

生物応答を利用した新しい排水管理手法

New Wastewater Management System Using Bioassay



鐘迫典久
Norihiisa Tatarazako

(独) 国立環境研究所
環境リスク研究センター
環境リスク研究推進室
主任研究員



藤原尚美*
Naomi Fujiwara

近年、環境中に排出された多種多様な化学物質が、複合的に水生生物に悪影響をおよぼすことが懸念されている。私たちの身の回りで使用されている化学物質は数万種とも言われているが、環境中に排出される化学物質は、ごく一部しか規制、管理されていない。総合的な影響と多種多様な化学物質が混ざり合った複合影響を調べるためには、生物応答（バイオアッセイ）技術が有効である。この技術を排水に応用した WET（Whole Effluent Toxicity）研究の日本における第一人者であられる鐘迫典久先生をお迎えし、ご講演頂いた。

It has been concerned that the chemicals discharged in the environment affect the aquatic organisms in complex. Several tens of thousands of chemicals are used in our daily life. However, few chemicals have been regulated and managed. In order to investigate combined effects of mixed various chemicals, a bioassay technology is effective. We invited Dr. Tatarazako of National Institute for Environmental Studies and he lectured us on the WET system.

まえがき

(独) 国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境リスク研究推進室の主任研究員であられる鐘迫先生は、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻の客員教授も兼任されている。また、今後の水環境保全の在り方を検討する国の各種委員会の委員を務められ、日本の水環境保全にご尽力されておられる。

今回は「生物応答を利用した新しい排水管理手法」という題目でご講演を頂いた。

1. 生物応答を用いた管理手法を導入する理由と法律

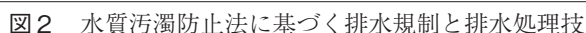
・自然界に生息する生物の反応を用いて、私たちが環境中に排出している水に含まれる化学物質の影響を総体的に評価する手法がバイオアッセイ（WET）である。この WET は、“きれいな水を地球に返す”ための“ものさし”として、有効な環境評価ツールになると考えている（図1）。



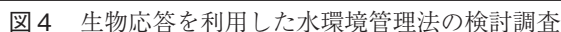
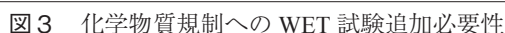
図1 WET の基本概念

・わが国の排水規制は、高度経済成長期におけるさまざまな公害問題を経て旧水質2法（水質保全法・工場排水規制法）に始まり、1970年に制定された水質汚濁防止法を柱に運用されてきた。

・ バイオアッセイによる排水管理は、海外ではすでに多く取入れられており、実用化も進んでいる。米国の WET は1995年から運用開始されている手法で、日本では数年前から環境省と国立環境研究所が中心となって検討調査し、“日本版 WET” の導入を目指している（図4）。



- ・生物応答を用いた排水管理は、前述のように海外が先行している。米国、カナダでは、1990年代には生物応答による排水管理が法律化された。その他、名称は異なるものの、図5に示すようにドイツ、フランス、オランダ、スウェーデン、フィンランド、英国などのヨーロッパ諸国でも同様の手法が用いられて実施されている。
- ・韓国の水環境行政は、2006年に水質管理から水質保存（水生生態保存）に法律上の転換があり、排出基準項目の中に生物影響がないことを満足する「TU (Toxicity Units)」の指標が盛り込まれた。管理対象施設は、排水を排出する82業種の施設のうち有害排水を排出する35業種の施設、および公営の排水処理場であり、それぞれ年に4～12回の頻度でWET試験が実施される（図6）。試験費用は個別事業所と排水処理場は事業者が負担、下水処理場は国が負担することになっている。



韓国WET導入の経緯概要

- 2006年に水質管理の法律から水質保存（水生生態保存）の法律に変更。
- その法律の排出基準項目の中に「生物影響がないことを満足する。TU $\leq$ 1」の記載あり。
 - TU $\leq$ 1；ミジンコ急性毒性試験（24時間）を用いて、排水100%でEC50を示さないこと
- 法律を遵守する手法として、WETが最も効率的・経済的だった。
- 対象と頻度
 - ①個別事業所、年4回（Output）2300か所、41億won
 - ②排水処理場、年12回（input+output）120か所、13億won
 - ③下水処理場、年12回（input+output）145か所、16億won
- 法律なので、費用は事業所負担（下水は国）、25機関で分析

