

日本版 WET の導入と毒性改善 (TRE/TIE) の取組み

Introduction and Applications (TRE/TIE) of the Japan Version of WET



藤原尚美*
Naomi Fujiwara



野中信一**
Shinichi Nonaka



豊久志朗***
Shiro Toyohisa

生物影響試験を利用した排水水質管理手法 WET (Whole Effluent Toxicity: 全排水毒性) は、すでに、欧米では制度として導入されており、我が国においても、環境省にて日本版 WET としての導入 (法制化) が検討されている。当社は、WET の法制化に備え、生物影響試験を習得し、さらに、生物影響試験の結果、生物に対する影響が認められた場合の毒性削減評価 (TRE: Toxicity Reduction Evaluation) と毒性同定評価 (TIE: Toxicity Identification Evaluation) について検討を進めてきた。本報では、生物影響試験の信頼性確保に不可欠な、健全な供試生物を飼育できているかを確認するためゼブラフィッシュ、ニセネコゼミジンコ、ムレミカヅキモの感受性試験と、生物影響試験の結果、ミジンコに対して生物影響が認められた金属製品製造工場排水の毒性改善の検討結果について報告する。当社で飼育している、3種類の生物に対して、毒性標準物質を用いた感受性試験を実施したところ、それらは、毒性に対して十分な感受性を有しており、供試生物として適切に飼育・管理できていることが示された。また、ミジンコに対して生物影響が認められた金属製品製造工場排水については、TRE/TIE を実施して、毒性要因物質が Zn, Ni であると推察できること、および、Fe 系凝集剤を用いることにより毒性が改善できることを明らかにした。

The Whole Effluent Toxicity (WET) wastewater quality management technique that uses aquatic organisms has already been introduced in the USA. In Japan, the Ministry of the Environment is exploring the introduction and applications of a Japan version of WET by way of legislation. We practiced biological influence testing in preparation for the WET legislation and investigated the Toxicity Reduction Evaluation (TRE) and Toxicity Identification Evaluation (TIE) that would be required in order to identify the effluent characteristics causing toxicity when the result of biological influence tests indicate an effect exceeding a certain level. This paper reports on sensitivity testing we did to confirm whether healthy aquatic organisms (*Danio rerio*, *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) essential for ensuring the reliability of biological influence testing can be bred or not using bioassays, as well as results of investigations into the toxicity improvement of effluent from a metal manufacturing plant that *C. dubia* was found to be biologically effective against. Sensitivity tests were conducted on the three types of aquatic organisms we bred using a standard toxic substance and indicated sufficient sensitivity to toxicity in all three cases, thus proving that the test organisms can be properly bred and managed. We also conducted TRE/TIE on effluent from a metal manufacturing plant that *C. dubia* was found to be biologically effective against. As a result, we identified Zn and Ni in the effluent as possible major toxicants and proved that toxicity could be reduced using an Fe coagulant.

Key Words :

全排水毒性
生物影響試験
毒性削減評価
毒性同定評価
企業の社会的責任

WET (Whole Effluent Toxicity)
Bioassay Test
TRE (Toxicity Reduction Evaluation)
TIE (Toxicity Identification Evaluation)
CSR (Corporate Social Responsibility)

【セールスポイント】

水生生物を用いた生物影響試験による総合的な排水の安全性評価 (WET) は、一般市民にも理解されやすいことから、大企業を中心に CSR (Corporate Social Responsibility: 企業の社会的責任) に取入れる事業所が増加している。生物影響試験により生物影響が認められた場合、当社の水処理技術の経験とノウハウを活かした TRE/TIE を実施することにより、顧客に対して、改善策を提案することが可能となり、顧客の環境改善への取組みに貢献できる。

まえがき

近年、生活や産業の高度化により多種多様な化学物質が環境中に放出されており、野生生物やヒトへの健康被害に対する関心が高まっている。WHO (世界保健機構) では、飲料水水質ガイドラインに新たな生物影響試験が導入されており¹⁾、米国ではすでに基準値が設定され、運用されている。さらに米国では、工場排水にも生物影響試験が適用され、US-EPA (米国環境庁) による WET システム (米国版 WET) が実施されている²⁾。米国版 WET では、基準値を超過する生物影響が認められた場合、毒性要

