

学会賞受賞研究

水生生物を用いた毒性評価（バイオアッセイ）と その水環境評価・管理への応用に関する研究

鑑迫 典久*

Norihisa TATRAZAKO:

The Toxicity Evaluation Using Aquatic Organisms (Bioassay) and Its Application Study
to the Evaluation and Management of Water Environment

Abstract

The amount and variety of chemical substances daily used and discharged in the wastewater from industry and sewage treatment plants are increasing year by year. Since there is a limit to regulate individually a huge number of chemical substances, it is needed to manage the wastewater including those chemicals as “a whole”.

“Management method for industrial wastewater and treated sewage water using biological response” has already been implemented among Western countries and South Korea. The introduction of those method to Japan had been approached from various angles by the Ministry of the Environment since 2009, and decided to adopt it as a voluntary of each company for management method rather to enforce it as legal regulation.

Even though industrial wastewater and treated sewage water are strictly controlled by effective laws in Japan, 30% of wastewater we investigated had biological effects and discharged into the environment. Those should be improved. Because of the shortage of researchers in the field of bioassays by aquatic organisms in Japan, basic research is behind and the method is not much adopted. I believe the effective application of bioassay for the evaluation of wastewater will maintain the ecosystems healthy.

Key words: whole effluent toxicity (WET), toxicity reduction evaluation (TRE), toxicity identification evaluation (TIE)

1. 日本水環境学会学術賞受賞の経緯

2019 年 6 月 18 日に開かれた総会において日本水環境学会 2018 年度学術賞を受賞した。受賞題目は、「水生生物を用いた毒性評価（バイオアッセイ）とその水環境評価・管理への応用に関する研究」であり、対象となった研究内容は、内分泌かく乱化学物質、ナノ粒子、環境中医薬品等のいわゆる新興環境汚染物質に対する評価方法の開発、ならびに魚類、甲殻類、藻類など水生生物のバイオアッセイを用いた事業所排水や公共用水等の環境評価・管理への応用である。前半につ

いては、筆者らが考案した内分泌かく乱化学物質の検出法のいくつかが OECD テストガイドラインにも採用されている。後半のバイオアッセイによる水環境への影響評価手法は、その基本となる研究は既に 1970 年代後半から欧米で盛んに行われている。筆者は海外のやり方を日本の環境に適用するように改良し、その手法の国内での普及および制度化を、民間企業および国立環境研究所の環境リスク研究センターリファレンスラボ勤務時に行ってきた。ここでは主に生物応答を用いた事業所排水の管理手法について紹介したい。

2. 生物応答を用いた排水管理手法の開発

2.1. 背景

2020 年 12 月 9 日受領

2020 年 12 月 9 日受理

*愛媛大学農学部環境計測学教育分野（責任著者）

科学技術の発展に伴い化学物質の種類と量が増加しており、それらは我々の生活の質を向上させていると同時に事業所排水または家庭から下水処理場等を通じて環境中に放出されている。その管理について、現状の水質汚濁防止法に定められる排水基準項目（および水質環境基準項目）では、人の健康保護を目的とした水銀やカドミウム、鉛、PCB、トリクロロエチレンなどを含む 28 種類（環境基準は 27 種類）と、生活環境の保全を目的とした pH や BOD、SS、亜鉛、窒素、リンなど 15 項目（水生生物保全のための 3 項目を含む、環境基準は 12 項目）に留まっている。ほかにも水質環境基準の要監視項目（26 項目）や要調査項目（208 項目）、水道法による水道水質基準（51 項目）など存在するが、合わせても約 300 種類に留まる。しかし実際の排水中には数百から数千種類の化学物質が存在すると言われており、その中には新規化学物質も含まれている。さらにそれらの環境中での分解物や反応副生成物などについては把握、対処が難しい上に、化学物質間の組み合わせによる複合反応（相乗・相殺・相加）も考慮すると、個別に化学物質を管理するには限界があることが予想できる。よって今後化学物質が起因となって発生するかもしれない、または既に起きているかもしれない水質問題に対して、規制法令は追い付いていないのが現状である。そこで、安全・安心な水環境を確保し、化学物質に起因する人や水生生物への悪影響を未然かつ効率的に防止するために、排水中の多様な化学物質の影響を“総合的に管理”する新たな手法の必要性が考慮されていた。そのような中、筆者が 2006 年に環境省の若手勉強会で“生物応答（バイオアッセイ）を用いた管理手法”手法を紹介する機会があり、それをきっかけとして、翌年度からの検討準備委員会を経て、2009 年から正式に「生物応答を利用した排水管理手法」の日本への導入の検討委員会が立ち上がった（環境省、2009）。筆者は民間企業での勤務時代にスウェーデン環境研究所（IVL Swedish Environmental Research Institute）とカナダ環境省の研究所

