

WET 試験の概要と標準物質を用いた感受性試験

Sensitivity Test with WET Method and Standard Chemicals



藤原尚美
Naomi Fujiwara

WET（Whole Effluent Toxicity: 全排水毒性）とは、排水中に混ざり合った化学物質の毒性を、水生生物を用いた生物応答により評価する方法である。個々の化学物質では生物に影響がみられない場合でも、複数の化学物質が複合することにより生物に影響が認められる場合がある。この手法では、一つ一つの化学物質を測定するのではなく、排水中の化学物質の複合影響を調べることができる。WET 手法においては、試験に用いる生物の感度（感受性）が重要な要因であるため、塩化ナトリウムと塩化亜鉛のニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いた感受性試験を行い試験精度の確認を行った。

WET（Whole Effluent Toxicity） is a bioassay method to evaluate the mixture effect of chemical toxicities including metals. In this method, we do not measure each metal, but only check the mixture effect of chemicals in the effluent. In this report, we confirmed the sensitivity of Daphnia (*Ceriodaphnia dubia*) to the standard chemical substances, sodium chloride and zinc chloride by the sensitivity test.

Key Words :

全排水毒性
生物応答
複合影響
感受性試験

WET（Whole Effluent Toxicity）
Bioassay
Mixture effect
Sensitivity test

【セールスポイント】

水生生物への化学物質の複合影響を把握することにより、化学物質を単独ではなく混合物（群）として評価するため、排水の新しい化学物質管理方法として活用できる。

まえがき

日本では、1960～70年代の高度成長期に事業所や一般家庭の排水が、湖沼、河川、海域に流出し水質汚濁が大きな問題となった。このため、1970年水質汚濁防止法が制定され、現在、水質環境基準として健康項目27種および生活環境項目12項目、排水規制として健康項目28物質および生活環境項目15項目が設定されており、行政による公害防止のための着実

な規制の実施と事業者の自主管理によって、着実に、規制項目の改善がみられている。しかし、各種産業分野での技術の進歩にともない、日々増え続ける化学物質は数万種となっており、現状の環境基準項目では補えない状態になってきている。また、多くの場合、事業者から排出される排水には、多岐にわたる化学物質が混在しており、化学物質の複合的な影響もあると考えられる。これら化学物質の複合

影響を評価する手法として、欧州や北米など諸外国では、生物応答（バイオアッセイ）が用いられている。もっとも先進的な例としては、米国のWETシステムがあげられ、魚類・ミジンコ・藻類の3種の短期慢性毒性試験をもとに、事業所排水の毒性を総合的に評価し、その結果をもとに毒性削減評価（Toxicity Reduction Evaluation: TRE）や毒性同定評価（Toxicity Identification Evaluation: TIE）を実施している。国内においても、2009年から環境省が米国のWETシステムや海外の他の事例（OECD^{*}、U.S. EPA^{**}）をもとに、生物応答を用いた排水管理法についての検討会を立上げており、2012年度にはWET法のガイドライン（生物応答を用いた排水試験法（検討案）：以下「検討案」）が提案されている。本稿では、水生生物を用いた生物応答試験（WET法）を紹介するとともに、試験対象となるミジンコの毒性感受性について標準物質を用いた感受性試験の結果を紹介する。

1. 生物応答試験の概要

1.1 魚類胚・仔魚期短期慢性毒性試験

魚類胚・仔魚短期毒性試験は、魚類にとって重要かつ外的要因を受けやすい胚期・仔魚期を中心とした初期生活史段階を対象にした慢性毒性試験である。魚類の胚を受精直後から孵化後の卵黄吸収完了の直前まで試験対象排水に暴露し、暴露中の死亡数および受精卵の発生等に異常が認められる胚体数を調べ、致死および慢性影響を推定する。試験に用いる生物種は、小型魚が適しており、ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）、メダカ（*Oryzias latipes*）、ファットヘッドミノー（*Pimephales promelas*）が多く用いられる。上記3種の中で、孵化期間（＝試験期間）が短く、採卵等が容易であることから検討案ではゼブラフィッシュが採用されている。

