

生物応答試験を利用した多種多様な化学物質の 複合リスクの評価・管理

Assessment and management of the risk of mixtures with a wide variety of
chemicals using whole effluent toxicity testing

山本 裕史*・渡部 春奈

Hiroshi YAMAMOTO and Haruna WATANABE

国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター

Center for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies

摘 要

科学技術の発展に伴い、多種多様な化学物質が開発・製造・使用されてわれわれの生活の利便性を向上してきたが、その一方で過去にはヒトの健康や野生生物に重大な被害を及ぼしてきた。個別の化学物質に関する各種規制や処理技術の整備によって甚大な被害は影を潜めたものの、多種多様な化学物質の複合リスクには不明な点が多いという課題が残されている。そこで、現在、国内法規制において中心となっている個別の化学物質の化学分析を補完して多種多様な化学物質の複合リスクを評価・管理する手法として、排水や環境水の中に含まれる化学物質の生物に対する有害影響を直接、生物を用いて評価する生物応答試験があり、欧米や韓国など諸外国で評価・管理手法として広く普及している。本稿では、2009年から国内でも導入が検討されてきた生物応答を用いた排水評価・管理手法における試験法の概要と、導入に関わる課題と今後の展望について述べる。

キーワード：混合物，水生生物，生態系保全，バイオアッセイ，未規制物質

Key words：mixtures, aquatic organisms, protection of ecosystem, bio-assay,
non-regulated chemicals

1. はじめに

科学技術の発展に伴い、多種多様な化学物質が開発・製造・使用されており、我々の生活の基盤を支え、便利にすることで多大な恩恵を与えてきた。現在、地球上にある化学物質の多くを網羅している米国化学会の Chemical Abstracts Service に登録されている化学物質数は、1億4,000万種を超える (Chemical Abstracts Service, 2019)。これらの物質が全て広く流通しているわけではないが、国内でも10万種程度の化学物質が製造・使用されていて、廃棄後は自然環境に排出され、ヒト健康や野生生物にも影響を及ぼす恐れがある。

そのため、製造・輸入される工業化学物質については、化学物質審査規制法(化審法)によって新規化学物質について生分解性、蓄積性に加えて、ヒト健康影響のための変異原性試験(Ames試験)や反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(Repro Tox試験)のほか、2003年以降は表1に示す生態影響試験(魚類、甲殻類、藻類の急性毒性試験)も課せられている(厚

生労働省・経済産業省・環境省, 2011)。また、農薬類についても、魚類、甲殻類、藻類などの急性毒性試験結果に基づいて農薬登録基準を策定して、環境中の予測濃度が低く影響が限定的であることを確認しているほか、対象生物を増やし(ユスリカ、ウキサなど)、水産動植物から生活環境動植物の保全に拡大するなどの農薬取締法の改正が行われている(環境省, 2018)。医薬品類についても、薬機法でヒトへの薬効や副作用については臨床検査等の安全確認を経て認可が下りているほか、欧米で医薬品の環境生物へのリスク評価が義務付けられたことを受けて、わが国でも医薬品の環境影響評価ガイドンス(厚生労働省, 2016)が策定され、自主的ながらも環境リスク評価の枠組みができています。

このような、製造・輸入等の「入口」での規制の一方で、「出口」である排水や排ガスの規制についても、それぞれ、1960年代の水俣病や四日市ぜんそくのような公害病の反省から、1970年の公害国会を経て水質汚濁防止法や大気汚染防止法が改正されて基準設定が行われ、事業所に対して直罰制度で

受付：2019年2月12日，受理：2019年5月14日

* 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2, E-mail: yamamoto.hiroshi@nies.go.jp

運用されている。対象物質については、環境基準値も設定されていることが多く、たとえば水質環境基準では人の健康保護のための28種と生活環境保全のための15項目などが設定されている。長年、生活環境項目には、生物化学的酸素要求量(BOD: Biochemical oxygen demand)や窒素・リンなどの総合的な水質指標のみであったが、2003年に新たに「水生生物保全のため水質環境基準」として追加された全亜鉛を皮切りに、陰イオン界面活性剤の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)や、中性洗剤の原料・中間代謝物であるノニルフェノールも追加されている(環境省水環境課, 2016)。ほかにも、基準候補物質として要検討項目(ヒト健康で26物質、水生生物保全で6物質)については指針値を定め、さらにその予備的な物質で情報収集が必要な208物質を要調査項目に指定して情報の収集を行っている。また、ヒト健康の保全の確保のために、飲料水質基準51項目や水質管理目標設定項目26項目、要検討項目47項目なども設定して目標値を定め、監視に努めている(厚生労働省, 2019)。

環境への排出量については、排出規制や環境基準

の対象にはなっていないものの、排出量や移動量の把握が必要な物質については、環境汚染化学物質排出移動登録(PRTR)制度が制定され、事業所等は第1種指定化学物質462物質についての排出・移動量を年に1回、国に届出し、その値が集計・公表される自主管理制度も進んでいる(環境省, 2019)。また、大気汚染物質については、ベンゼンなどの23物質を指定して、自主的な削減に努めることが決められている(環境省大気環境課, 2012)。

これらの種々の法規制や自主管理制度の整備が進む一方で、対象物質数はわが国で流通している化学物質総数の約10万物質に遠く及ばず、多種多様な未規制物質が環境中に排出されている恐れがある。特に化審法対象の物質については、年間の環境中排出量が10トンを下回る物質については、生態影響試験データの提出は不要であり、生分解性や蓄積性などのデータだけは提出される年間1~10トンの低生産物質や、構造情報のみが届け出られる年間1トン未満の少量新規物質などの届出が増加傾向(経済産業省 化学物質安全室, 2019)であるため、一つ一つの水生生物等への有害影響を及ぼす可能性が小さ

表1 化審法で通常新規化学物質に要求される生態影響試験.