（Environment Canada）から直接手法を学び、米国の手法に準じて 1993 年より全国数十か所の製紙・パルプ工場排水の水質調査を行っていた。その経験を活かして環境省の検討会の中で日本の現状に最適化すべく日本版ガイドラインの作成に貢献した。

2.2. “バイオアッセイを利用した排水管理手法”

2.2.1. バイオアッセイとは

バイオアッセイとは、ここでは、生態系を構築する生物（藻類、甲殻類、魚類など）を利用して、化学物質に因るその生物個体の変化を捉えるインビトロ試験の

ことを指す。生態毒性試験、生物応答試験、または単

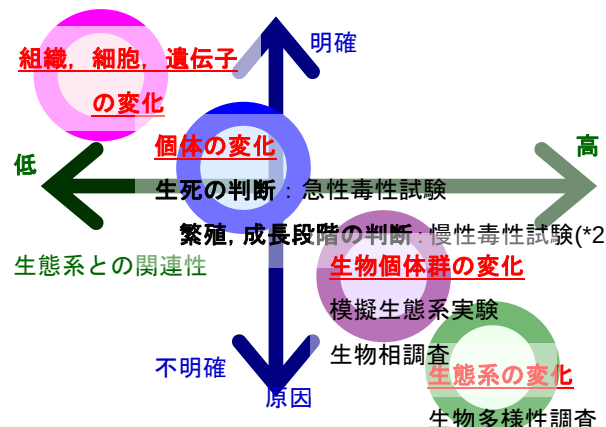


図1 生態影響評価に利用するバイオアッセイの種類と考え方

に生物試験ともいう。図1に示すように、広義では細胞、遺伝子等を用いるインビトロ試験（左上）から、マイクロコズム（模擬生態系）など（右下）も含まれる。左上側に行くほど生化学反応が重視され、化学物質との因果関係は強くなるが実際の生態系へのインパクトは分からない場合が多い。逆に、右下方は、複雑系で時間とコストがかかるうえ、再現性が悪く、化学物質との因果関係を明らかにするには向かないが、より実生態系の変化を捉えることができる。排水管理には、中間にある生物個体または個体群の変化を測定するバイオアッセイが用いられている。これらは化学物質の環境生物への有害影響予測とその有害原因物質を予測し低減する両方の方策に適用できる（新野および斎藤、2009）。

一方、バイオアッセイは再現性確保のために管理された一定条件下で行われる、よって有害化学物質が含まれている排水の放流先に生息する生物への影響を正確に調べるためには、個別化学の分析や野外での生態調査を同時に実施することも必要であるとされている