因物質の同定や除去方法の検討により、排水の生物影響を削減することが義務づけられている。その工程は TRE (Toxicity Reduction Evaluation: 毒性削減評価)/TIE (Toxicity Identification Evaluation: 毒性同定評価) と呼ばれ、毒性要因物質の同定から削減までの実施手順書が US-EPA により示されている³⁾。

～日本版 WET～

一方、わが国では、工場排水の規制値は、水質汚濁防止法に基づく生活環境項目15項目と、健康項目28項目のみであり⁴⁾、日々増え続けている多様な化学物質への管理が十分に行われているとは言えない

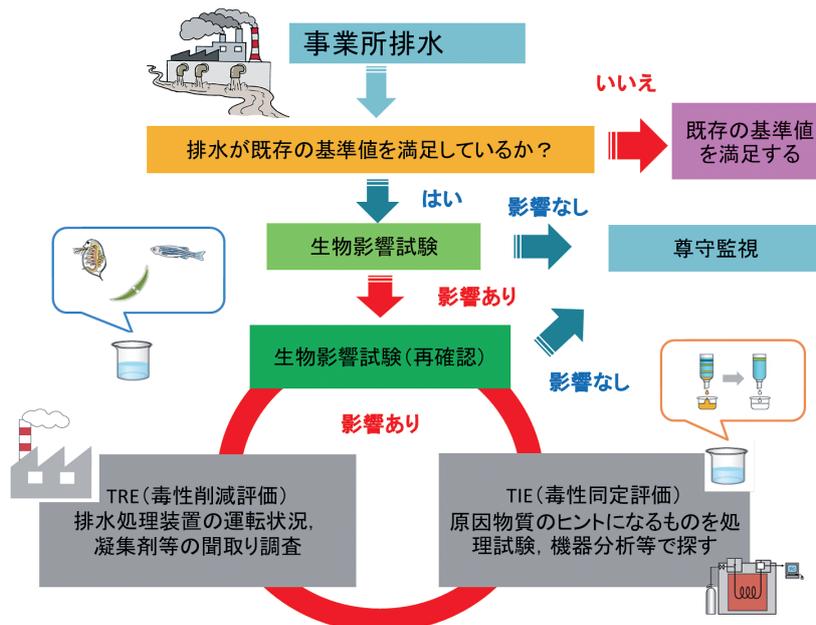


図1 日本版 WET の適用フロー

現状にある。そこで、環境省を中心に、総体的に排水中の化学物質の影響を評価する手段として、「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」⁵⁾（以下、「検討案」）が作成され、事業所排水への適用が検討されている。日本版 WET では、まず、自主管理制度としての導入が検討されている⁶⁾が、制度が浸透するにつれ、将来的には、規制へと移行していくものと予想される。

当社は、WET の法制化に備え、生物影響試験を習得し、さらに、生物影響試験の結果、生物に対する影響が認められた場合の毒性同定評価（TIE）と毒性削減評価（TRE）について検討を進めてきた。

本報では、生物影響試験の信頼性確保に不可欠な、健全な供試生物を飼育できているかを確認するための毒性感受性試験と、生物影響試験の結果、ミジンコに対して生物影響が認められた金属製品製造工場排水の毒性改善の検討結果について報告する。

1. 感受性試験による試験精度と信頼性確保の検証

生物影響試験の試験結果の精度と信頼性を保証するために、定期的に毒性標準物質を用いて、ニセネコゼミジンコ（ミジンコ）、ゼブラフィッシュ（魚）、ムレミカツキモ（緑藻）の毒性感受性試験を実施している。ここでは、その一例として、藻類感受性試験について紹介する。