試験名	藻類生長阻害試験	ミジンコ急性遊泳阻害試験	魚類急性毒性試験
対応する国際的試験法	OECD テストガイドライン No. 201	OECD テストガイドライン No. 202	OECD テストガイドライン No. 203
生物種	ムレミカツキモ(<i>Raphidocelis subcapitata</i>) またはイカダモ(<i>Desmodesmus subspicatus</i>)	オオミジンコ(<i>Daphnia magna</i>)が推奨	メダカ(<i>Oryzias latipes</i>)ほか各種指定魚種
試験期間	72時間	48時間	96時間
エンドポイント	生長速度の阻害	遊泳阻害	致死
容器	250~300mLの三角フラスコ(液量100mL)	ガラスビーカー(2mL/頭以上)	ガラス水槽 or ビーカー(L/魚体g以上)
繰り返し数と濃度区数	3連(対照区は6連)×5濃度区+対照区	4連(5頭)×5濃度区+対照区	7~10尾×5濃度区+対照区

表2 生物応答を利用した多種多様な化学物質の複合リスクの評価・管理に関する用語説明.

用語	説明
DTA	Direct Toxicity Assessment(直接毒性評価)の略で、英国で検討されていた生物応答を利用した多種多様な化学物質の複合リスクの評価・管理システムのこと。DTAの試験法等は検討・発表されたが、法規制化は行われず、自主管理ツールとなっている。
EDA	Effect Directed Analysis(影響指向型解析)の略で、ドイツ・ヘルムホルツ研究所のWerner Brack博士らが提案した、分画による前処理や網羅的化学分析、各種の生物応答試験を組み合わせることで試料中に含まれて有害影響を及ぼす原因化学物質を同定・定量する手法のこと。EUのWFD(Water Frame Directive: 水枠組み指令)の優先取組物質の選定のための大型プロジェクトが行われた。
EEM	Environmental Effect Monitoring(環境影響モニタリング)の略で、カナダにおいて金属採鉱業・紙パルプ製造業の排水や受水域に対して、化学分析・生物応答試験・野外生物調査を組み合わせることで化学物質の影響評価・管理を行う取組のこと。
TIE	Toxicity Identification Evaluation(毒性同定評価)の略で、下記の米国WETにおいて、毒性低減が必要になった際に行うTREの取り組みの一部であり、物理化学的前処理と生物応答試験を組み合わせることで毒性物質の特徴化(Phase 1)、化学分析と生物応答試験を組み合わせることで毒性物質の絞り込み(Phase 2)、そして生物応答試験による毒性物質の確認(Phase 3)の三つの段階が行われる。
TRE	Toxicity Reduction Evaluation(毒性削減評価)の略で、下記の米国WETにおいて毒性低減が必要になった際に行う、一連の作業で、使用化学物質や事業所内工程、処理プロセスなどの検討で毒性影響が削減されれば、それで経過観察となる。毒性影響の削減が難しい場合、上記のTIEが実施されて、原因物質(群)の究明が必要となる。
WET	Whole Effluent Toxicity(全排水毒性)の略で、米国で始まった生物応答を利用した多種多様な化学物質の複合リスクの評価・管理システムのこと。米国WETは、生物応答試験のみを指すのではなく、TRE/TIEも含めた生物応答を利用した毒性化学物質の削減システム全体を指し、韓国など他の国でもWETという用語が用いられている。

くても、複数物質のリスクが加算的になることで、有害影響を及ぼすことは否定できない。

こういった観点から、環境計測分野では、特定の対象物質を定めて化学物質を同定・定量するのではなく、対象を定めずに網羅的にノンターゲットで化学分析をする手法が普及され始めている。しかしながら、これらの分析手法でも、多くの場合は特定の化学物質の同定・定量やある一定の物理化学的性質の物質群の定量に重点が置かれるため、これらの物質(群)のリスクを評価するには、それらの物質群の有害性データとの照合が不可欠だが、化学物質の毒性データが存在する物質数は限られる。化学構造や物理化学的性質がわかれば、それらの有害性を推定する(定量的)構造活性相関((Quantitative) Structure-Activity Relationship: (Q) SAR)やカテゴリーアプローチ(他の類似物質の有害性データの当てはめを行なうリードアクロスなど)を利用することはできないことはない。しかしながら、類似した構造(や物理化学的性質)を有する化学物質の有害性データが存在しない場合は、この手法は利用不可能である。

こういった背景から、排水中に含まれる多種多様な化学物質の複合的な影響を直接、生物を用いて毒性試験を実施して評価・管理しようという考え方は1970年代以前から米国で始まり、Whole Effluent Toxicity(WET: 全排水毒性)と呼ばれる。同様の取組は、ドイツの排水令においても行われていて、排水の生物影響の程度がほかの化学分析による水質項目と合わせて課税制度に利用されている。我が国でも、米国のWET(表2)を参考にして、環境省が生物を用いた排水・環境水の評価・管理に生かす制度の導入を2009年度から行っており、自主管理制度としての導入の方向で検討が進んでいる(環境省水環境課, 2019)。