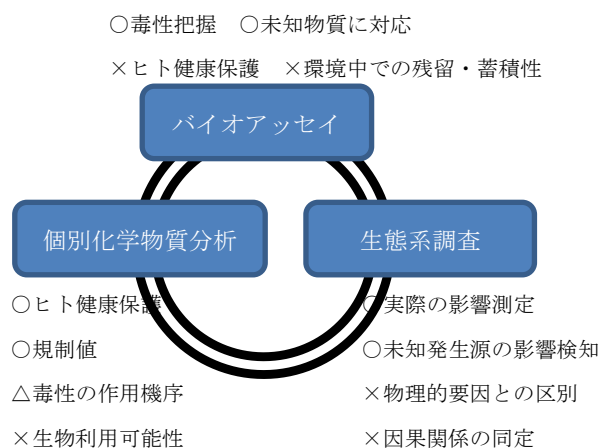


図2 生態系保全のための総合的アプローチ

(板津ら, 2015). 図 2 に示すように, 手法がお互いに長短所を補完しあって生態系を保全することが望ましい。

国内でバイオアッセイを環境評価に用いたのは, 1970 年頃に瀬戸内海西部の工場排水にメダカやウニの胚を適用した浮田ら(浮田ら, 1978)のほか, 1980 ~ 90 年代にかけて富山県内事業所排水に魚類, ミジンコ, 藻類ほかの急性試験を適用した楠井ら(楠井ら, 1996)などが知られているが, 事業場排水を評価・管理した例は非常に少なく, しかも急性毒性試験に基づくものに限られていた。筆者らは製紙・パルプ工場排水に短期慢性毒性試験を適用しその一部を報告している(鑑迫, 2001)。

2.2.2. WET (Whole Effluent Toxicity) システムの概要

WET システムとは, 1995 年から米国で施行されている排水管理の手法(USEPA, 2020, 最新版)で, バイオアッセイを用いて原因物質の特定を必須とせず, 対象となる排水(事業所排水, 下水処理水, 農業排水など)または環境水(河川, 湖沼水等)が有する生物影響を総括的に評価し, その影響自体を削減する方策を提案することにより, 結果としてより良い水環境の保全を図る仕組みである(鑑迫, 2006; OSPAR commission, 2007; 鑑迫ら, 2012; 鑑迫, 2014)。

最初に, 対象となる排水や環境水に対して, 数種類の生物(藻類, 甲殻類, 魚類など)によるバイオアッセイが実施される。その時の供試排水は総体(Whole Effluent)として取り扱われ, 希釈はしてもよいが, 含まれている成分が失われる可能性がある濃縮, 抽出, 濾過などはおこなわれない。もし, 試験結果が決められた値を超えた場合には, 影響の再現性を確認した後, 毒性同定評価/毒性削減評価(TIE: Toxicity Identification Evaluation/TRE: Toxicity Reduction Evaluation)手法等(Norberberg-King ら, 2005; 新野, 2011; Diamond, 2014)の実施により, 適切に生物影響が削減される。

上記と同様の考え方は, カナダ(EEM: Environmental Effect Monitoring), 英国(DTA: Direct Toxicity Assessment), ドイツ(ICE: Integrated Controlling of Effluent), フランス(WEA: Whole Effluent Assessment), ニュージーランド(AEE: Assessment of Environmental Effect), デンマーク(WWA: Whole Effluent Assessment), スウェーデン(CID: Characterisation of Industrial Discharge)など, 呼称と細かな内容は異なるが, 既に様々な国に存在している(Environmental CANADA, 1999; Power および Boumphrey, 2004; 山本および新野, 2015)。隣の韓国では 2011 年に導入され, ベトナム,

マレーシアなどのアジア諸国でも導入が検討されている(新野, 2014)。

2.3. 日本版 WET システムの特徴

米国 WET を参考にして日本版のシステム案が作られたが, 幾つかの違いがある。その一つに魚類, 甲殻類の短期慢性毒性試験の採用がある。短期慢性毒性試験とは, 慢性毒性試験相当の結果(繁殖への影響など)を短期間で得られるように工夫しており, 最近ではカナダや米国の多くの州でも採用・運用されている。