1.1 緑藻感受性試験方法

ムレミカツキモを用いた感受性試験（生長阻害試験）は、「検討案」に準じて行った。試験における同一濃度での繰返し数（n 数）は、対照区は 6 連、濃度区は 3 連とした。試験濃度は公比 2 として、5%、10%、20%、40%、80% の 5 濃度区を設定した。5 濃度区の二クロム酸カリウム（毒性標準物質）濃度は、0.125 mg/L、0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L とした。前培養した供試生物の生物量を測定し、試験溶液中の初期生物量が 5×10^3 cell/mL となるように希釈調整し、試験溶液に添加した。ばく露開始後、24、36、72 時間後に 1 mL あたりの細胞数を測定した。試験成立条件は、表 1 のすべての項目を満足することとした。

試験結果の統計解析には、日本環境毒性学会の

EcoTox-Statistics⁷⁾ の TG201 を用いた。Bartlett 検定と Dunnett 多重比較検定を算出し、対照区と各濃度区とを比較した。判定は、Bartlett 検定で等分散性が認められた場合は、パラメトリック手法による一元配置分散分析（ANOVA）により試験区間内に有意差があるかを検定した。等分散性が認められない場合は、ノンパラメトリック手法により有意差があるかを検定した。有意差が認められた場合は、Dunnett 多重比較検定にて、危険率 5% 未満を有意として、NOEC（No Observed Effect Concentration: 無影響濃度）を推定した。有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区以上とした。

1.2 緑藻感受性試験結果

緑藻試験成立条件（表 1）のデータと NOEC を用いた健全性の確認データを図 2 に示す。試験成立条件である対照区の①増殖倍率は 158~332 倍 ②生長速度の変動係数は 15~32% ③繰返し間の生長速度の変動係数は 1~5% となり、すべての項目において成立条件を満足することができた。毒性標準物質を用いた NOEC も 0.25 mg/L で安定しており、生物の適正な飼育・培養を行っていることが確認できた。供試生物の感受性試験は定期的実施しており、生物影響試験の信頼性を確保している。

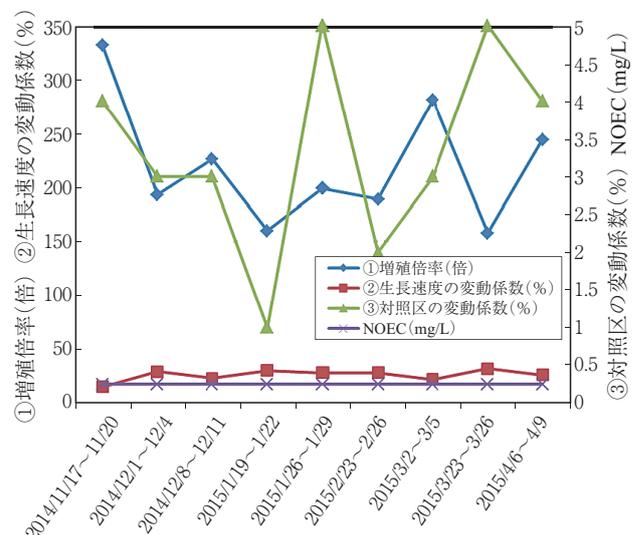


図 2 ムレミカツキモの健全性管理データ

表 1 緑藻生長阻害試験成立条件

- | |
|--|
| ① 対照区の生物量がばく露期間中に少なくとも16倍増加すること |
| ② 対照区の毎日の生長速度の変動係数がばく露期間を通じて35%を超えないこと |
| ③ 対照区の繰返し間の生長速度の変動係数が7%を超えないこと |

表2 ミジンコ繁殖試験成立条件

①	対照区の試験個体の死亡率が20%以下であること
②	対照区の試験個体にて最大8日間に60%以上が3腹分の産仔をしていること
③	対照区の試験個体の合計産仔数が、最初の3腹分を平均して15個体以上であること

2. TRE/TIE による毒性要因物質の推定と削減⁸⁾

水質汚濁防止法の水質基準を満足している金属製品製造工場排水の生物影響試験を実施したところ、ミジンコへの影響が確認された。そこで、ミジンコに対する生物影響削減を目的に、TRE/TIE手法による毒性要因物質の推定と削減方法の検討を行った。

排水の化学分析結果、排水の生物影響試験結果、および事業者への聞き取り調査結果をもとに、毒性要因物質を推定し、その除去試験を実施して、除去前後の生物影響試験結果を比較した。そこで影響が軽減されていれば、除去された物質が毒性要因物質である可能性が高いと推察される。