図6 韓国 WET 導入の経緯概要

WETについて

- 排水管理のモニタリング（常時監視）ではなく、**排水の健全性を評価する** 健康・病気の判定
- 排水が環境に与えるインパクトを数値化し、環境に出た場合の**リスクを予知する**。検査による病気の予防

事業所の定期健康診断

WETの利用法

- 事業所の自主管理として、排水の環境影響を**数値化**（見える化）できるので、目標値の設定ができる。
- 市民に対するリスク説明、またはリスク回避が可能。
- 生態系に悪影響を与える物質（排水）を**出さない**という社会意識、倫理の明確・実現化（嫌なものは水に流す、はダメ）。



図7 WET について

WETの適用のフロー（イメージ）

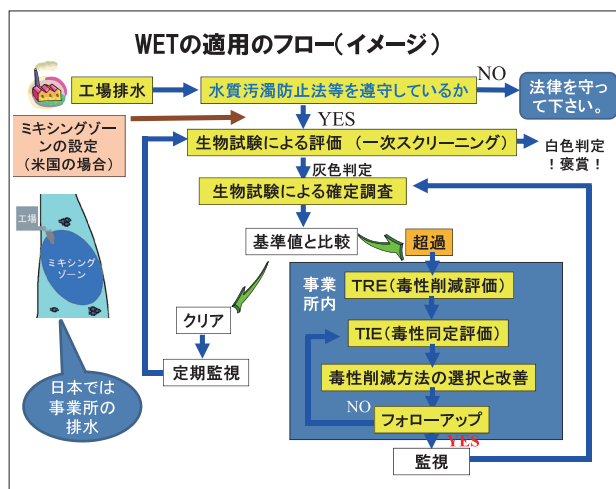


図8 WET の適用のフロー（イメージ）

生物応答を利用した排水の自主管理制度の枠組み（案）

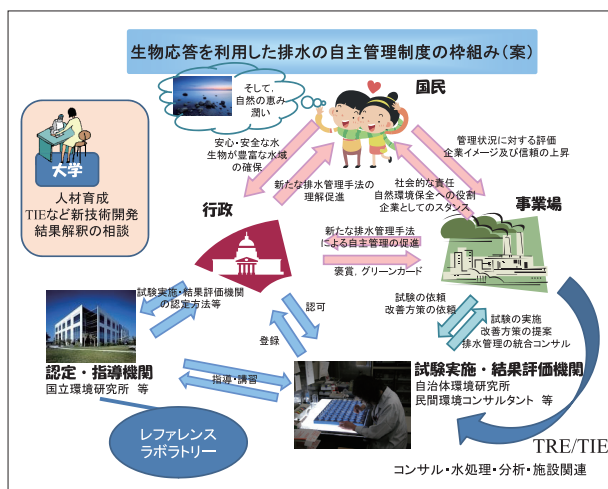


図9 生物応答を利用した排水の自主管理制度の枠組み（案）

3. 生物応答を用いた管理手法のありかた

- WET とよく間違えられるのは、工場排水を水槽に通し、金魚やコイが生きているか死んでいるか、あるいは行動異常があるかどうかというものである。これは、いわゆる生物のモニタリングであり、その影響が一過性か否かの区別には長期間の調査が必要で、原因追究から解決には長時間を要する。WET はこれと異なり、定期健康診断に近い概念である。すなわち、われわれ人間が定期的に健康診断を受け、何かの項目で引っかかった場合は自費で再検査を受け、それでも異常がある場合は入院・治療を行い、予後観察するのと同じである。WET は排水による水生生物への影響を、確立した数値によって見出し、早期発見、早期治療に結び付けようとするものである（図7）。
- WET 試験の考え方は、まず工場のキャラクターゼーションを行い、現行排水基準を満たしているかの判断をする。満たしていない場合は現行法令での措置を行い、満たしている場合のプラスアル