1990 年代米国の WET システム開始時期は, 個体の生死をエンドポイントとした急性毒性試験が使用されていた。当時の米国の河川水は大変汚れており, “燃える川”として有名なカヤホガ川(オハイオ州)に象徴されるように生物が全く棲息できないレベルの河川が多数存在していたため, まず急性毒性を下げるのが急務であった。韓国でも WET 施行前に, 下水処理場放流水で予備調査を行った結果, 約半数の処理場でミジンコ急性毒性が検出されたため急性毒性試験から導入することに決定している。環境省の検討委員会では, 水質事故の際の事後確認方法としての利用可能性, 技術的な難度, コスト面等から, 韓国と同様に甲殻類の急性試験のみを先行導入すべきという意見も一部にあった。しかしながら, WET の検討を始めた 2009 年当時に筆者らがいくつかの日本の事業所排水や下水処理水を予備調査したところ, 魚類や甲殻類の急性毒性を示した例はほとんどなかった。一方で, 藻類の慢性影響や魚類, 甲殻類の短期慢性影響は 2 割以上の事業所で検出された。つまり, 我が国では急性毒性を示すような排水が放流されているとは考えられないことや, 生物の繁殖影響を指標としているため急性毒性より高感度で環境健全性を評価できる短期慢性毒性試験の方が日本の環境評価には適していると考えられた(山本ら, 2015a)。そこで日本の現状に合わせて短期慢性毒性試験を基本とした排水試験方法案が 2013 年(2015 年に改定)に環境省から公示された(国立環境研究所・環境省, 2015)。

以下に日本版 WET で用いられる 3 種類のバイオアッセイについての簡単な説明と, それを日本の排水に適用した結果を示す。

・淡水藻類を用いる生長阻害試験(慢性毒性試験)

試験生物は単細胞緑藻のムレミカヅキモが推奨されている。排水を含む培地で藻類を 3 日間培養して生長速度(細胞数の増加)を調べる。排水で試験した結果と対照区の結果を比較し, 藻類の増殖が阻害されなくなるまで希釈されたときの排水濃度を求める(対照

区：試験結果を検証するための比較対象。試験溶液として排水を含まない培地または飼育水）（OECD, 1998）。

・ミジンコの繁殖試験（短期慢性毒性試験）

試験生物は甲殻類の一種であるニセネコゼミジンコが推奨されている。排水を含む飼育水で生後 24 時間以内のミジンコの幼体を最大 8 日間飼育し、死亡数と成長したミジンコが産んだ幼体の数を観察する。3 日で成熟して産仔を開始する。排水で試験した結果と対照区の結果を比較し、ミジンコ類の繁殖に対して影響がない排水濃度を求める（USEPA, 1994；日本環境毒性学会編, 2003；Environmental Canada, 2007；新野ら, 2015）。

・胚・仔魚期の魚類を用いる短期慢性毒性試験

試験生物はゼブラフィッシュ（シマヒメハヤ）またはメダカが推奨されている。排水を含む飼育水で受精後 4 時間以内の受精卵(胚)から曝露を開始して、ふ化から 5 日後（ばく露開始からだとゼブラフィッシュでは 8～10 日間、メダカでは 13～16 日間）までの生残数、ふ化率等を観察する。排水で試験した結果と対照区の結果を比較し、胚期から仔魚期の魚類に対して影響がない排水濃度を求める（OECD, 2013）。

各試験の対照区に対して有意な差がない最大無影響濃度（NOEC：単位％）を求めるには、藻類およびミジンコ試験は、まず等分散性の検定（Bartlett の検定など）を行い、データが等分散の場合 Dunnett の多重比較検定、不等分散の場合 Steel の多重比較検定を行う。魚類試験の場合、データの性質上、等分散性を仮定できないことから、すべてノンパラメトリックの Steel 検定を用いる。さらに、毒性量単位として、TU（Toxicity Unit）を算出する。TU とは $100/\text{NOEC}$ で示し、“無影

響濃度にするために必要な排水の希釈倍率”に相当する。筆者らは排水の改善対策が必要とされる目安として、 $\text{TU}=10$ を推奨していたが、事業所や業界ごとに目標値を定めてよい。 $\text{TU}=10$ とは、排水を 10 倍希釈したら無影響濃度になることを意味する。 $\text{TU}=10$ の根拠は、排水基準値と環境基準値の間に 10 倍の差がある

（亜鉛以外）ことによる。筆者らが行った延べ 91 の事業場、下水処理場排水試験結果の一部を図 3 に示す。 TU が 10 を超える排水は、魚類、ミジンコ、藻類でそれぞれ 9%、29%、15%に相当する。逆に約 7 割の排水は生物影響が殆どないことが分かる（渡部ら, 2015）。