本稿では、このような生物を用いた排水や環境水のリスク評価・管理の概要について、環境計測の1

手法という観点から、米国WETのほか諸外国で利用されている手法や国内での状況、今後の展望について紹介する。

2. 諸外国で利用される手法

本章では、諸外国で利用されている手法の概要について示す。諸外国での制度については、既報(山本・新野, 2015; 鑑迫, 2014)ですでにまとめられているので、そちらを参照されたい。

2.1 北米

事業所排水等から公共用水域に排出される多種多様な化学物質の管理に、もっとも古くからバイオアッセイの利用が進んでいたのは米国である。単独の化学物質の濃度計測に基づく管理だけでは不十分であり、州レベルでは1950年代頃から生物応答試験の併用が広く行われてきた。

深刻な油汚染によって生じたカイヤホガ川(オハイオ州クリーブランド市)の発火によって生じた火災は、環境保護庁(USEPA: United States Environmental Protection Agency)の創設や、1972年の連邦水質汚染防止法(Federal Water Pollution Control Act, 1977年にはClean Water Act: 水浄化法に改称)の改正、全国汚染化学物質排出削減システム(NPDES: National Pollutant Discharge Elimination System)の発足につながった(環境省・国立環境研究所, 2010)。水浄化法の目的であるFishable and Swimmable(魚釣りができて泳ぐことができる)な水域を実現させるため、NPDESでは事業所からの有害汚染化学物質の排出認可(Permit)制度が定められていて、このPermitがないとこのような化学物質を公共用水域には排出できない。USEPAは有害汚染化学物質の排出を評価・管理するための技術指針文書(TSD)(USEPA, 1991)を作成しており、その中では、表3に示すような個別化学物質に特異的な化学分析(ターゲット分析)をベースにしたアプロー

表3 水質に基づく有害化学物質制御のための統合的アプローチの要素(USEPA, 1991).

アプローチ手法	可能性	限界
個別化学物質の分析	ヒト健康保護 毒性学的作用 単純な処理能力把握 挙動の理解 コスト(もし原因物質の種類が少ない場合) 影響の低減措置	毒性物質の全てを考慮できない 生物利用可能性は測定していない 混合物の複合影響を相加作用すら考慮できない 完全に実施するのは高コスト 生物への直接的な有害影響は測定していない
生物応答試験(WET)	複合影響毒性 未知物質の毒性を考慮 生物利用可能性を考慮 正確な毒性学的アプローチ 影響の低減措置	直接的にはヒト健康保護とは関係ない 不完全な毒性学(数種しか試験実施不可能) 直接の処理は難しい 残留性や底質については考慮できていない 野外環境とは異なる条件での試験実施
生物相調査	受水域での実際の影響把握 水質履歴の解析 規準以上の水質評価 全ての(未知を含む)発生源影響の評価	流れの影響は必ずしも考慮できない 影響の解釈が困難 影響の原因究明が困難 発生源の区別が困難 影響の未然防止が困難 直接的にはヒト健康保護とは関係ない

チ、排水や受水域の水試料の生物応答試験を行う WET、そして受水域の生物相調査の三つを組み合わせ「有害物質制御のための水質に基づく統合的アプローチ」が提案されている。そのため、NPDES プログラムに基づき、多くの州で WET 試験結果もクライテリアに入れている(鑑迫, 2014; 環境省・国立環境研究所, 2010; Grothe *et al.*, 1996)。利用される生物応答試験については、1970 年代には急性毒性試験が中心であったが、その後 1980 年台から短期慢性毒性試験が加わり、現時点では魚類、甲殻類、藻類など合計 16 種の試験法が公表されている (USEPA, 2002a; 2002b; 2002c)。そのリストを表 4 に示す。近年は、ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いた繁殖試験、フ

ァットヘッドミノー (*Pimephales promelas*) の胚・仔魚の試験などの淡水生物を用いた短期慢性毒性試験の利用が広く進んでいる。

米国 WET の一番の特徴は、受水域での有害影響が一定の頻度で確認された場合に、排水の Permit を有効化するためにガイダンス文書 (USEPA, 1989; 1999) に従って Toxicity Reduction Evaluation (TRE: 毒性削減評価, 表 2) を進めることが義務付けられている点である。この TRE には、使用化学物質や水処理施設の運転状況の確認のほか、各種化学分析 (金属は ICP-MS, 有機化学物質は GC-MS や LC-MS/MS, ほかに残留塩素やアンモニア等) や前処理 (C18 等の無極性樹脂, キレート樹脂等の利用による分画) による原因物質の特徴化や究明を行う

表 4 米国 WET, ドイツ排水令, 英国 DTA の試験法.

