾール	+	・濃度依存的ふ化阻害 ・ふ化個体の形態異常	E4、E7	+
15 キチン生合成阻害剤タイプ0	・ジフルベンスロン	+	・濃度依存的ふ化阻害 ・ふ化個体の形態異常	E4、E7	+
16 キチン生合成阻害剤タイプ1	・ナプロフェジン	+	・濃度依存的ふ化阻害 ・ふ化個体の死亡	E1	-
17 脱皮阻害剤 (ハ工目昆虫)	・シロマジン	+	・胚の形態異常 ・濃度依存的ふ化阻害	E1	-
18 脱皮ホルモン受容体アゴニスト	・テブフェノジド ・メトキシフェノジド	-	・現在のところ影響を与える剤は確認されていない	なし	-
23 アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤	・スピロメシフェン	+	・胚の著しい形態異常 ・濃度依存的ふ化阻害 ・ふ化個体の死亡	E1、E4、E7	-
1B AChE阻害剤	・フェニトロチオン	+	・濃度依存的ふ化阻害	E7	+
3A Na ⁺ チャンネルモジュレーター	・エトフェンブロックス	+	・濃度依存的ふ化阻害	E7	+
4A nAChR アロステリックモジュレーター	・イミダクロプリド ・クロチアニジン ・ジノテフラン	+	・濃度依存的ふ化阻害	E7	+*
28 リアノジン受容体モジュレーター	・クロラントラニプロール	+	・濃度依存的ふ化阻害 ・ふ化個体の不動化	E1、E4、E7	+

*ジノテフランについてはオオミジンコの半数影響濃度は超値

参考までに、表 6-28 にミジンコ類遊泳阻害試験の適用性も掲載した。卵を用いた毒性試験を実施した 14 剤について、環境省の「水産動植物の被害防止に係る農薬登録基準」(<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html>) (2019 年 12 月閲覧) で公開されている資料からオオミジンコの遊泳阻害試験結果を調べ、卵を用いた毒性試験の適用性基準と同様に、その被験物質の水溶解度未満で明瞭な濃度-反応関係が確認され半数遊泳阻害濃度を算出可能な場合を「+」とした。卵を用いた毒性試験とオオミジンコの遊泳阻害試験で適用性が異なったのは、成長を阻害する殺虫剤 (IRAC コード: 16、17 および 23) であった。これらの剤は、オオミジンコよりもコガタシマトビケラ卵に対して相対的に毒性が強かった。卵期は胚発生の過程で形態形成がさかんな成長段階であり、成長を阻害する殺虫剤の影響を受けやすいと考えられることから、特に、昆虫成長制御剤のような殺虫剤の生態影響評価において有効な試験法になると期待される。

6-3. 成長段階別毒性試験の事例

現行の水生生物（ミジンコ、ユスリカ幼虫など）を用いた生態影響試験では、試験個体の入手しやすさ、試験操作上の取り扱いやすさ等の制限から、特定の成長段階・個体サイズのみで試験が実施されている。これらの成長段階・個体サイズは一般化学物質に対する感受性が高い傾向にあり、比較的安全側にたったリスク評価を行っているとされている。しかし、農薬のような特殊な作用機作をもつ化学物質については、成長に伴う感受性の変化に関する知見が少ない。したがって、既存の生態影響試験が必ずしも高感受性の成長段階で実施されているとは限らず、その生態リスクが過小評価される可能性がある。農耕地から河川を通して水域生態系に流出することが多い農薬について、より適切な生態リスクを評価するためには、河川に生息する水生生物種を用いた成長段階別に毒性評価を行い、知見を集積しておく必要がある。