・毒性削減対策と原因物質探求（TIE/TRE）

いずれかのバイオアッセイの TU が基準値（例えば 10）を超えた場合、その影響の再現性を確認した後に生物影響ありと判定し、前出の TIE/TRE を行う。米国 EPA（環境庁）の TIE/TRE 実施手順書（USEPA, 1999）は参考になるが、結果として生物影響が削減されるならばその手段は問われない。米国 EPA の手順を図 4 に示す。1 から 6 段階まで存在する。1, 2 段階は、事業場の操業状況、処理設備の確認および化学物質の知識で解決でき、筆者の経験上ではここまでで問題解決する場合が多い。3 段階は、実験室内で排水に何らかの物理・化学的処理をしたのちに生物試験を行い、その排水の影響が変化するかを調べる。例えば凝集沈殿で影響が削減されれば、沈殿部に影響物質が含まれている。同様に排水を酸素曝気して生物影響が減れば、原因物質は酸化されやすいと想定され、 pH を下げて影響が減れば原因物質は酸沈殿または酸分解し易いと想像できる。最も生物影響の低減に効果のあった処理方法

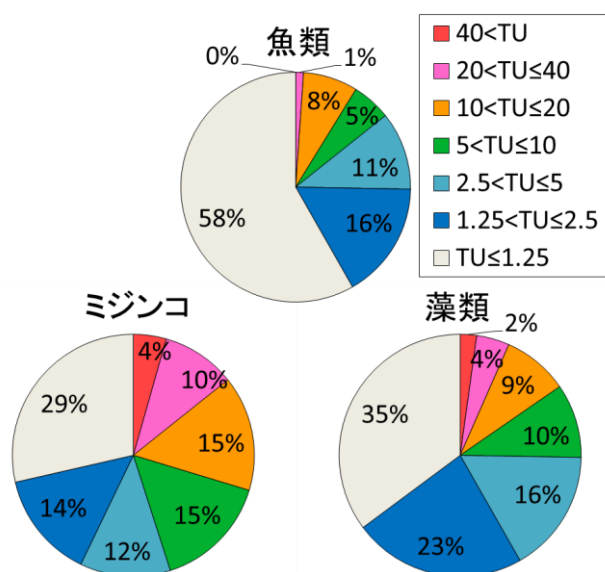


図 3 平成 20～25 年度、延べ 91 排水試料の各生物試験に対する TU の内訳 (%)