種別		試験法
米国	淡水/急性	ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>), バナーフィンシャイナナー (<i>Cyprinella leedsii</i>) ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)
		ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), カワマス (<i>Salvelinus fontinalis</i>)
		ミジンコ (<i>Daphnia pulex</i>), オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)
		シープスヘッドミノー (<i>Cyprinodon variegatus</i>)
海水・汽水/急性	シルバーサイド (<i>Menidia beryllina</i> ほか)	
	アミ (<i>Americamysis bahia</i>)	
	ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) 仔魚致死・成長	
淡水/慢性	ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) 仔魚致死・催奇形性	
	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 致死・繁殖	
	緑藻ムレミカヅキモ (<i>Raphidocelis subcapitata</i>) 生長	
	シープスヘッドミノー (<i>Cyprinodon variegatus</i>) 仔魚致死・成長	
海水・汽水/慢性	シープスヘッドミノー (<i>Cyprinodon variegatus</i>) 胚仔魚致死・催奇形性	
	インランドシルバーサイド (<i>Menidia beryllina</i>), 仔魚致死・成長	
	アミ (<i>Americamysis bahia</i>) 致死, 成長, 繁殖	
	ウニ (<i>Arbacia punctulata</i>) 受精	
	魚類胚毒性試験, ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	
ドイツ	淡水/急性	ミジンコ急性遊泳阻害試験, オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)
		藻類生長阻害試験, イカダモ (<i>Desmodesmus subspicatus</i>)
		発光細菌毒性試験, (<i>Vibrio fischeri</i>)
		変異原性試験, umu テスト
英国	淡水/急性	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 遊泳阻害試験
		緑藻ムレミカヅキモ (<i>Raphidocelis subcapitata</i>), 生長阻害
		ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) 急性毒性試験
海水/急性	底生カイアシ (<i>Tisbe battagliai</i>) 急性毒性試験	
	マガキ (<i>Crassostrea gigas</i>) 成長試験	
	海産珪藻 (<i>Skeletonema costatum</i>) 生長阻害試験	
	イシビラメ (<i>Scophthalmus maximus</i>) 急性毒性試験	

Toxicity Identification Evaluation (TIE: 毒性同定評価, 表 2) も含まれていて, USEPA からは, TRE/TIE の事例集 (Norberg-King *et al.*, 2005) も発行されている。このように, 米国では, 定期的な生物応答試験によるモニタリングだけでなく, TRE/TIE も含めて民間環境コンサルティング会社がビジネスを広く展開している。

カナダでは, Environmental Effect Monitoring (EEM: 環境影響モニタリング, 表 2) プログラム (環境省・国立環境研究所, 2012; 鍾迫, 2014; Government of Canada, 2019) が非常に大きな役割を果たしている。EEM の特徴は, 金属採鉱業や紙パルプ工業といったカナダ国内において環境影響を及ぼす恐れが高い特定の業種について, 排水放流認可が課せられている点, 一般水質項目と化学物質濃度モニタリングや生物応答試験に加え, 放流先水域での詳細な魚類等の生物モニタリング調査が含まれる点である。本稿の主眼である生物応答試験については, 以前はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の急性毒性試験, オオミジンコ (*Daphnia magna*) の急性毒性試験などの急性試験が中心であったが, 近年はニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験のほか, 影響を及ぼす水域, 土壌・底質などの媒体に応じて, 底生生物 (ヨコエビ等) や土壌生物 (ミミズ等) を用いた試験も用意されている。また, ケベック州とカナダ政府が進めるセントローレンス川アクションプラン (SLAP) (Government of Canada/State of Québec, 2003) も特徴的な手法で, ピークカットの方式を進めることで事業所排水や有害化学物質およびそれらに伴う毒性影響の大幅な排出削減に貢献したことが知られている。

2.2 欧州

国際河川などが多く国境で接することが多い欧州各国では, EU 水枠組み指令 (WFD) (European Commission, 2000) の制定に伴い, 生物応答試験の利用も進んでいる。特に WFD の優先的な取組対象化学物質の選定を目的とし, ドイツ・ヘルムホルツ研究所の Werner Brack 博士らの先導した Effect Directed Analysis (EDA: 影響指向型解析, 表 2) (Brack *et al.*, 2016) に関する EU 共同プロジェクトでも, ドナウ川等の国際河川の有害汚染化学物質の網羅的化学分析と合わせて, 前処理後に変異原性試験や急性毒性試験などの生物を用いた試験が利用された。また, WFD 遵守のため, 各国で事業所排水の管理に各種の生物応答試験の利用が進んでいるが, その状況は各国によって異なる。

たとえば, ドイツでは, 1976 年に制定された排水令 (Federal Ministry for the Environment, Germany, 2004) において, 有害化学物質に加えて魚類 (ゼブラフィッシュ: *Danio rerio*) 胚を用いた急性試験やミジンコ急性遊泳阻害試験, 藻類生長阻害試験に加え, 海洋発光細菌を用いた microtox 試験,

変異原性試験 (umu-test) などの各種の生物応答試験が事業所排水や下水処理水の管理に利用されている。また, 1994 年に制定された排水課金法 (Federal Ministry for the Environment, Germany, 2005) では, 様々な水質項目や有害化学物質と並んで, 魚類胚への毒性試験結果が課金制度に利用されている点が特徴である。フランスでも同様に, 魚類, ミジンコなどの生物応答試験の利用が進み, ミジンコ急性遊泳阻害試験は排水課金設定に利用されている (Power & Boumphrey, 2004)。