1.2 ミジンコ繁殖試験

ミジンコ繁殖試験は、試験対象排水に生後24時間以内の雌ミジンコを暴露し、単為生殖する雌ミジンコの産仔や親ミジンコの状態（生死）を繁殖阻害等の指標を用いて評価する慢性毒性試験で、排水の致死および慢性影響を推定できる。一般的に、オオミジンコ（*Daphnia magna*）が化学物質の環境影響評価に広く利用されて、国内でも主流の生物であるが、暴露期間においてオオミジンコの試験21日間にに対し、ニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）の試験は8日間であるため、試料の変質等を考慮し、検討案では、暴露期間が短時間で実施可能なニセネコゼミジンコを用いている。

1.3 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験は、試験対象排水に指数増殖期にある単細胞藻類を72時間暴露し、その生長速度を評価することにより、排水の藻類生長に対する急性毒性および慢性毒性を明らかにする手法である。OECDガイドラインでは藍藻（*Synechococcus leopoliensis*）や珪藻（*Navicula pelliculosa*）も推奨されているが、検討案ではもっとも汎用される緑藻であるムレミカヅキモ（*Pseudokirchnerie subcapitata*）が採用されている。

本試験は、化学物質影響評価法として、世界中で数多く実施されており毒性値のデータも多く報告されている。藻類の生長には窒素やリンなどの栄養塩が必須であるため、栄養塩の有無が試験結果に影響を及ぼすことに留意する必要がある。

2. 試験方法および条件等

2.1 ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期慢性毒性試験

2.1.1 試験操作

慢性毒性試験においては、対象排水を段階的に希釈し、各希釈段階における生物への影響を評価することにより対象排水の毒性を評価する。本試験では対象排水の希釈段階を5%～80%の5段階とし、対象排水を含まない希釈水を対照区とした。また、試験における同一濃度での繰り返し数（n数）は4とした。

試験に用いる胚は、受精後4時間以内のものを用いた。ここで受精時間とは、暗所に放置したゼブラフィッシュに、ライトを点灯後1時間の時点で産卵が確認された卵を受精時間「0」として扱った。暴露開始後は、毎日、胚発生を観察した。観察項目は、形態異常の有無（発生停止、眼球形成不全、血管形成不全）および、死亡、孵化とした。孵化後は8日目まで暴露を継続し、形成異常（遊泳不能）、死亡について観察した（図1、2）。