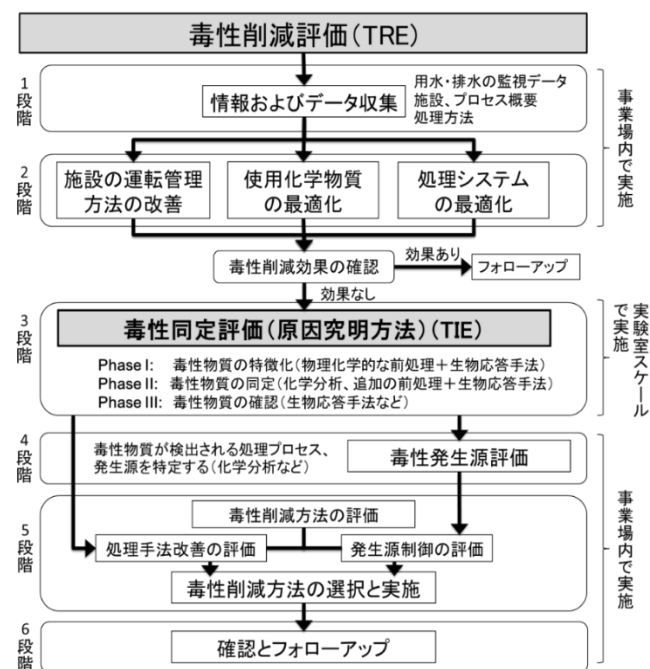


図 4 WET 試験における毒性削減評価方法（TRE）の概要

が取りも直さず生物に有害な化学物質（群，種）を除く効果的な方法であると考えられ，それが即ち事業所の排水プラントの改善に役立つ．複合影響や未知物質が存在していても，化学物質の数に比べて処理方法は有限であるから，総体として最も効率よく影響を下げる処理を見つければよい．複雑系の排水に対して，迅速・安価な生物影響削減の方法を考えるのは，物理化学，生化学，排水処理技術の知識を有する研究者の努力と経験に頼るところが大きい，逆に研究者にとってはやりがいもある．4段階は3段階で得られた想定される物質が排水中に入っているかを分析して確認する作業であり，選ばれた処理方法が正しいかどうかの確認になるが，省略しても構わない．5，6段階では，排水プラントの改善を，原因物質を発生源でカットするのか，末端処理を強化するのかを選択し，効果を確認する．筆者らは上記手法を参考にして，製紙排水，化学メーカー排水や下水処理水のTREを行ってきた（富川ら，2015；藤原ら，2015；山本ら，2015b）．

このようにWETシステムは，排水の検査，診断，治療を行い，健全性（健康）を保つという点でヒトの健康診断と似ている．

3. まとめ

環境省では2019年に本手法を罰則規制を伴う法令ではなく，事業所の自主管理として用いることとして推奨した．各事業所が自らの排水が生物影響をもつ化学物質を流さないように管理すれば，生態系への負荷が削減され，結果として健全な生態系の保全につながる．しかしその“企業の動機”を支持し，監視するためには社会全体の協力体制が必要である．

筆者らは国立環境研究所のレファレンスラボで，実際にバイオアッセイに興味がある地方環境研究所，大学教員，学生，民間企業やコンサルタント他を対象に試験法の実習セミナーを2011年から毎年2回開催し，WETシステムの解説とバイオアッセイ技術の普及・啓発を行っていた．排水基準をクリアしているのに生物影響を有している排水がいまだに存在するという日本の現状は殆ど世間に認知されておらず，諸外国の普及状況を鑑みても国内は遅れていると言える．バイオアッセイ自体の市民への認知度が低いのが国では，生物影響が数値化されることも知られておらず，それを下げることの意義も市民に伝わりにくいため，企業としてもCSRの効果が弱い．バイオアッセイの研究者が少ないため，自社内でのTIE/TREの実行が困難であることも背景にある．

バイオアッセイは行政各省および民間企業において，環境管理だけではなく化審法，農取法，薬事法等規制への対応や新たな製品の開発・安全性評価等に利用されているにもかかわらず，国内の大学でインビボ試験を研究しているところが少なく，新卒人材の不足，基礎研究の脆弱化が懸念される．筆者は，バイオアッセイに興味を持つ本学の卒業生が将来この分野で活躍してくれることを期待している．

最後に，長年にわたり多大なるご指導を頂いた諸先生方，環境省の大気水環境課および化審室，地方環境研究所の皆様，排水サンプルを提供して頂いた企業の皆様に感謝いたします．

引用文献

- 板津靖之・高野智弘・金俊・福富真美子・楠井隆史
(2015)：事業所排水の生態毒性学的評価：毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響．環境化学．25：19-26．
- Environmental Canada (1999) Guidance Document on Application and Interpretation of Single-species Tests in Environmental Toxicology, EPSI/RM/34.
- Environment Canada (2007) Biological test method: Test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Section 2-4, 5-30.
- 浮田正夫・中西弘・小林直正 (1978)：ウニ卵による生物検定．衛生工学研究討論会講演論文集．14：122-129．
- OECD (1998) OECD Guideline for Testing of Chemicals 212, Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2013) OECD Guideline for Testing of Chemicals 236, Fish embryo acute toxicity test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris
- OSPAR Commission (2007): Practical Guidance Document for Whole Effluent Assessment.
- 環境省 (2009)：WET手法を活用した排水規制手法検討調査．平成21年度環境省予算（案）主要新規事項等の概要．
- 楠井隆史・Blaise C.・佐藤美和子・清水宏裕・田嶋美樹・筒井孝次 (1996)：富山県内の産業排水の生態毒性評価．環境工学研究論文集．33：215-226．
- 国立環境研究所・環境省 (2015)：生物応答を用いた排水試験法（検討案）．排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会．改訂．
- Diamond, J.(2014): Whole Effluent Toxicity Testing in the US（日本語訳），生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向（鑑迫典久監修）．NTS．7-33．
- 鑑迫典久 (2001)：紙パルプ工場排水の生物影響と評価法．紙パルプ技術協会誌．55：1110-1109．