- ファとして WET 試験を行う。WET 試験法は確立されており、その結果は統計的に数値化できる。数値化の基本的な指標は TU であり、その排水を何倍に薄めたら供試生物に影響（NOEC: No Observed Effect Concentration）しない濃度になるか、という指標などで評価される。TU 数値は小さいほどよく、どこまでが OK であるかという線引きについては、排水基準と環境基準の関係と同じ10倍を目安にしている。WET 試験で一定の基準を超過した場合は毒性削減評価（TRE：Toxicity Reduction Evaluation）および毒性同定評価（TIE：Toxicity Identification Evaluation）へと進み、毒性物質に対する改善処置を行う（図8）。
- WET の法制化に関しては現時点では環境省の「生物応答を利用した水環境管理手法検討調査」の委員会での検討が継続されているが、未だその中での決定事項はない。そのため、以下の内容は個人的な意見であるので、その点を理解してお読みいただきたい。最初に、米国の NPDES** の

認可に相当する部分や、バイオアッセイの技術の標準化や高度化を担う機関が必要である。図9に示すように前者については国・地方自治体などのいずれの行政機関が、後者については国立環境研究所などが役割を果たすことが期待される。実際、国立環境研究所では、リファレンスラボが創設され、2011年10月、2012年6月に実際の試験を実施することが望まれる地方環境研究所職員や民間のコンサルタントなどを対象に試験法の実習セミナーを開催した。

4. 生物応答を用いた管理手法で用いられる生物試験法

- ・生物応答を用いて排水を評価するために、繁殖や初期発達など亜慢性的ないし慢性的な試験を重視し実施する。この内容は、その種の個体群維持、ひいては生態系の維持に寄与するといえる。このため日本版 WET では魚類、甲殻類、藻類といった3種の異なる生理作用を持つ代表的な水生生物での試験を検討している (図10)。
- ・魚類胚仔魚短期毒性試験は、水系生態系の最上位である魚類の *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)

慢性影響を評価するための排水の代表的な短期バイオアッセイ			
供試生物		魚類胚・仔魚期短期毒性試験	ミジンコ類繁殖試験
種類	種名	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)
	使用年齢	受精後4時間の受精卵	24時間齢未満の雌
使用数	4連/濃度区	15卵/連	10連/濃度区、1頭/連
	5連/濃度区		3連/濃度区、5,000 cells/mL
エンドポイント		胚発生、孵化、生存	生存と繁殖
試験温度、光		25±1℃、明暗光	25±1℃、明暗光
試験方法		半止水式	半止水式
暴露期間		9日間 (<i>D. rerio</i> の場合)	8日間
試験濃度		5濃度区+対照区 (例: 対照区、5、10、20、40、80%)	5濃度区+対照区 (例: 対照区、5、10、20、40、80%)
水換え		隔日 (50 mL)	隔日 (30 mL)
参照ガイドライン		OECDテストガイドライン212 EPA-600-4-91-022 Test method number 1002	Environment Canada EPS1/RM/21 EPA-600-4-91-022 Test method number 1002

図10 慢性影響を評価するための排水の代表的な短期バイオアッセイ

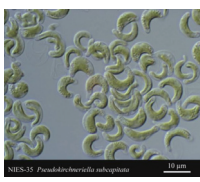
藻類生長阻害試験	
■ 概要：植物プランクトンである緑藻類の細胞増殖にあたる影響を調べる。光合成阻害、細胞壁合成阻害、細胞分裂阻害などの影響を検出。結果の再現性が高い。 ・ 供試生物： <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (和名：ムレミカヅキモ) ・ エンドポイント：対数増殖期にある藻類を、種々の濃度の試験物質に暴露し、各暴露濃度区の細胞増殖数を試験開始から72時間後まで24時間ごとに測定し、対照区と比較して増殖速度が50%阻害した濃度 (EC50) および無作用影響濃度 (NOEC) 等を求める。	
	