2.1 試験方法

(1) ミジンコ繁殖試験方法

ミジンコ繁殖試験は、「検討案」に準じて、ニセネコゼミジンコを用いて実施した。生まれて24時間以内の仔虫を試験に用いた。試験における同一濃度での繰返し数は10連、試験濃度は公比2とし、5%、10%、20%、40%、80%の5濃度区を設定した。このとき、同じ親から産まれた同一腹分の仔虫を、対照区を含むすべての希釈段階に配置した。ばく露開始後は、毎日ミジンコの生死観察と生まれた仔虫の総数を計測し、結果を記録した。試験は対照区の試験個体の60%以上が3腹産んだ時点で終了し、すべてのばく露区の産仔を集計した。ただし、ばく露期間は最長でも8日間とした。試験成立の条件は、表2の項目をすべて満足することとした。

統計解析には、EcoTox-Statistics Ver.2.6のTG211を用いた。Bartlett検定とDunnnett多重比較検定を用いて、対照区と各濃度区の産仔数を比較した。判定は、前述、「1.1 藻類感受性試験」に準じた。

(2) 毒性要因物質の除去試験方法

① キレート樹脂吸着処理試験方法

キレート樹脂（ミヨシ油脂㈱製）をカラムに充填し、試料を定量ポンプにより連続的に上向流で通水した。キレート樹脂層容積の12倍量の試料を通水して、得られた処理水全量を化学分析および生物影響試験に供した。生物影響試験では、pH

表3 生物影響試験結果

試料名	魚 (NOEC)	ミジンコ (NOEC)	緑藻 (NOEC)
試料 A	>80 %	<5 %	>80 %
試料 B	>80 %	40 %	>80 %

による生物影響が無いように硫酸で pH7付近に調整した。

② 凝集処理試験方法

凝集処理試験では、無機凝集剤として塩化第二鉄（38% FeCl₃溶液）を使用し、高分子重金属捕集剤（ミヨシ油脂㈱製）および高分子凝集剤を併用した。これら高分子凝集剤使用時は、pH7付近に調整した。試験には6連式のジャーテスタ（凝集処理試験装置）を使用した。凝集処理試験で得られた上澄み液を、実装置の砂ろ過（孔径3~7μm）を想定して、孔径7μmのセルロース製ろ紙（No.5A、アドバンテック東洋㈱製）でろ過した。そのろ過水を化学分析および生物影響試験に供した。生物影響試験前に、pHを7付近に調整した。

(3) 毒性要因物質の添加試験方法

毒性要因物質の除去試験により生物影響が認められなくなった試料に、毒性要因物質と考えられる重金属（後述 Zn）を添加して、生物影響試験に供し、その影響増加分から毒性要因物質の検証を行った。添加方法は、Zn濃度が除去試験前と同じ濃度になるように、化学分析用 Zn 溶液1000 mg/L（金属分析用標準液、関東化学㈱製）を添加した。

2.2 結果および考察

(1) 生物影響試験

採水は、金属製品製造業工場排水放流口にて日を変えて2回行い、それらを2014年6月5日採水試料（以下、試料 A と称する）と2014年7月1日採水試料（以下、試料 B と称す）とした。

試料 A と試料 B の生物影響試験結果を表3に示す。魚と緑藻の NOEC は、すべて試験濃度80%以上で毒性は認められなかった。しかし、ミジンコの NOEC は、試料 A が試験濃度5%未満、試料 B が

40 %で、毒性が認められた。親ミジンコの死亡率を図3, 4に示す。試料Aでは試験濃度40 %以上で、試料Bでは80 %で半数以上が死亡した。

(2) 排水性状と化学分析結果による毒性要因物質の推定

排水の性状把握のため、事業者への聞き取り調査を実施し、工場用水の使用状況、製造工程に使用される化学物質、排水処理工程および運転状況など、毒性要因物質を推定するための情報を入手した。結果を以下にまとめる。