一方で, 英国では, WFD などを受けて, Direct Toxicity Assessment (DTA: 直接毒性評価, 表 2) のシステムの導入に向けた大掛かりな検討が実施されており, ガイダンス文書や試験法が公表された (Whitehouse *et al.*, 2004)。DTA において推奨されているのは, 淡水はニジマス, オオミジンコ, 藻類 (ムレミカツキモ: *Raphidocelis subcapitata*) を, 海水はカイアシヤカキ, 珪藻, イシビラメを用いた急性毒性試験である。しかしながら, 現時点では自主的な制度であり, 法的な拘束力はない。ほかにも, スウェーデン, スペインなどで法制度に利用されているが, 詳細については, Power と Boumphrey の総説 (2004) を参照されたい。

2.3 アジア・太平洋地域

隣国の韓国では, 米国 WET やドイツの排水課金制度を参考に, 個別化学物質による排水管理の限界や一般毒性と COD 等の一般水質項目との低い相関性, 複合影響等の未知の影響への懸念を理由に制度の検討が進み, 2011 年に水質生態系保全法の一部として導入 (鍾迫, 2014; Korea Ministry of Environment, 2006) されている。下水処理場と一般事業所の両方が対象になっていて, 基準を超過した場合は, 改善命令が出されて米国同様に TRE や TIE を進めなければならない。ただ, 米国とは異なり, TRE/TIE は環境公団がサポートすることで, 産業界の強い反対はあったものの現時点では大きな混乱なく運用が進んでいる。また, 2017 年には, 試験法を従来のオオミジンコ急性遊泳阻害試験の短縮法 (24 時間) から, 通常の 48 時間への延長や, 対象業種や試験法の拡大などが行われた。

台湾においても, 2013 年から制度が導入されている。工業団地専用の下水道システム, 半導体製造業, 光電材料・電子・回路基板製造業, 石油化学, 化工, 製紙などの業種のうち排水量が多い事業所に対して, 生物応答試験 (急性試験: 魚 1 種類, 甲殻類 1 種類) が要求される。中国については, ゼブラフィッシュやミジンコ, 発光細菌等を用いた試験法公示は行われたが, 法的拘束力はない。オーストラリアにおいても, シドニー近郊などの地域レベルでは排水認可制度に利用されている (Power & Boumphrey, 2004)。一方で, 東南アジア諸国では, 欧州化学品庁の化学物質の登録システムである

REACHに相当する制度導入が始まったばかりであり、諸外国の事業所でのケーススタディレベルにとどまっている。

3. わが国における生物応答試験を用いた水環境の評価・管理

3.1 環境省における検討状況

わが国では、2009年12月に公表された環境省の「今後の水環境保全に関する検討会(座長：須藤隆一東北大学大学院客員教授)」の中間とりまとめ(環境省、2009)において、水環境保全のための今後の取組の一つとして、排水規制などで対応できない未規制物質やそれらの複合影響の評価・管理に対応するための新たな排水管理手法として、生物応答試験の導入の検討が提言された。その後、環境省が国立環境研究所とともに導入に向けた検討を開始し、2010年2月には、米国EPA等の専門家を招いて「米国におけるWETシステムに関するセミナー」が開催(環境省・国立環境研究所、2010)された。2010年度からは、導入の在り方を検討する「生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会(座長：須藤隆一東北大学大学院客員教授、当時)」が設置されて、議論が本格化した。また、上述したように生物応答試験の導入のあり方は各国様々であることから、米国に加えてカナダ、韓国などの専門家を招き、2012年1月に「諸外国における生物応答を用いた排水管理手法に関するセミナー」が開催(環境省・国立環境研究所、2012)された。2013年3月には、米国WETの試験法やOECDテストガイドラインなどを参考にした表4に示す淡水3生物種(魚類、ミジンコ、藻類)を用いた「生物応答を用いた排水試験法(検討案)」(国立環境研究所・排水(環境水)管理のバイオアッセイ技術検討分科会、2013)が提案・公表された。この試験法を利用して、国内の39事業場についてのべ59排水サンプルを採取して生物応答試験を実施するパイロット事業が進められ、実際の排水への適用事例から様々な課題の抽出や検討が試みられた。

2015年11月には、「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」が取りまとめ・公表(環境省・生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会、2015)され、当面は自主管理制度としての導入が適当であるという提言がなされた。また、パブリックコメント募集が行われ、合計で87通、532件もの意見が寄せられた。寄せられた意見としては、既存の水質化学分析をベースとした排水・水環境評価との関連性に対する疑問、コスト増に伴う事業者ひいては消費者負担の問題、化学分析と比較した際の生物応答試験の信頼性確保の問題、海域・汽水域への放流や高い塩分を含む排水への対応のための海産生物試験の必要性、放流先の公共用水域への

生物応答試験の適用の必要性などが指摘された。さらに、2016年1月には一般社団法人日本経済団体連合会からは「生物応答を用いた排水管理手法(WET手法)の活用の再考を求める」という導入に向けた反対意見書(日本経済団体連合会、2016)も出された。

環境省ではそういった産業界からの強い反対に対応し、社会の合意形成を目指して、2016年6月から学識者に加えて産業界やNPO等の委員も加えた公開検討会「生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会」を計8回開催し、事業場からの排水の評価・管理に生物応答試験を用いることの有効性だけでなく、課題も含めた活用の在り方、試験法・排水改善手法等の技術的課題等を検討している(環境省水環境課、2019)。また、2017年度からは技術的な課題の解決に向けて、「生物応答試験法等検討ワーキンググループ」が組織され、14事業所で行われているパイロット事業における生物応答試験結果や原因物質究明や排水改善に関して計10回にわたり議論が行われてきた。2019年3月には第9回の公開検討会が開催され、「生物応答試験を用いた排水の評価手法とその活用の手引き(中間とりまとめ案)」および14事業所で実施したパイロット事業の事例集(案)が公表され、現在、正式版が公表されている。

