

「生物を用いた排水管理手法に関する最新事情」 講演会開催概要

生物を用いた排水管理手法はWET（Whole Effluent Toxicity、全排水毒性試験）を用いた排水管理手法ですが、我が国では環境省を中心に検討が進められており、平成24年度を目途にガイドラインが作成される予定とされています。

これまでの日本国内の排水規制は、特定物質を個別に管理・規制するものですが、国内で流通している化学物質は20000種を越え、これら物質を個別に規制するのはほぼ不可能であること、またそれぞれの化学物質の複合効果についての評価も非常に困難であると言わざるを得ません。WETは、こうした従来の排水規制の欠点を補完し、バイオアッセイにより排水などに含まれる多種多様な化学物質の複合影響を総合的に捉え、原因物質が判明しなくても対策を行える点が特徴であります。WETは、すでに多くの国で実用化されており、日本でも対応が待たれていたところでもあります。

本講演会はこの「生物を用いた排水管理手法」について、国内外の動向、試験方法などについて、講演会を開催するものです。

- 主催 (株)日水コン中央研究所及びWETシステム研究会
- 期日 2012年2月24日（金）13:30～17:00
- 場所 (株)日水コン会議室（2204, 2205）
- プログラム

13:30	開会の挨拶
13:45～15:25	講演「WETに関する国内外動向と技術的知見」 鎌迫典久 氏（国立環境研究所環境リスク研究センター）
15:25～15:45	休憩
15:45～16:55	講演「生物毒性試験方法の概要と結果」 新野竜大 氏（三菱化学メディエンス株式会社）
16:55	閉会の挨拶

WET (Whole Effluent Toxicity) について

● 我が国における経緯

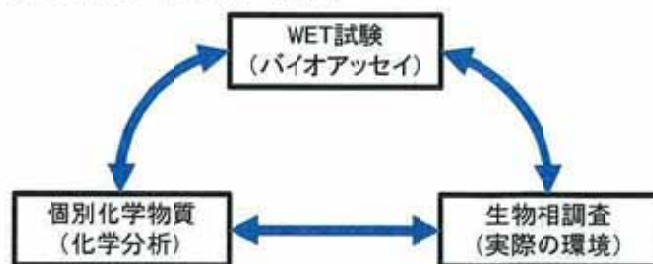
我が国では、環境省が平成 21 年 9 月、環境保全上の目標やリスク管理の在り方など新たな施策の展開を求めて「今後の水環境保全に関する検討会」を設置しました。この検討会では、平成 23 年 3 月に「今後の水環境保全の在り方について」として最終報告をとりまとめています。報告書では、新たな施策の枠組みとして排水規制のあり方を検討し、「我々の暮らしの中で使用されている化学物質等の種類は年々増加しているが、毒性情報について未知の部分が多く、排水規制の対象とするに至らない化学物質についても、複数の化学物質が共存していることによる生態系への影響など水環境中での問題が生じているおそれは否定できないことから、水環境への影響や毒性の有無を総体的に把握・評価し、必要な対策を講じるため、現行の排水規制を補完する手法として、生物応答を利用した排水管理手法（Whole Effluent Toxicity: WET 手法）などの有効性についても検討すべきである。」と述べています。

環境省では、平成 21 年度より排水管理に生物応答を用いるシステムについて「WET 手法を活用した排水規制手法検討調査」を開始しています。本年（平成 24 年）1 月には、環境省・国立環境研究所が主催して米国・韓国等の専門家を招いて、WET 手法に関するセミナーを開催するなど、導入に向けた本格的な議論も進行中です。

● 海外における WET システム

欧米では排水に対する環境影響評価法の一つとして、米国では 1995 年に生物応答試験方法を公布、その後 2002 年には試験法が修正される中、藻類・ミジンコ類・魚類などの 3 種類以上の水生生物を用いた生物応答試験（急性および（亜）慢性毒性レベル）の実施が行われています。カナダでは新環境規制法の下で環境影響モニタリングの提出が義務化されており、工場の排水に対し生物応答試験（亜急性毒性レベル）が実施されています。ドイツでは排水賦課金法により、個別物質管理を補完するための生物応答試験の実施が求められており、ゼブラフィッシュの胚毒性試験が導入されています。また、韓国では平成 23 年度より排水規制に生物影響指標を導入しており、ミジンコ急性毒性試験結果により排水の毒性を評価しています。