- ① 金属製品の製造工程時に、Zn, Ni, Pbを主に使用している
 - ② 排水処理は、pH調整と凝集沈殿のみである
 - ③ 排水処理装置の運転状況は良好である
 - ④ 放流水は排水基準のすべてを満足している
 - ⑤ 1級河川合流後の排水は、約21 000倍希釈されている
- 金属製品の製造工程時に、Ni, Zn, Pbが使用さ

れているため、これらの物質も含め化学分析を行った。結果を表4に示す。分析結果から、pH, 硬度, 濁度, TOC, COD_{Mn}, NH₄-Nは、生物に影響を与えるレベルの値ではなかった。また、Pbについても、排水中の濃度が1 μg/Lと、Pbのミジンコ繁殖試験の文献値のEC25 (25 % Effect Concentration: 25 % 影響濃度) の153 μg/L⁹⁾に比べて十分に低いことから、Pbは毒性要因物質の候補から除外した。

一方、試料Aには、Zn 460 μg/L, Ni 3 μg/Lが含まれており、それぞれのミジンコ繁殖試験の文献値のEC25 (Zn 60 μg/L¹²⁾とNi 0.64 μg/L⁹⁾)を大きく超えていることから両物質ともに生物影響を与える可能性が高いと推察した。

(3) 毒性要因物質の除去試験

① キレート樹脂吸着処理試験

キレート樹脂吸着試験結果を表5に示す。本処理により試料AのZnは460 μg/Lから15 μg/L, Niは3 μg/Lから1 μg/L未満に改善された。キレー

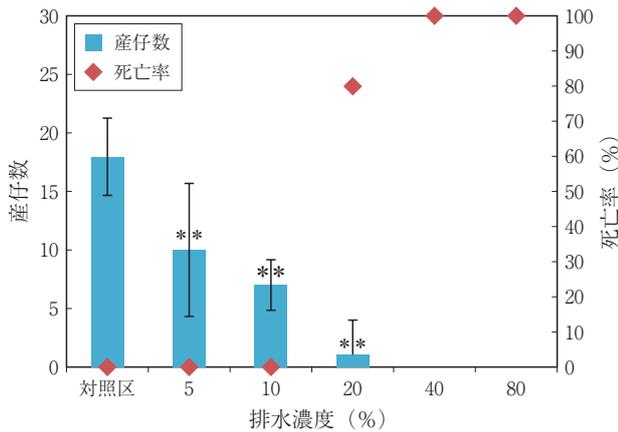


図3 試料A ミジンコ繁殖試験結果 (** : p < 0.05)

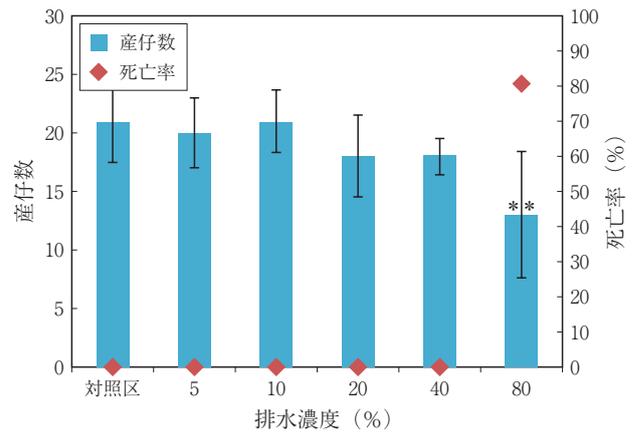


図4 試料B ミジンコ繁殖試験結果 (** : p < 0.05)

表4 化学分析結果

試料名	pH (-)	硬度 (mg/L)	濁度 (degree)	TOC (mg/L)	COD _{Mn} (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	Zn (μg/L)	Pb (μg/L)	Ni (μg/L)
試料A	8.6	280	0.5	2.7	2.9	<0.10	460	1	3
試料B	7.1	498	0.1	1.0	1.3	0.25	32	<1	2

表5 キレート樹脂吸着試験の水質分析結果

	pH (-)	Ni (μg/L)	Zn (μg/L)	Pb (μg/L)
試料A	8.6	3	460	1
キレート樹脂吸着後 (試料A)	10.6	<1	15	<1