図12 藻類成長阻害試験

を用い、毒性に対する感受性が高いと考えられる卵、孵化および仔稚魚を試験物質に9日間暴露して、孵化率、稚魚死亡率等から排水の影響を評価する (図11)。

- ・藻類成長阻害試験は、生態系の最下層の位置付けである藻類の *Pseudokirchneriella subcapitata* (ムレミカヅキモ) を用いて、細胞増殖に与える影響を調べる試験である。光合成阻害、細胞壁合成阻害、細胞分裂阻害などを検出するが、試験結果の再現性は高い。増殖期の藻類を種々の濃度の排水に暴露して72時間までの増え方をカウントして排水の影響を評価する (図12)。
- ・ミジンコは生態系の植物プランクトンの捕食者、魚の被捕食者として生産量のバランス調整を担っている。化学物質に対する感受性が比較的高く、環境毒性評価に使用される。ミジンコ類繁殖試験では、*Ceriodaphnia dubia* (ニセネコゼミジンコ) という比較的小さいミジンコが用いられ、産仔に対する影響を調べる。ニセネコゼミジンコは、ライフサイクルが短いので試験期間が短くでき、排水の変質を防ぐという意味でもメリットがある (図13)。

魚類胚仔魚短期毒性試験 (OECD TG212)	
・ 概要：水系生態系の中で最上位にいる魚類を用い、毒性に対する感受性が高いと考えられている卵、孵化および仔稚魚を試験物質に暴露して、その影響を調べる。 ・ 使用魚： <i>Danio rerio</i> (ゼブラフィッシュ) ・ ゼブラフィッシュの受精後4時間以内の卵から曝露開始。発生、孵化および仔魚期を含む10日間観察 ・ エンドポイント：孵化率、稚魚の死亡率、奇形発生率 ・ 半止水試験 (24時間ごとに水を交換)	
	

図11 魚類胚仔魚短期毒性試験

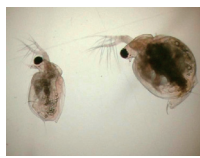
ミジンコ類繁殖試験	
・ 概要：ミジンコは生態系の植物プランクトンの捕食者、魚の被捕食者として、生物量のバランス調節を担っている。化学物質に対する感受性が比較的高く、環境毒性評価に使用される。 ■ 供試生物： <i>Ceriodaphnia dubia</i> (和名：ニセネコゼミジンコ) ■ エンドポイント：生後24時間以内の <i>ceriodaphnia dubia</i> を用い、種々の濃度の試験物質に暴露し、7日間 (+1日) にわたり毎日観察、給餌、換水および産仔幼体の計測を行う。各濃度試験液中の7 (+1) 日目の合計産仔数と対照区の合計産仔数について統計的有意差を求める。 ■ 半止水試験 (24時間ごとに水を交換)	
	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	

図13 ミジンコ繁殖試験

- ・ 国立環境研究所環境リスク研究センターで実施した工場排水の WET 試験結果を図14, 15に示す。図14はミジンコ類繁殖試験結果の一例であるが排水量の比率が大きい（希釈倍率小）ほど産仔数が少なくなっている。図15は4種生物を用いて12事業所の排水を試験した結果であるが、TOC濃度と毒性（TU 値）には相関関係がないことを示している。また、事業所によって影響を示す生物試験とその強度は異なっており、WET 試験結果が排水のキャラクターを示していることがわかる。
- ・ 3種類の重複具合を図16に示した。3種類のバイオアッセイすべてに反応したのは1事業所しかなく、排水中の成分構成の違いが影響を与える生物の違いに現れていると考えられる。
- ・ 米国では、WET 試験を導入して排水の判断基準を設定した場合、基準を超過する排水はその毒性の低減が義務付けられている。このため一連の手順が EPA *** によって TRE として定式化されて