ここでは、開発したコガタシマトビケラ成長段階別毒性試験法を用いて、作用機作が異なる3種の殺虫剤の毒性を評価し、作用機作の違いによって成長に伴う感受性の変動パターンがどのように異なるのかを調査した。具体的には、キチン生合成阻害剤のジフルベンズロン（IRACコード：15）、ネオニコチノイド系殺虫剤のクロチアニジン（同4A）、ジアミド系殺虫剤のクロラントラニリプロール（同28）の標準品を被験物質とし（表6-29）、第2章から第5章の試験法マニュアルにしたがい各成長段階の試験個体に2日間曝露して半数影響濃度を算出した。卵を用いた毒性試験については、これらの作用機作の殺虫剤に感受性が高いE7期卵（表6-28）を供試した。

表 6-29 被験物質の情報

試薬名	純度	Lot番号	メーカー
ジフルベンズロン標準物質	99.6%	AWF1024	WAKO
クロチアニジン標準物質	99.8%	AWQ4883	WAKO
クロラントラニリプロール標準品	> 98%	EPF0146	WAKO

(1) ジフルベンズロンの試験結果

キチン生合成阻害剤のジフルベンズロンの試験結果を表6-30から表6-35に示す。試験水中被験物質濃度は、曝露開始時および終了時に試験水試料を採取しLC-MS/MSにより定量した。表中の解析濃度は被験物質の実測濃度の幾何平均値を示し、半数影響濃度の算出に使用した。すべての試験を通して、設定濃度に対する解析濃度は81～172%、水温は19.4～22.0℃、pHは7.8～8.2の範囲であった。なお、本試験では溶存酸素濃度は測定していない。1齢から5齢幼虫を用いた急性毒性試験は、被験物質の水溶解度（80μg/L、25℃）付近における限度試験として実施

し、卵を用いた毒性試験は予備試験結果に基づき5段階の曝露濃度を設定して実施した。4齢幼虫および5齢幼虫を用いた急性毒性試験を除き、いずれの試験水においても無色透明で、沈殿もしくは浮遊物は確認されなかった。4齢幼虫および5齢幼虫試験の試験区の試験水は、無色透明で沈殿は確認されなかったが、曝露開始直後から水面浮遊物が観察された。4齢幼虫および5齢幼虫試験の試験水を試験容器の中層から採取し分析した結果、曝露開始時からほぼ設定濃度で維持されていた。このことから、卵期試験個体は溶解状態の、幼虫期試験個体はおおむね飽和溶解状態の被験物質に曝露されたと推測される。

E7期卵を用いた毒性試験では1.03 µg/Lの試験区まで顕著なふ化阻害は観察されなかったが、濃度依存的にふ化個体の胸部の膨張・脚の異常が観察された(表6-30、図6-1)。脚に異常があるふ化個体は脚の運動機能に障害があり、屈伸開脚反応を示さないため不動と判定された。

1齢～5齢幼虫では被験物質による顕著な毒性症状は確認されなかったが(表6-31～表6-35)、2齢幼虫を用いた急性毒性試験の試験区で2個体の死亡が観察された。死亡した個体のうち1個体は脱皮途中であり、脱皮後硬化せず脱皮部位が白色のまま死亡していた。2齢および3齢幼虫の毒性試験では試験系に底質がないため営巣個体の割合は低かったが、試験容器にガラスビーズを底質として与えた4齢および5齢幼虫の毒性試験では、多くの試験個体が営巣しており、被験物質の曝露による出巢反応は観察されなかった。

表6-36に各成長段階の半数影響濃度を示す。表中の感受性比は、各成長段階のEC₅₀値/最小のEC₅₀値比である。ジフルベンズロンに対しては卵の感受性が特に高く、成長に伴う感受性比は290倍以上となった。これは形態形成がさかんな卵期はキチン生合成が活発であり、ジフルベンズロンによって生合成が阻害されたために大きく影響を受けたと考えられる。幼虫期の試験において水溶解度付近の高濃度で曝露したにもかかわらず影響がほとんど観察されなかったのは、試験個体が脱皮期ではなくキチン生合成が低下していたためにジフルベンズロンの影響を受けにくかったと推測された。