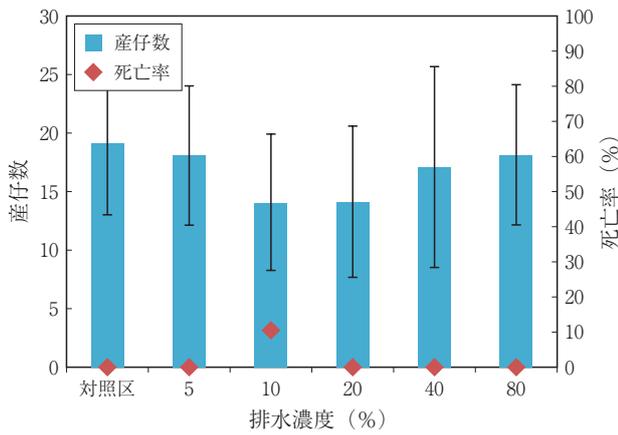


図5 ミジンコ繁殖試験結果（キレート樹脂吸着試験後）

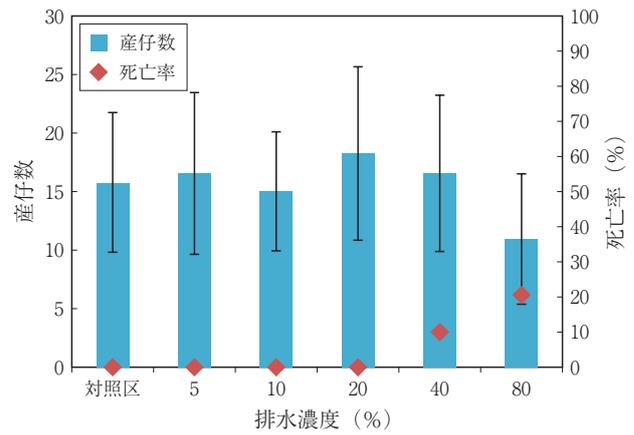


図6 ミジンコ繁殖試験結果（FeCl₃ 50 mg/L）

表6 凝集処理試験の水質分析結果

	pH (-)	Ni (μg/L)	Zn (μg/L)
試料 A	8.6	3	460
FeCl ₃ 50 mg/L	8.93	2	2

ト処理水は、pH10.6であったため、硫酸を用いて pH7.1に調整し、ミジンコ繁殖試験に供した。処理前の生物影響試験ではミジンコに毒性影響が認められたが、キレート処理水は図5に示すとおり、すべての希釈段階において、ミジンコの親の死亡率、繁殖率に影響が認められなかった。

以上の結果より、キレート樹脂吸着処理により生物影響が削減されること、また、ZnとNiの濃度が生物影響濃度以下に下がっていることから、両者が毒性要因物質である可能性が高いことが示唆された。

② 凝集処理試験

試料Aの凝集処理前後の化学分析結果を表6に示す。無機凝集剤 FeCl₃ を50 mg/L 添加すると、Zn は460 μg/L から2 μg/L と大きく減少したが、Ni は3 μg/L から2 μg/L とほとんど減少していなかった。凝集処理前には、ミジンコの毒性影響が認められたが、図6に示すとおり FeCl₃ 50 mg/L 添加で処理した処理水は、Ni がミジンコ繁殖試験の EC25値である0.64 μg/L を上回っているにもかかわらず、すべての希釈段階においてミジンコの親の死亡率は20%以下であり、繁殖率に影響が認められないと評価された（2.2(4)②で考察）。以上の結果より、Zn が主な毒性要因物質である可能性が高いと推察された。