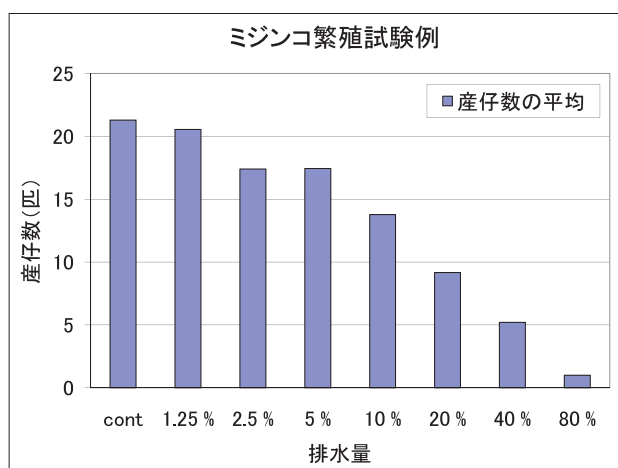


図14 ミジンコ繁殖試験例

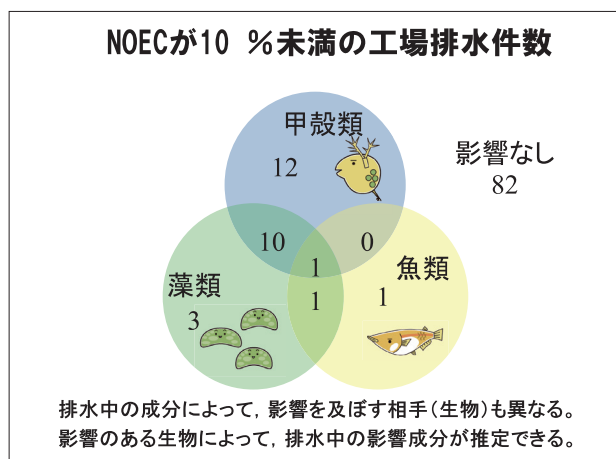


図16 NOEC が10 %未満の工場排水件数

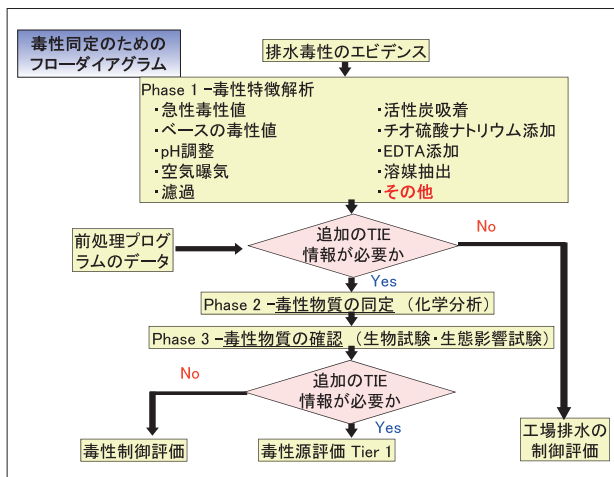


図18 毒性同定のためのフローダイアグラム



図19 東洋インキグループの取組みの公表

からさらに毒性原因物質群を特定するアプローチと、毒性処理アプローチのどちらかに進む。

- ・TIE とは、排水毒性の原因物質（群）を探索する一連の手順であり、図18に示すように、米国のWETでは、3つのフェーズで構成されている。第1フェーズでは、どのような物理的・化学的特性を有する物質（群）が排水毒性に寄与しているかを解析する。具体的には、未処理の排水試料と物理的・化学的操作を行った排水試料の両者についてWET試験を実施する。第2フェーズでは、第1フェーズで推定された毒性物質（群）の分析を行う。毒性試験を用いながら毒性物質の含まれる画分を分離、濃縮し、最終的にはクロマトグラフィー、原子吸光光度計などにより原因物質（群）と推定される物質の濃度を測定する。第3フェーズでは、推定された毒性物質が実際に排水毒性に寄与しているかどうかを確認する。毒性物質濃度と毒性強度の相関、供試生物種の毒性物質に対する感受性の相違、添加実験、物質収支などを利用する。
- ・近年、企業の社会責任（CSR）が強く叫ばれている。このため、事業所の自主管理ツールとして、WETをCSR活動の一環として用いることにより、企業価値（ブランド力、信頼など）の創造などに活用できる（図19）。
- ・「生物は嘘をつかない」。WETはヒトの健康や生



図20 WET試験の意義

活環境の“安全”を担保にするものではないが、水生生物が保全される水環境をつくることによって、“安心”の指標を提供できるのである（図20）。

むすび

日本におけるバイオアッセイは「安い、早い、誰でもできる」というイメージがあるが、決してそうではなく、厳密に試験を行えば繰返しの再現性も高く、結果の信用性も高い。そしてバイオアッセイは、機器分析の代替法ではなく、機器分析では得られない情報を得ることができる独立した手法である。WETの導入を通じて機器分析とバイオアッセイの相互の理解が進むことを期待する。

* (MTC) 分析試験室 **米国汚濁物質防止削減制度（プログラム）National Pollutant Discharge Elimination System

***米国の環境保護政策を主管する独立行政機構 Environmental Protection Agency