表 6-30 E7 卵を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	ふ化阻害卵数	総合影響数
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
0.2	0.248	20	0	2
0.3	0.350	20	0	2
0.45	0.608	20	0	6
0.68	0.797	20	2	18
1.03	1.26	20	0	20

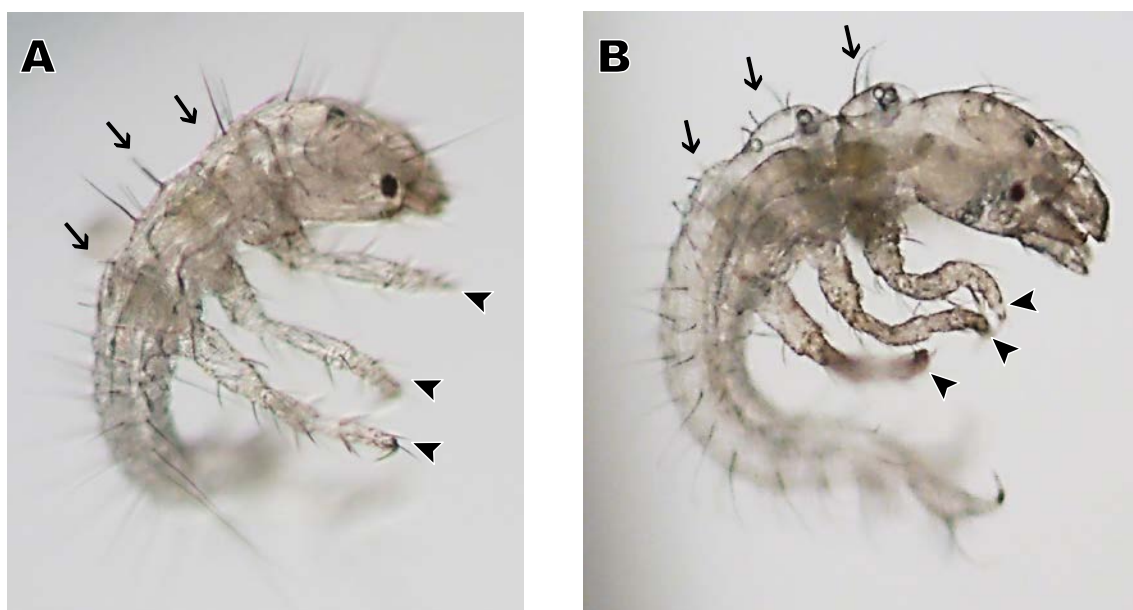


図 6-1 E7 期卵を用いた毒性試験のふ化個体

A : 対照区, B : 設定濃度 1.03 µg/L の試験区.

→は前胸・中胸・後胸を示す. >は前脚・中脚・後脚を示す.

1.03 µg/L 試験区のふ化個体は胸部が膨張し, 脚が黒ずみ関節が機能していない.

表 6-31 1 齢幼虫を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	不動個体数	
			24時間	48時間
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
100	172	20	0	0

表 6-32 2 齢幼虫を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	13	5	0	0
助剤対照区	—	20	13	6	1	1
100	106	20	14	5	1	2

表 6-33 3 齢幼虫を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	4	0	0	0
助剤対照区	—	20	7	1	0	0
100	81.0	20	0	2	0	0

表 6-34 4 齢幼虫を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	19	20	0	0
助剤対照区	—	20	17	15	0	0
100	113	20	17	17	0	0

表 6-35 5 齢幼虫を用いた毒性試験結果 (ジフルベンズロン)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	20	18	0	2
助剤対照区	—	18	17	17	1	1
100	99.7	20	20	20	0	0

表 6-36 ジフルベンズロンの各成長段階に対する半数影響濃度

成長段階	EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	95%信頼限界	感受性比
E7期卵	0.589	0.504—0.681	1
1齢幼虫	> 172		> 292
2齢幼虫	> 106		> 181
3齢幼虫	> 81.0		> 137
4齢幼虫	> 113		> 193
5齢幼虫	> 99.7		> 169