3.2 わが国における生物応答試験手法

表5に示すように、生物応答試験の3種として、魚類はOECDテストガイドラインNo.212(OECD、2001)に相当するゼブラフィッシュ(もしくはメダカ：*Oryzias latipes*)を用いた胚・仔魚期短期毒性試験、甲殻類は米国WET(USEPA、2002b)と同様のニセネコゼミジンコを用いた繁殖毒性試験、藻類はOECDテストガイドラインNo.201(OECD、2006)に相当する生長阻害試験が提案されている。これらは、いずれも排水の劣化やコスト低減を意識して最大8~9日程度の期間に抑えながらも(亜)慢性毒性を調べる短期慢性毒性試験法となっている。魚類については、欧州を中心に動物愛護の観点で胚の利用が進んでいることから、胚期を中心に卵囊のある仔魚期において開口間もない時期への曝露によって、複数のライフステージにまたがっている(亜)慢性試験となっている点が特徴である。藻類については、化審法や農薬取締法などでも利用されていて、国内外で最も一般的な72時間の生長速度を調べる生長阻害試験を利用している。一方で、甲殻類については、欧州や韓国等で利用されるオオミジンコを用いた急性遊泳阻害試験ではなく、米国やカナダでの利用が多いニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験である。この手法は、ミジンコの仔虫が非常に小さいことから試験者の熟練を要することや、仔虫を得るための親虫の準備、さらには試験用の希釈水の調整などに注意が必要であるなど、一定の知識と経験を要

表 5 排水試験法(検討案)の淡水 3 生物を用いた短期慢性毒性試験.

試験名	藻類生長阻害試験	ミジンコ繁殖阻害試験	魚類胚・仔魚期短期毒性試験
対応する国際的試験法	OECD テストガイドライン No. 201	USEPA WET 試験/カナダ環境省試験	OECD テストガイドライン No. 212
生物種	ムレミカツキモ (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)かメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
試験期間	72 時間	7~8 日	8~9 日
エンドポイント	生長速度の阻害	繁殖, 致死	ふ化, 致死
容器	250~300 mL の三角フラスコ(液量 100 mL)	50 mL ビーカー(液量 15 mL)	100 mL ビーカー(液量 30 mL)
繰り返し数と濃度区数	3 連(対照区は 6 連) ×5 濃度区 + 対照区	10 連(1 頭) × 5 濃度区 + 対照区	4 連(15 個) × 5 濃度区 + 対照区

する。そのため、国立環境研究所環境リスク・健康研究センターでは、年に 2 回程度、3 日間の座学と実習を行う生態影響試験実習セミナーを開催して、試験機関の技術者養成に尽力している。

そもそも、自主管理手法としての生物応答試験の導入であれば、排水改善や原因究明の手法はもちろん、生物応答試験の手法自体についても、厳密な手順で縛られるものではない。特に試験実施技術者やコストが十分に整備されていない地方自治体の環境研究所や計量証明を行う事業所では、目的に応じてミジンコ急性遊泳阻害試験等を併用で実施するという選択肢もあり得る。また、事業所における日常管理には、当然のことながら主要な原因物質のターゲット分析(金属なら ICP-MS, 有機化学物質なら GC-MS や LC-MS/MS など)のほか、ドイツ排水令でも用いられているような簡易なバイオアッセイ(海洋発光細菌を用いた microtox 試験や、藻類遅延発光試験, 各種 *in vitro* 試験など)を利用する手もある。

なお、上述したように海産・汽水生物を利用した試験法の整備は国内では遅れている。そのため、表 5 の試験法をベースに水産庁毒性試験指針(水産庁, 2010)などを参考に、藻類は海産の藍藻 *Cyanobium sp.* や等を用いた生長阻害試験, 無脊椎動物はカイアシ類や米国 WET でも利用されているアミ(*Americamysis bahia*)を用いた(亜)慢性試験の開発を実施中である。さらに、魚類の胚・仔魚期試験についても各種の魚種について検討を実施中である。

4. おわりに

環境省では当面は生物応答試験を基準値などの伴う規制ではなく、水環境評価・管理のための自主的管理手法として広く周知を図っていく予定である。実際のところ、多種多様な化学物質が使用・廃棄されていることを考えると、排水基準や水質環境基準

に含まれない未知・未規制の化学物質や複数化学物質の複合影響について、通常の化学分析によるモニタリングだけでは十分に評価・管理できない。そのため、このような複合リスクを未然に防止するには、たとえ自主管理手法であったとしても、産業界や一般市民はもちろんのこと、広く環境計測の従事者に対して、化学分析を補完する役割としての生物応答試験について広く周知を図ることが重要である。

その一方で、産業界が指摘する課題がいくつか残っていて、生物応答試験の普及には、これらの課題を着実にクリアしていくことが求められる。一番の課題はコストである。そこで、表 5 の淡水 3 生物を用いた短期慢性試験法をベースにしながらも、目的や対象によっては、諸外国でも利用の多い急性毒性試験や簡易試験, 主要原因物質が明らかな場合は従来の化学分析手法との併用は有効といえる。別の視点から見ると、生物応答試験に基づいた環境分析手法, 水処理の普及・高度化によるコスト増は、環境関連産業の振興やより持続的社会的目標(SDGs)に考慮した企業活動や国際競争力強化にも資することが期待される。また何よりも、一般市民や消費者が安全安心な環境に対してどの程度のコスト増は許容できるのかの見極めも重要である。