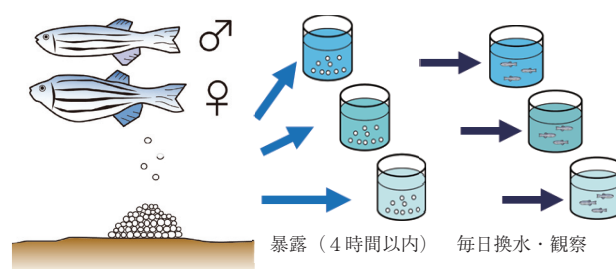


図1 魚類胚・仔魚期短期慢性毒性試験

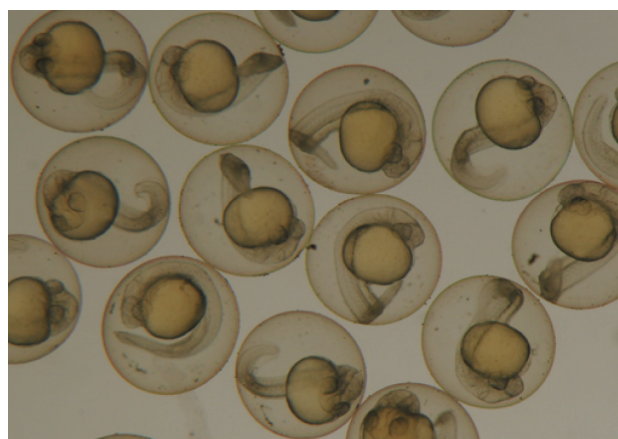


図2 ゼブラフィッシュの受精卵

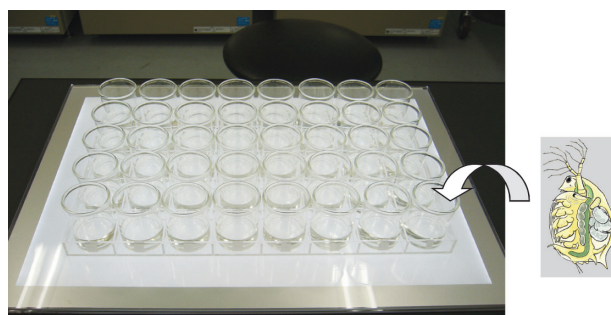


図4 ニセネコゼミジンコ飼育風景

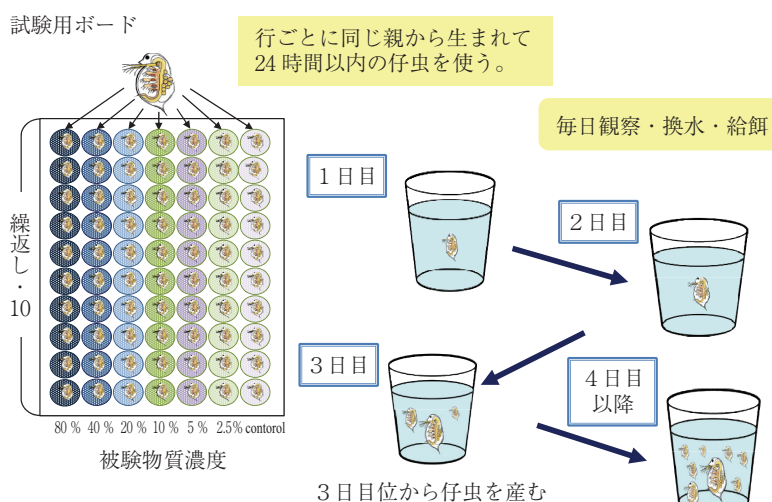


図3 ニセネコゼミジンコ繁殖試験

2.1.2 試験成立の条件

以下のいずれかに該当する場合には本試験は不成立とした。

- ・対照区における孵化率が80 %に満たない場合。
- ・対照区における暴露終了時の生存率が70 %に満たない場合。

2.2 ニセネコゼミジンコ繁殖試験

2.2.1 試験操作

試験における同一濃度での繰返し数（n 数）は10，対象排水の希釈倍率は5 %～80 %の5段階とし対象排水を含まない希釈水を対照区とした。このとき，同じ親から産まれた同一腹仔の仔虫をすべて希釈段階に1個体ずつに配置し，これを一群とし，その群の繰返し数（10）を用意した（図3）。暴露開始後は，毎日，ニセネコゼミジンコの生死観察と生まれた仔虫の計数を行い，観察結果を記録した。試験は対照区の試験個体の60 %以上が3回目の出

産をした時点で終了し，最長でも試験期間は8日間とし，他の暴露区の産仔も集計する（図3，4）。

2.2.2 試験成立の条件

以下のいずれかに該当する場合には本試験は不成立とした。

- ・対照区の試験個体の死亡率が20 %を超える場合。
- ・8日間に対照区で試験個体の60 %以上が3回出産しない場合。
- ・対照区にて生存仔虫数が，最初の3回目の出産を平均して15に満たない場合。

2.3 藻類生長阻害試験

2.3.1 試験操作

試験における同一濃度での繰返し数（n 数）は3，対象排水の希釈倍率は5 %～80 %の5段階とし対象排水を含まない希釈水を対照区とした。前培養したムレミカヅキモの生物量を測定し，試験溶液中の初期生物量が 5×10^3 cells/mLとなるように調

整した。暴露開始後，24，36，72時間後に生物量を測定し，ムレミカヅキモの生長に対する影響も評価した。窒素，リンなどの栄養塩による影響を確認するため，試験実施時には，窒素，リンを添加する場合と添加しない場合の2パターンの試験を実施した（図5，6）。

2.3.2 試験成立の条件

以下のいずれかに該当する場合には本試験は不成立とした。

- ・ 対照区の生物量が暴露期間中に少なくとも16倍（3世代）に増殖しない。
- ・ 対照区の毎日の成長速度の変動係数***が暴露期間を通じて35 %を超えないこと。
- ・ 対照区の繰返し間の成長速度の変動係数が7 %を超えないこと。