(2) クロチアニジンの試験結果

神経系に作用するネオニコチノイド系殺虫剤のクロチアニジンの試験結果を表 6-37 から表 6-42 に示す。曝露開始時および終了時に試験水試料を採取し、LC-MS/MS により被験物質を定量した。表中の解析濃度は被験物質の実測濃度の幾何平均値を示し、半数影響濃度の算出に使用した。すべての試験を通して、設定濃度に対する解析濃度は 98.2~130 %、水温は 19.9~21.9°C、pH は 7.7~8.2 の範囲であった。なお、本試験では溶存酸素濃度は測定していない。いずれの試験水においても無色透明で、沈殿もしくは浮遊物は確認されず、試験個体は溶解状態の被験物質に曝露されたと考えられた。

被験物質による毒性症状としては、E7 期卵では濃度依存的なふ化阻害が観察された(表 6-37)。また、一部のふ化個体では脚が正常に機能せず屈伸開脚反応を示さないため不動と判定された。1 齢~3 齢幼虫期では被験物質の曝露により、屈伸開脚反応を示さない個体が濃度依存的に確認された(表 6-38~表 6-40、第 4 章の附属資料 4-D を参照のこと)。4 齢および 5 齢幼虫期では、正常な個体は底質を用いて営巣するが、被験物質の影響を受けた個体の多くは出巢して瀕死の状態になっていた(表 6-41 および表 6-42、第 5 章の附属資料 5-D を参照のこと)。また、高濃度曝露区では巣内において瀕死の状態となる個体も一定程度確認された。1 齢から 5 齢幼虫期に確認された毒性の諸症状は、河川に生息する本種にとっては非意図的な流下の原因となり、致死的影響に等しいと考えられる。

表 6-43 に各成長段階の半数影響濃度を示す。表中の感受性比は、各成長段階の EC₅₀ 値/最小の EC₅₀ 値比である。クロチアニジンに対して 1 齢幼虫が最も高感受性だった。E7 卵期は作用点である神経系が完成しておらず感受性が低かったと考えられる。2 齢幼虫以降は成長に伴い感受性は低下した。Yokoyama ら (2009)¹はネオニコチノイド系殺虫剤のイミダクロプリドに対するコガタシマトビケラの成長に伴う感受性の変動を調査し、1 齢、2 齢、3 齢、4 齢および 5 齢幼虫のイミダクロプリドに対する 48 時間 EC₅₀ を各々 6.64、11.6、21.7、22.0 および 37.9 μg/L (感受性比 5.7 倍) と報告している。今回の被験物質も同様の傾向を示し、成長に伴う感受性比は 5.6 倍であった。Böttger ら (2012)²は、ヨコエビの一種 *Gammarus roeseli* に対するイミダクロプリドの室内毒性試験を実施し、体長 6 mm の試験個体の方が、体長 11 mm の個体よりも感受性が高いことを報告している。一方、ヒラタカゲロウの一種 *Epeorus assimilis* では、体長 3 mm と 7.5

¹ Yokoyama, A., Ohtsu, K., Iwafune, T., Nagai, T., Ishihara, S., Kobara, Y., Horio, T. and S. Endo (2009) Sensitivity difference to insecticides of a riverine caddisfly, *Cheumatopsyche brevilineata* (Trichoptera: Hydropsychidae), depending on the larval stages and strains. *J Pestic Sci*, 34, 21–26.