二つ目の課題は、化学分析等と比較した際の生物応答試験のデータのバラつきや信頼性についての懸念が依然として大きいことである。この点については、実は大きな誤解がある。現在、様々な個別の化学物質の安全性評価値(環境基準や残留性基準値など)は、複数の生物試験の結果について、各試験の詳細や曝露側も含めた不確実性を考慮してアセスメント係数で除するなどして総合的に判断されていることが多い。それぞれの生物試験は、生物を利用している性質上、生物種, 期間, 各種の試験条件, そして個体差などの各種要因によるバラつきは当然存在する。しかしながら、いったん基準となる値が設定されると、精密な化学分析が行われることにはばか

り意識が向けられ、本来の値の不確実性について考慮することを忘れてしまう。魚やミジンコなどを用いて、混合物で変化する排水を試験すること自体に問題があるとの指摘があるが、どんな精緻な化学分析と各種モデルを組み合わせたとしても、最終的に低減させたいのは、生物への影響であることから、生物への直接影響を調べることは、不確実性が多くとも、排水の代表性を考慮し、頻度を重ねることで解決できず、それは化学分析結果と基準値を比較することでの評価・管理よりも大きく劣るとは言えないのではないか。また、各種の基準値作成のために実施されている生物試験については、優良試験所基準 (Good Laboratory Practice : GLP) の制度が整えられており、化審法や農取法・薬事法等に関連する試験が実施されている。排水について化学物質と同等の品質管理制度の確立は技術・コストの両面から難しいものの、試験機関の認証制度は可能であろう。手前味噌にはなるが、上述した年に2回程度の生態影響試験セミナーによる試験実施者の教育・訓練のほか、初代拠点長の鑑迫典久愛媛大学教授の発案で過去に2回実施しているチャレンジテスト (鑑迫ほか, 2017) などはその基礎となり得るもので、認証制度の確立により信頼性確保に貢献できればと考えている。

三つ目の課題は、試験条件が管理された実験室内で実施された生物個体に対する影響試験に基づく生物応答試験だけでは、排水などの放流先の水域の生態系へのインパクトを正確に把握することは難しいことである。そのため、受水域でのインパクトを生物調査で見極める手法について、一定の排水量を超える事業所には合わせて自主的に導入することをお勧めしたい。このように、カナダ EEM や米国 EPA が提唱する表 3 に示すような化学分析、生物応答試験、生物調査の三位一体での複合リスクの評価・管理が理想的であるといえる。

四つ目の課題は、国内種や海産・汽水生物を用いた試験法の確立である。この点については、3.2 に示すように米国 WET の海産・汽水性生物を用いた試験法 (USEPA, 2002c) や水産庁の試験法指針 (水産庁, 2010) などを参考に、現在著者が代表を務める環境省環境研究総合推進費「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発」において、瀬戸内海産水産研究所や海洋生物環境研究所、鹿児島大学などとの共同プロジェクトで試験法整備を進めているところであり、将来的に試験法案が作成されることが期待される。

五つ目の課題としては、入口規制である化審法、農取法などの化学物質の完全性評価に関する規制、排水基準等との棲み分けであり、産業界からは過剰規制との批判もある。農取法では、農地に散布された農薬類の急性的な影響を押さえるための水産動植物への農薬登録基準値を元にした制度であったが、

諸外国の制度に合わせて、より多様な生活環境動植物への影響を評価や、慢性影響ならびに底質への影響評価の組み込む検討が進んでいる。一方で、化審法では年間環境中排出量の 10 トン未満の少量多品種化が進み、十分な対応ができていない。各事業所や下水処理場が使用化学物質はともかく、排水中にどのような化学物質がどれだけ含まれ、総体としてどれだけの生物影響を及ぼす可能性があるかを完全に把握することができているとは言えないのではないか。そのため、生物応答試験によって、水生生物への有害影響をもう一つのものさしとして利用することは、安全安心で持続可能な社会の構築には重要だと考える。

最後に、この手法が広く利用されるには、生物への直接的な毒性影響を調べることの一般市民へのわかりやすさや、未知・未規制の化学物質の複合的影響の未然予防だけでなく、事業所などの産業界側にとっての動機も重要である。生物多様性保全には、特定の生物種を用いてその個体レベルでの影響を調べる生物応答試験を排水に適用するだけでなく、従来の化学分析と生物相調査との相互補完が重要である。少なくとも、持続可能な社会を目指すためには、対象とする生物種に対してだけでも有害影響が一定程度に抑えた排水を水環境に戻すということの重要性について、企業の社会貢献や社会的責任として世間全般にも広く認知されることを強く期待する。