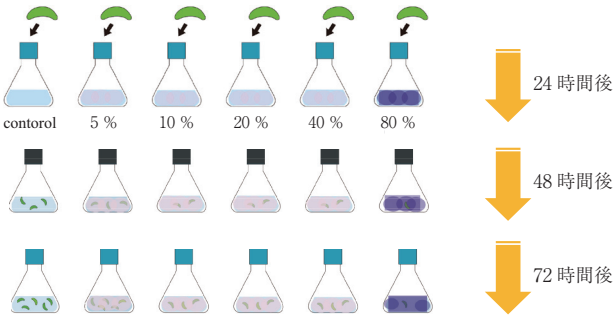


図5 ムレミカヅキモ生長阻害試験

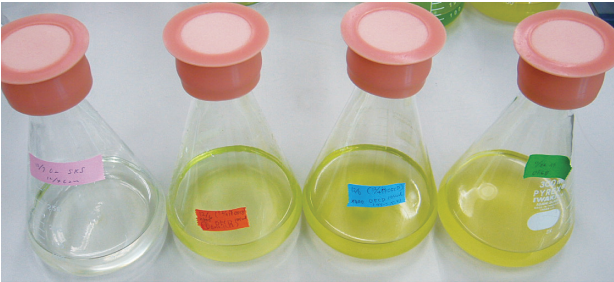


図6 ムレミカヅキモの時間経過による生育状況

3. 統計解析—NOEC（No Observed Effect Concentration: 最大影響濃度）の算出

各試験のエンドポイントについて，対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められたもっとも低い試験濃度を LOEC（Lowest Observed Effect Concentration: 最小影響濃度），その一つ下の試験濃度を NOEC とする。すべての試験濃度において，いずれの影響指標値も対照区と有意差が認められなかった場合は，もっとも高い試験濃度を NOEC とし，LOEC は推定しない。

有意差検定は対照区と複数濃度区を比較する多重比較法によって求める。

4. 標準物質を用いた感受性試験の実施

4.1 試験に使用した生物

ニセネコゼミジンコ

4.2 試験方法と観察期間

2.2.1のニセネコゼミジンコ試験操作をもとに試験を行い，8日間，毎日，仔虫の数を目視にて観察した。

4.3 使用した標準物質

使用した標準物質と濃度範囲および生物に標準物質が影響を与える評価方法を表1に示した。

4.4 試験結果

塩化ナトリウムと塩化亜鉛を用いて，IC25（25 % Inhibitory concentration: 試験生物の25 %に影響を与える割合），試験回数，変動係数を表2にまとめた。試験結果から，飼育水に塩化ナトリウムが0.58 g/L 以上含まれると，ニセネコゼミジンコの産仔に阻害があることが判明した（図7）。塩化亜鉛では，飼育水に41.3 μg/L 以上含まれるとニセネコゼミジンコの産仔に阻害があることが判明した（図8）。

試験精度の確認は，標準偏差（ $\sqrt{\sigma^2}$ ）を算術平均（ $\bar{x}$ ）で割った変動係数にて評価を行った。WET 試験に対する変動係数の許容値は定められていないため，生物試験よりも高い精度が求められる機器分析の有機物に求められる変動係数20 %以下を参考とした。表2から，塩化ナトリウム，塩化亜鉛ともに

表1 標準物質と濃度範囲

標準物質	濃度範囲	評価方法
塩化ナトリウム	0.5～8 g/L	飼育水の平均出産数を対照として，5段階濃度（濃度範囲0.5～8 g/L）でのニセネコゼミジンコの出産率を比較し，統計処理結果にて生物に影響のあるかないかの境界線の濃度を算出する。
塩 化 亜 鉛	2～240 μg/L	飼育水の平均出産数を対照として，6段階濃度（濃度範囲2～240 μg/L）でのニセネコゼミジンコの出産率を比較し，統計処理結果にて生物に影響のあるかないかの境界線の濃度を算出する。