² Böttger R, Schaller J, Mohr S (2012) Closer to reality - the influence of toxicity test modifications on the sensitivity of *Gammarus roeseli* to the insecticide imidacloprid. *Ecotoxicol Environ Saf*, 81, 49–54

mm でイミダクロプリドの24時間LC₅₀に差は無かった³。これらの知見は、生活史の中の断片的な成長段階を扱っているに過ぎないことに留意する必要があるが、成長に伴う感受性の変動は水生生物種によって異なることを示唆している。

表 6-37 E7 卵を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	ふ化阻害 卵数	総合影響数
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
10.0	10.1	20	0	0
18.1	19.0	20	5	5
32.5	36.6	20	8	10
58.2	70.1	20	11	14
105	128	20	19	20
190	237	20	20	20

表 6-38 1 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	不動個体数	
			24時間	48時間
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
3.4	3.74	20	0	0
4.06	4.58	20	0	0
4.89	5.39	20	0	0
5.88	6.49	20	0	0
7.04	8.09	20	0	5
8.45	9.75	20	0	17
10.1	11.5	20	1	20

³ Alexander AC, Culp JM, Liber K, Cessna AJ (2007) Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environ Toxicol Chem*, 26, 1726–1732

表 6-39 2 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	15	8	0	0
助剤対照区	—	20	18	9	0	0
7.97	8.42	20	19	10	0	0
10.5	11.1	20	15	9	0	1
13.6	15.0	20	17	14	0	1
17.5	19.2	20	15	11	0	3
22.8	25.6	20	15	5	2	8
29.7	33.6	20	15	1	3	19

表 6-40 3 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	14	8	0	0
助剤対照区	—	20	12	9	0	0
9.01	9.96	20	12	5	0	0
12.5	14.7	20	11	6	0	0
17.8	21.8	20	15	6	0	1
24.8	31.3	20	15	3	0	8
34.5	44.7	20	9	0	3	16
48.5	62.1	20	12	2	7	20

表 6-41 4 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	19	20	0	0
助剤対照区	—	20	19	20	0	0
10.0	10.7	20	20	20	0	0
15.0	16.2	20	19	19	0	0
22.5	25.5	20	20	18	0	1
33.8	38.9	20	20	13	0	6
50.7	58.1	20	19	12	1	18
76.3	89.0	19	8	9	15	19

表 6-42 5 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロチアニジン）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	20	20	0	0
助剤対照区	—	20	18	18	2	2
15.0	14.7	20	19	19	0	0
22.5	22.5	20	19	18	1	1
33.8	33.2	20	18	18	0	2
50.7	52.8	20	18	9	1	12
76.3	78.5	19	11	5	8	17
114	117	19	10	9	16	19

表 6-43 クロチアニジンの各成長段階に対する半数影響濃度

成長段階	EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	95%信頼限界	感受性比
E7期卵	37.4	29.2—47.5	4.30
1齢幼虫	8.70	8.26—9.16	1
2齢幼虫	25.1	22.7—28.2	2.89
3齢幼虫	34.1	30.5—38.2	3.93
4齢幼虫	42.9	38.2—48.3	4.93
5齢幼虫	49.0	33.1—56.8	5.63

（3）クロラントラニリプロールの試験結果

筋肉のリアノジン受容体に作用するクロラントラニリプロールの試験結果を表 6-44 から表 6-49 に示す。曝露開始時および終了時に試験水試料を採取し、LC-MS/MS により被験物質を定量した。表中の解析濃度は被験物質の実測濃度の幾何平均値を示し、半数影響濃度の算出に使用した。すべての試験を通して、設定濃度に対する解析濃度は 77.0～139 %、水温は 19.3～20.9℃、pH は 7.8～8.0 の範囲であった。なお、本試験では溶存酸素濃度は測定していない。

被験物質による毒性症状としては、E7 期卵では濃度依存的なふ化阻害が観察された(表 6-44)。一部のふ化個体では脚が正常に機能せず屈伸開脚反応を示さないため不動と判定された。また、20 $\mu\text{g/L}$ 以上の試験区では、正常と判定されたふ化個体であっても動きが緩慢な傾向にあった。

