

博士論文の内容の要旨

氏名	石母田 誠
学位名	博士（理学）
学位授与年月日	2021年3月20日
論文題目	アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の一時的な曝露が水生生物に及ぼす多世代影響と薬剤耐性獲得のメカニズム

(博士論文の内容の要旨)

本研究では、殺虫剤（アセチルコリンエステラーゼ（AChE）阻害剤）の水生生物に対する影響を長期的に評価することを目的とした。実環境中における農薬は一時的に高濃度になり、数時間から数日で低濃度になることが知られている。実環境中における長期的な殺虫剤の影響を調査するため、本研究では水生生物に対して一時的な殺虫剤の曝露を行い、その感受性の変化を多世代に渡り評価した。また、体内酵素活性を同時に測定し、多世代感受性変化のメカニズム解明を行った。具体的には、1) 一時的な殺虫剤曝露が甲殻類に及ぼす多世代影響を種間差に焦点を当てた。次に、2) 感受性が異なるタイリクアオムキミジンコ (*Scapholeberis kingi*) に殺虫剤の一時的な曝露影響を評価し、化学物質感受性の高低差によって、次世代感受性がどのように変化するかを評価した。さらに、3) 甲殻類と生活史が異なるセスジユスリカ (*Chironomus yoshimatusi*) への一時的な曝露影響を4世代に渡り評価した。いずれの実験でも、AChE阻害剤の標的酵素であるAChE活性を測定し、多世代感受性変化のメカニズム解明を試みた。

初めに、3種類のみジンコ（生後24時間以内）に1世代目のみピリミカーブ（カーバメート系農薬）を48時間曝露し、その感受性の変化を4世代（F0～F3世代）に渡り評価した。実験には、OECDガイドライン種であるオオミジンコ (*Daphnia magna*)、霞ヶ浦から採取した *S. kingi* およびトガリネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia cornuta*) を使用した。実験の結果、ピリミカーブに対する感受性が *C. cornuta* のみ有意に低下し、カーバメート系農薬の標的酵素であるAChE生産量の増加が感受性低下の原因の一つである可能性が考えられた。また、内的自然増加率 (r) を指標として、薬剤耐性を持つことによる生活史へのコストを調べた。*C. cornuta* の r は1世代目で低下したが、2世代目では回復したため、薬剤耐性に対するコストは確認できなかった。みジンコ類には、*C. cornuta* のように、カーバメート系農薬に対して薬剤耐性を素早く発達させる種類もあり、そのメカニズムの一部を解明できた。

次に、殺虫剤の一時的な曝露が、感受性および生息地の異なる *S. kingi* 個体群に与える影響を2世代に渡り（F0～F1世代）評価した。湖沼4箇所から採取した *S. kingi* 系統をそれぞれ飼育して使用した。対象農薬として、2種類の殺虫剤（ピラクロホスおよびピリミカーブ）を使用した。幼体（生後24時間以内）に48時間殺虫剤を曝露した後、曝露せずに飼育して、次世代（F1世代）における幼体の感受性の変化を調査した。この結果、殺虫剤に短期的に曝露した一部の系統は、同殺虫剤に対して感受性の高い幼体を産んだため、親世代よりも次世代の方が、リスクが高いことが示唆された。また、みジンコ体内のAChE活性を測定したところ、どちらの殺虫剤についてもF0世代において、48h-EC₅₀値とAChE活性との間に正の相関が確認された。よって、みジンコのAChE活性を測定すれば、AChE阻害剤に対する感受性をある程度予測できる可能性が高い。一方、F1世代においては、有意な相関は確認できず、経世代における感受性変化のメカニズムについては、更なる研究が必要である。

最後に、みジンコと異なる生活史を持つ *C. yoshimatusi* への一時的な殺虫剤曝露影響を4世代に渡り評価した。2種類の殺虫剤（ピラクロホスおよびピリミカーブ）を各世代において48時間

曝露後、殺虫剤非存在下で飼育した。この方法を3世代目まで繰り返し(F0~F2世代)、4世代目(F3世代)では殺虫剤曝露からの回復性を評価するため、48時間の殺虫剤曝露を行わずに飼育した(処理区)。また、48時間の殺虫剤曝露を行わずに、4世代飼育した個体群を対照区とした。ピリミカーブ処理区の各世代の幼虫(生後24時間以内)の感受性を、各世代の48h-EC₅₀値から評価したところ、F2世代における一部処理区の感受性は、対照区より低くなった。この感受性の低下にはAChE活性の増加が関与していた可能性が高い。ピラクロホスを曝露した処理区では、対照区の感受性と同程度であったが(F0~F2世代)、前曝露を止めたF3世代では、低感受性の幼虫が産まれた。

どの実験においても、一時的なピリミカーブ曝露を行った次の世代(F1世代)で感受性が変化したこと(*C. cornuta*が薬剤耐性を獲得したことや、*C. yoshimatsui*は統計的に差がないが、対照区よりも感受性が低下したこと、*S. kingi*が薬剤に対して高感受性になったこと)を考えると、2世代実験において、薬剤からの回復能力を評価できる可能性が高い。生物種ごとに回復能力を評価すれば、多世代影響を予測する上での重要なパラメーターとなるであろう。

また、本研究ではミジンコおよびユスリカのピリミカーブにおける薬剤耐性の獲得に、AChE活性の増加が関与していることが示唆され、これらの生物種では初めての知見であった。酵素レベルでの化学物質の長期的な影響の解明は、新たなエンドポイントの探索に繋がる可能性が高い。

以上より、水生生物の薬剤曝露影響からの回復性の評価、および薬剤耐性獲得メカニズムの解明に貢献できた。