- 鑪迫典久 (2006) : 環境水のバイオアッセイ〜 Whole Effluent Toxicity の考え方. 水環境学会誌. 29 : 426-432.
- 鑪迫典久監修 (2014) : 生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向. (株) エヌ・ティー・エス. ISBN : 978-4-86043-400-7.
- 鑪迫典久・山本裕史・新野竜大 (2012) : 生物応答を用いた新たな排水評価・管理手法. 環境浄化技術. 11 : 6-14.
- 富川恵子・入江俊行・内田弘美・渡部春奈・鑪迫典久 (2015) : WET 法を活用した工場排水管理: 化学工業における排水改善の取り組み. 環境化学. 25 : 27-33.
- 新野竜大・斎藤穂高 (2009) : 化学物質管理と生態影響試験. 水環境学会誌. 32 : 583-587.
- 新野竜大 (2011) : 排水管理手法”WET”研究の最新事情ー生物応答試験と毒性削減評価 (TRE) / 毒性同定評価 (TIE). 資源環境研究. 47 : 67-75.
- 新野竜大 (2014) : 韓国における生物応答を用いた排水管理の現状, 生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向 (鑪迫典久監修), NTS, pp.87-93
- 新野竜大・阿部良子・山口直子・新倉良之・吉村奈緒子・押岡香・中山光二・鑪迫典久 (2015) : 数種類の有機化学物質に対する淡水性甲殻類 *Daphnia magna* および *Ceriodaphnia dubia* の慢性毒性による感受性比較. 環境化学. 25 : 55-60.
- 日本環境毒性学会編 (2003) : 生態影響試験ハンドブック-化学物質の環境リスク評価, 3.5 *Ceriodaphnia dubia* を用いたミジンコ繁殖阻害試験, 朝倉書店
- Norberg-King, T.J., Ausley, L.W., Burton, D.T., Goodfellow, W.L., Miller, J.L. and Waller, W.T. (2005) Toxicity reduction and toxicity identification evaluations for effluents, ambient waters, and other aqueous media. SETAC Press.
- Power, E.A., and Boumphrey, R.S. (2004) International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*. 13: 377-398.
- 藤原尚美・野中信一・豊久志朗・鑪迫典久 (2015) : 金属製品製造工場の WET を用いた排水中毒性要因の推定とその改善例. 環境化学. 25 : 35-42.
- 山本裕史・新野竜大 (2015) : 海外における水環境管理への WET 手法活用事例. EICA. 20 : 1-5.
- 山本裕史・新野竜大・鑪迫典久 (2015a) : 生物応答を用いた排水評価・管理の動向と今後の展望. 環境化学. 25 : 3-10.
- 山本裕史・池幡佳織・安田侑右・田村生弥・鑪迫典久 (2015b) : 徳島県内の事業所排水を対象とした TIE 事例. 環境化学. 25 : 11-17.
- USEPA (1994) Test Method 1002.0, *Daphnid, Ceriodaphnia dubia*, survival and reproduction, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Washington.
- USEPA (1999) Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants. EPA/833B-99/002.
- USEPA (2020.12.確認) Permit Limits-Whole Effluent Toxicity (WET): <https://www.epa.gov/npdes/permit-limits-whole-effluent-toxicity-wet>
- 渡部春奈・林岳彦・田村生弥・中村中・阿部良子・高信ひとみ・荻野仁子・小塩正朗・鑪迫典久 (2015) : 生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査. 環境化学. 25 : 43-54.