1 齢～3 齢幼虫期では、設定濃度が被験物質の水溶解度（1023 µg/L、20℃）付近の最高濃度試験区において累積不動個体率が 50 %を超えず、明瞭な濃度-反応関係が見られなかった（表 6-45～表 6-47）。一方、最低濃度の試験区においても、正常と判定された試験個体の刺激に対する反応は緩慢な傾向にあった。さらに、2 齢および 3 齢幼虫試験の営巣個体数が濃度依存的に低下していたことから、被験物質は幼虫の運動機能に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。しかしながら、今回の試験ではマニュアルにしたがい水流刺激に対して屈伸開脚反応を示した個体はすべて正常と判定した。なお、2 齢および 3 齢幼虫試験の営巣個体と曝露濃度の関係は、後述の 4 齢および 5 齢幼虫試験のそれと意味合いが異なることに留意する。2 齢および 3 齢幼虫試験の試験個体は曝露開始時点で営巣していない。したがって、営巣個体数に濃度依存的な反応があった場合、被験物質による営巣行動の抑制を示唆していると考えられる。一方、4 齢および 5 齢幼虫試験の試験個体は、馴化期間中に営巣させているので、営巣個体数に濃度依存的な反応があった場合、被験物質による異常な出巣行動を示唆している。

4 齢および 5 齢幼虫の試験では営巣個体数に明瞭な濃度依存性は確認されなかった（表 6-48、図 6-2 および表 6-49）。高濃度の試験区では、出巣および営巣個体の刺激に対する反応が鈍くすべて不動と判定された（死亡はしていない）。

表 6-50 に各成長段階の半数影響濃度を示す。表中の感受性比は、各成長段階の EC₅₀ 値／最小の EC₅₀ 値比である。クロラントラニプロールに対しては、前述のジフルベンズロンおよびクロチアニジンとは異なる感受性変動のパターンを示し、4 齢および 5 齢幼虫が最も高感受性で、次に E7 卵の感受性が高く、1 齢～3 齢幼虫は感受性が低かった。成長に伴う感受性比は 38 倍以上となった。ただし 1 齢～3 齢幼虫試験では、最低濃度の試験区においても反応が緩慢な正常個体が観察されていることから、これらの成長段階が全く被験物質の影響を受けないとは考えにくく、クロラントラニプロールのような作用機作の殺虫剤については、行動が緩慢になることによる成長などへの長期的な影響を評価できるように毒性試験法をさらに高度化する必要があると考えられる。

表 6-44 E7 卵を用いた毒性試験結果（クロラントラニプロール）

設定濃度 (µg/L)	解析濃度 (µg/L)	試験個体数	ふ化阻害 卵数	総合影響数
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
20	16.1	20	1	2
46	37.8	20	4	6
106	86.5	20	8	8
244	195	20	12	14
560	497	20	11	15

表 6-45 1 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロラントラニリプロール）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	不動個体数	
			24時間	48時間
対照区	—	20	0	0
助剤対照区	—	20	0	0
160	132	20	0	0
1000	881	20	0	0

表 6-46 2 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロラントラニリプロール）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	18	13	0	0
助剤対照区	—	20	20	16	0	0
10	8.56	20	15	12	1	0
20	16.4	20	2	1	1	2
40	31.1	20	1	0	2	5
80	61.6	20	0	0	1	4
160	136	20	0	0	3	4
1000	879	20	0	0	3	7

表 6-47 3 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロラントラニリプロール）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	20	13	13	0	0
助剤対照区	—	20	17	17	0	0
10	13.9	20	11	9	0	0
20	18.2	20	11	8	0	0
40	32.4	20	5	4	0	0
80	62.9	20	0	0	0	0
160	132	20	0	0	0	1
1000	859	20	0	0	0	4

表 6-48 4 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロラントラニリプロール）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	21	21	21	0	0
助剤対照区	—	18	18	18	0	0
10	9.31	21	20	19	0	0
20	21.6	21	18	18	1	3
40	42.5	21	18	18	5	11
80	85.4	21	9	7	21	21
160	174	21	11	9	21	21