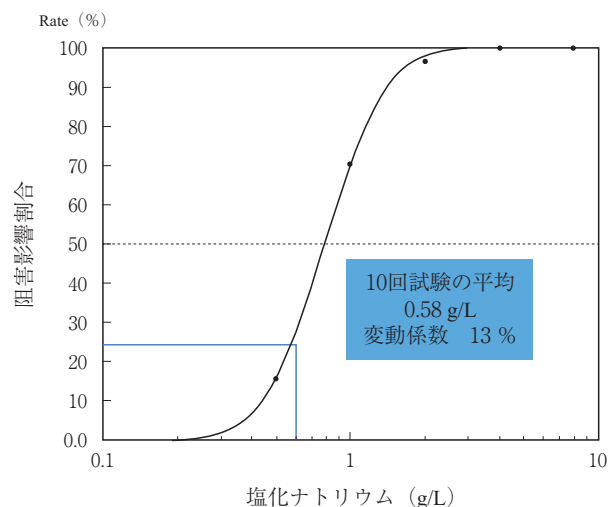


図7 塩化ナトリウムを用いた感受性試験

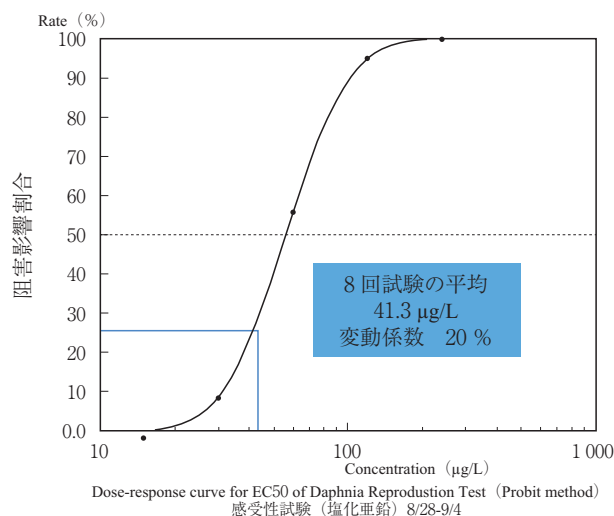


図8 塩化亜鉛を用いた感受性試験

表2 試験結果

標準物質	IC25	試験回数	変動係数
塩化ナトリウム	0.58 g/L	10回	13 %
塩化亜鉛	41.3 μg/L	8回	20 %

変動係数20 %以下となり、機器分析で求められる精度を確保している結果となった。今後は、このデータをもとにして、試験精度の確認を継続する予定である。

むすび

WET法は、水生生物への化学物質の複合影響を直接的に評価するため、排水の新しい化学物質管理方法として活用できる。本法は、排水のリスク評価だけではなくリスク予知への活用も期待できる。一般的に、生物応答試験は生物個体のバラツキから、簡易的評価法というイメージをもたれるが、本法は厳密に試験を行えば繰返し再現性も高く、結果の信頼性も高い。WET法は、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有用な手法として、今後の発展が期待される。今後は、WET法で得られた情報をもとに、毒性物質

の原因追究、毒性改善などの検討を行う予定である。

【参考文献】

- 1) 環境省；水環境関係ホームページ (<http://www.env.go.jp/water/mizu.html>) (2013年4月確認済)
- 2) 環境省；水質汚濁に係る環境基準について、環境庁告示第59号，昭和46年12月28日
- 3) 環境省；生物応答を用いた排水試験法（検討案），排水（環境水）監理のバイオアッセイ技術検討分科会
- 4) OECD; Fish, Short-term Toxicity Test on embryo and Sac-Fry stages, OECD Guidelines for Testing of Chemicals No.212 (1998)
- 5) USEPA; WET test Method 1002.0 Daphnid, Ceriodaphnia dubia, Survival and reproduction test, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition, pp.112-140
- 6) OECD; Freshwater Alga and Cyanobacteria, Grow Inhibition Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals No.201 (2006)
- 7) 鎌迫典久，水上春樹；今後期待される環境管理手法～WET（生物指標を用いた水質評価），バイオサイエンスとインダストリー，67（1），32-38（2009）
- 8) 鎌迫典久；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（8），426-432（2006）

*経済協力開発機構 **米国環境保護庁 ***標準偏差 ($\sqrt{\sigma^2}$) を算術平均 ($\bar{x}$) で割ったもの。