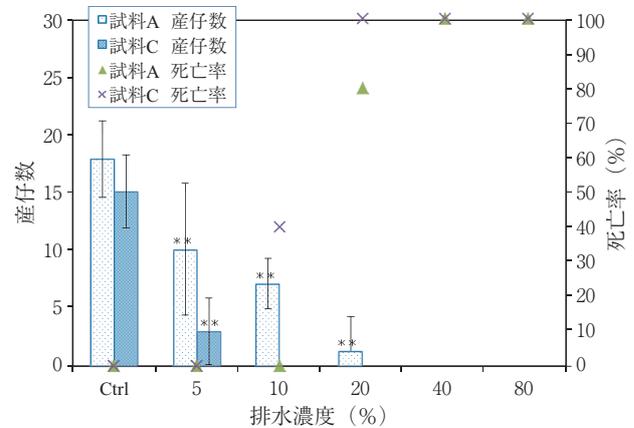


図7 ミジンコ繁殖試験を用いた毒性要因物質除去後の添加試験結果比較（試料Aと試料C）（**：p < 0.05）

(4) 毒性要因物質の添加試験

試料Aを用いて FeCl₃ で凝集処理した処理水に、試料Aと同じZn濃度になるようにZnを添加し試料を作成した（以下、添加試料Cと称する）。Niについては、凝集処理前とほぼ同じ値であったため、添加しなかった。添加試料CのZn濃度は460 μg/L、Ni濃度は2.8 μg/Lであり、試料Aとほぼ同じ値であることを確認した。試料Aと添加試料Cのミジンコ繁殖試験結果を図7に示す。試料AのNOECは5%未満であったが、ZnとNi濃度を試料Aとほぼ同等に調整した添加試料CのNOECは20%で、試料Aに比べ低い毒性となった。「2.2(3)②凝集処理試験」で、凝集処理水のNiがミジンコ繁殖試験のEC25値である0.64 μg/Lを上回る2 μg/L 残留しているにもかかわらず、ミジンコの繁殖率に影響が認められなかったことと考え合わせると、凝集処理

試験に用いた塩化第二鉄に含まれるFeがNiの毒性影響を緩和した可能性がある」と推察される。

以上の結果より、対象とした金属製品製造工場排水のミジンコへの毒性要因物質は、ZnとNiの可能性が高いこと、および、FeCl₃で凝集処理することにより効果的（Zn除去、Niの毒性緩和）に毒性が削減できることが分かった。

本工場は、もともと処理設備として凝集沈殿設備を有しているため、凝集剤の選定および運用を最適化することで毒性改善が可能と考えられる。

む す び

- (1) 生物影響試験の信頼性確保に必要な、健全な供試生物を飼育できているかを確認するため、毒性標準物質を用いた感受性試験を実施した。供試生物は、毒性物質に対して十分な感受性を有しており、適切に飼育・管理できていることが示された。
- (2) 生物影響試験でミジンコに対して生物影響が認められた、金属製品製造業の工場排水に対して、TRE/TIE手法を実施して下記の知見を得た。
 - ① 毒性要因物質は、ZnとNiである可能性が高い
 - ② 無機凝集剤として使用したFeにはZnを除去し、Niの毒性を打ち消す作用がある。
 - ③ 毒性要因物質の削減方法としては、凝集剤の選定および運用の最適化といった軽微な変更で改善可能である。

生物影響試験は、生物への直接的な影響を示すため、一般市民にも分かりやすく、「生物影響なし」

の結果であれば、CSRに記載することで、「環境に優しい排水を放流している」とアピールすることができる。一方、「生物影響あり」の場合は、本報で紹介したTRE/TIEを実施することで、改善策を見つめることが可能である。法制化が実施されていない現状においては、改善まで実施する企業は少ないが、それでも、将来に備えて、TRE/TIEを検討する企業もでてきている。今後、法制化が進むにつれ、生物影響試験だけではなく、TRE/TIEを検討する企業が増加していくものと期待する。

[参考文献]

- 1) 国立保健医療科学院：飲料水ガイドライン Guidelines for drinking-water quality, 第4版 (2011)
- 2) USEPA: Short-term methods for estimation the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth Edition (2002)
- 3) USEPA: Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program (2001)
- 4) 環境省：一律排水基準, <http://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html>
- 5) 環境省：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（2013）
- 6) 平成26年7月9日環境新聞
- 7) 日本環境毒性学会：EcoTox-Statistics, <http://www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm>
- 8) 藤原尚美, 野中信一, 豊久志朗, 鐘迫典久：金属製品製造工業の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 (2015)
- 9) 環境省：平成25年度化学物質の複合影響評価に関する公開シンポジウム (2014)