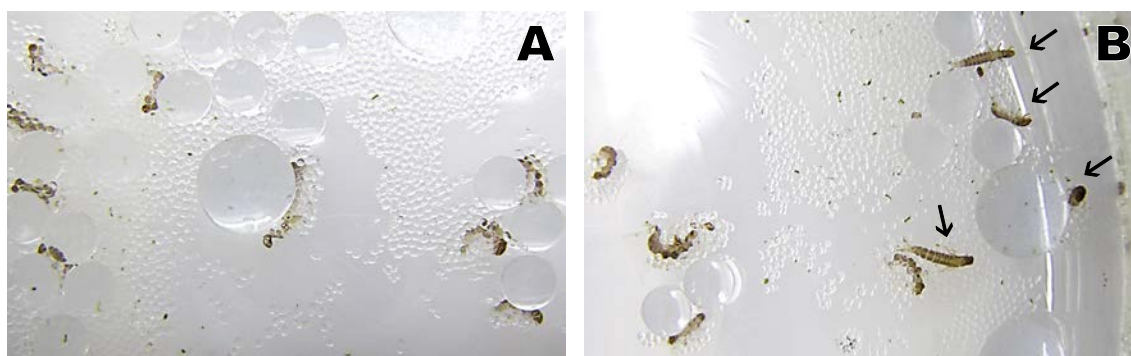


図 6-2 4 齢幼虫を用いた毒性試験の様子（曝露 48 時間後）

A : 対照区, B : 160 $\mu\text{g/L}$ 試験区, \rightarrow は出巣個体を示す. 出巣個体は弛緩している.

表 6-49 5 齢幼虫を用いた毒性試験結果（クロラントラニリプロール）

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	解析濃度 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数	営巣個体数		不動個体数	
			24時間	48時間	24時間	48時間
対照区	—	19	19	19	0	0
助剤対照区	—	20	19	19	1	1
10	9.10	19	18	16	0	1
20	19.3	20	20	20	0	4
40	39.0	20	20	18	16	20
80	77.2	21	20	18	21	21
160	162	21	19	15	21	21

表 6-50 クロラントラニリプロールの各成長段階に対する半数影響濃度

成長段階	EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	95%信頼限界	感受性比
E7期卵	115	69.8—205	5.06
1齢幼虫	> 881		> 38.8
2齢幼虫	> 879		> 38.7
3齢幼虫	> 859		> 37.8
4齢幼虫	30.3	23.2—38.6	1.33
5齢幼虫	22.7	19.2—27.7	1

以上、3種類の殺虫剤の試験事例が示唆するように、農薬の作用機作の違いによって感受性の高い成長段階は異なることが示唆された。本試験法は、特定の成長段階のみで実施される現行の生態影響試験では過小評価される可能性がある一部の農薬について、成長にともなう感受性の変動を把握することにより、適切に生態影響を評価することができると考えられる。

このマニュアルは、環境省環境研究総合推進費「適切なリスク管理対策の選択を可能とする農薬の定量的リスク評価の開発（C-1102）」（2011～2013年度）および環境省委託事業「農薬水域生態リスクの新たな評価手法確立業務（調査研究）」（2013～2015年度）の成果の一部を踏まえ、農研機構の中課題41807「あらたな農業生産方式導入による環境保全効果の評価指標開発」（2016～2019年度）において取りまとめたものです。本マニュアルの内容は環境省の見解ではないことを付します。

プロジェクトリーダー：小原洋

（農研機構 農業環境変動研究センター環境情報基盤研究領域）

研究担当者：横山淳史、永井孝志、大津和久、稲生圭哉

（同センター生物多様性研究領域化学物質影響評価ユニット）

岩崎亘典

（同センター環境情報基盤研究領域農業空間情報解析ユニット）

執筆者：横山淳史（同上）

技術マニュアル

コガタシマトビケラ成長段階別毒性試験法マニュアル（Ver. 1.0）
（2020年3月）

編集・発行：農研機構 農業環境変動研究センター

住所：茨城県つくば市観音台 3-1-3

問い合わせ先

TEL：029-838-8191（広報担当）

E-mail：niaes_kouhou@ml.affrc.go.jp