引用文献

- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher B. I., Krauss, M. (2016) Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments – An in-depth overview. *Science of the Total Environment*, 544, 1073–1118.
- Chemical Abstracts Service (CAS), A division of the American Chemical Society (2019) *CAS Registry*SM. Retrieved from <https://www.cas.org/> (2019年2月11日確認)
- European Commission (2000) Directive 2000/60/EC Water Framework Directive.
- Federal Ministry for the Environment, Germany (2004) Waste Water Ordinance.
- Federal Ministry for the Environment, Germany (2005) Waste Water Charges Act.
- Government of Canada/State of Québec (2003) Five Year Report 1998–2003, St. Laurence Vision 2000.
- Government of Canada (2019) *Environmental effects monitoring*. Retrieved from [30](https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/managing-pollution/environmental-effects-</p>
</div>
<div data-bbox=)

- monitoring.html(2019年2月11日確認)
- Grothe, D. R., Dickson, K. L. and Reed-Judkins, D. L. (eds) (1996) *Whole effluent toxicity testing*, SETAC Press.
- 環境省 今後の水環境保全に関する検討会(2009)今後の水環境保全の在り方について(中間取りまとめ). Retrieved from
- 環境省・国立環境研究所(2010)米国におけるWETシステムに関するセミナープログラム・講演資料.
- 環境省・国立環境研究所(2012)諸外国における生物応答を用いた排水管理手法に関するセミナー講演資料.
- 環境省 生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会(2015)生物応答を利用した排水管理手法の活用について.
- 環境省(2018)「農薬取締法の一部を改正する法律の施行に伴う関係政令の整備等に関する政令」等の閣議決定について. Retrieved from <https://www.env.go.jp/press/106221.html>(2019年2月11日確認)
- 環境省(2019)PRTRインフォメーション広場. Retrieved from <http://www.env.go.jp/chemi/prtr/risk0.html>(2019年2月11日確認)
- 環境省 水環境課(2016)水質汚濁に係る環境基準 Retrieved from <https://www.env.go.jp/kijun/mizu.html>(2019年2月11日確認)
- 環境省 水環境課(2019)生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会. Retrieved from <http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf.html>(2019年2月11日確認)
- 環境省 大気環境課(2012)大気汚染防止法の概要 Retrieved from <http://www.env.go.jp/air/osen/law/>(2019年2月11日確認)
- 経済産業省 化学物質安全室(2019)化審法の施行状況(平成29年度). Retrieved from http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/sekou/sekou_h29.pdf(2019年2月11日確認)
- 国立環境研究所 排水(環境水)管理のバイオアッセイ技術検討分科会(2013)生物応答を用いた排水試験法(検討案).
- Korea Ministry of Environment (2006) *Korea Environmental Policy Bulletin*, IV, 3.
- 厚生労働省・経済産業省・環境省(2011)新規化学物質等に係る試験の方法について.
- 厚生労働省(2016)新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス.
- 厚生労働省(2019)水道水質基準について. Retrieved from <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html>(2019年2月11日確認)
- 日本経済団体連合会(2016)生物応答を利用した排水管理手法(WET手法)の活用の再考を求め一報告書「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」に対する意見.
- 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.
- OECD (2006) *Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, Guidelines for the testing of chemicals*, No. 201.
- OECD (2001) *Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, Guidelines for the testing of chemicals*, No. 212.
- Power, E. A. and Boumphrey, R. S. (2004) International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13, 377-398.
- 水産庁(2010)海産生物毒性試験指針.
- 鑑迫典久 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.
- 鑑迫典久・阿部良子・山本裕史(2017)第1回生態影響試験チャレンジテストの概要について. 第20回水環境学会シンポジウム講演要旨集.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1989) *Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations (TREs)*, EPA/600/2-88/070.
- USEPA (1991) *Technical support document for water quality-based toxics control*, EPA/505/2-90-001.
- USEPA (1999) *Toxicity reduction evaluation guidance for municipal wastewater treatment plants*, EPA/833B-99/002.
- USEPA (2002a) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, Fifth edition.
- USEPA (2002b) Short-term methods for estimation the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition.
- USEPA (2002c) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms, Third edition.
- Whitehouse, P., Johnson, I., Follow, D. M. and Chubb, C. (2004) A Regulatory framework for controlling effluent discharges using toxicity testing in the UK. *Ecotoxicology*, 13, 399-411.
- 山本裕史・新野竜大(2015)環境システム計測制御学会誌, 20(1), 5-9.



山本 裕史/Hiroshi YAMAMOTO

京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修士課程修了後、テキサス大学オースチン校大学院博士課程修了(Ph. D.)。国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト非常勤博士研究員、徳島大学総合科学部助手を経て同准教授。2016年より国立環境研究所環境リスク・健康研究センター生態毒性研究室長、2017年より同生態毒性標準拠点長、2018年より同副センター長。東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻連携講座客員教授。専門は生態毒性学、環境化学、環境工学、特に環境汚染化学物質の水生・底生生物を用いた有害性評価、環境動態。環境省の生態毒性関連の20以上の委員会委員を歴任。



渡部 春奈/Haruna WATANABE

横浜市出身。東京大学工学部都市工学科卒、同大学院工学系研究科都市工学専攻修士課程修了(工学博士)。専門は環境工学及び生態毒性学。2011年より国立環境研究所にポスドクとして着任し、現在、環境リスク・健康研究センター生態毒性研究室に主任研究員として勤務。高校の部活動の河川調査から始まって、大学で底生生物に出会い、現在も汚染底泥や河川水、工場排水等の水生生物(主にミジンコ)に対する影響を評価し、原因化学物質の推定や複合影響評価の解明に関する研究などを行っている。