米国の「毒性物質規制のための統合的アプローチ」において排水管理は下図のように「個別化学物質分析」、「WET 試験」、「生物相調査」の 3 つの手法相互の補完関係を明示しており、WET 試験で毒性が認められると、その毒性の低減に向けて、毒性削減評価 (TRE)、毒性同定評価 (TIE) 等が義務づけられており、WET 試験結果を受けて、排水の生物毒性削減対策が進められています。



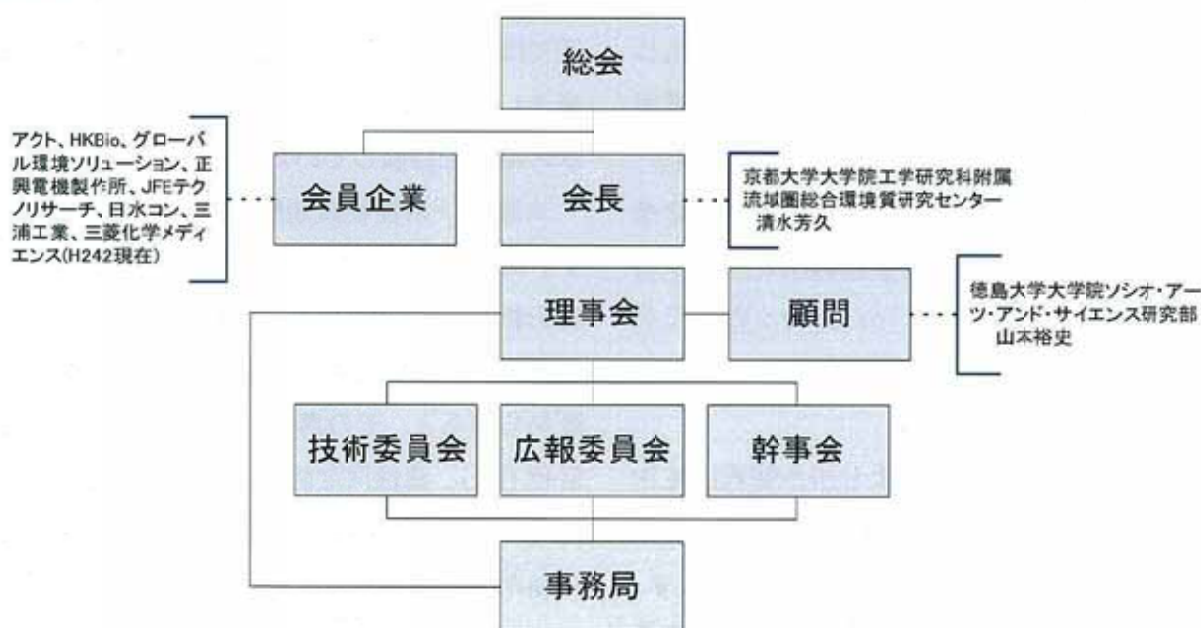
● WETシステム研究会について

○ 目的

WET (Whole Effluent Toxicity 生物応答を利用した排水管理手法) は、バイオアッセイ (生物毒性評価) により排水などに含まれる多種多様な化学物質の複合影響を総合的に捉え、必ずしも原因物質が判明しなくても対策を行えるという特徴があります。WET は、すでに多くの国で実用化されており、日本でも導入が待たれていたところです。しかし、WET を効果的に実施するに当たっては、毒性評価や毒性物質同定、改善対策や継続的フォローアップ、普及啓発など、多くの課題が考えられます。

そこで、これらの課題解決に向けて広く関連分野での経験を有し関心のある企業および研究者が集まり、交流することが大変有益であると判断し、生物学・バイオアッセイ、処理プロセス技術、処理プロセス管理技術はじめ、最終的な総合マネジメント技術などについて研究・開発するオープンな研究会を発足させることといたしました。多くの知恵や技術を組み合わせることにより、効果的・効率的なシステムを提案し、WET 手法の実用化に寄与することができると考えております。本会は2011年5月27日都内において設立総会を開催し、具体的な研究活動を開始しておりますが、現在も国内外を問わずご賛同戴けるメンバーを広く募集中ですので、関心のある方は事務局までご連絡下さい。

○ 組織



○ 連絡先

WETシステム研究会事務局

株式会社 日水コン

環境事業部環境分析センター内 (TEL 042-584-7930、FAX 042-584-7929)

〒191-0065 東京都日野市旭が丘 4-7-107 (アクア 21 ビル)

生物を用いた排水管理手法に関する最新事情
バイオアッセイの概要と結果
および
排水のバイオアッセイについて

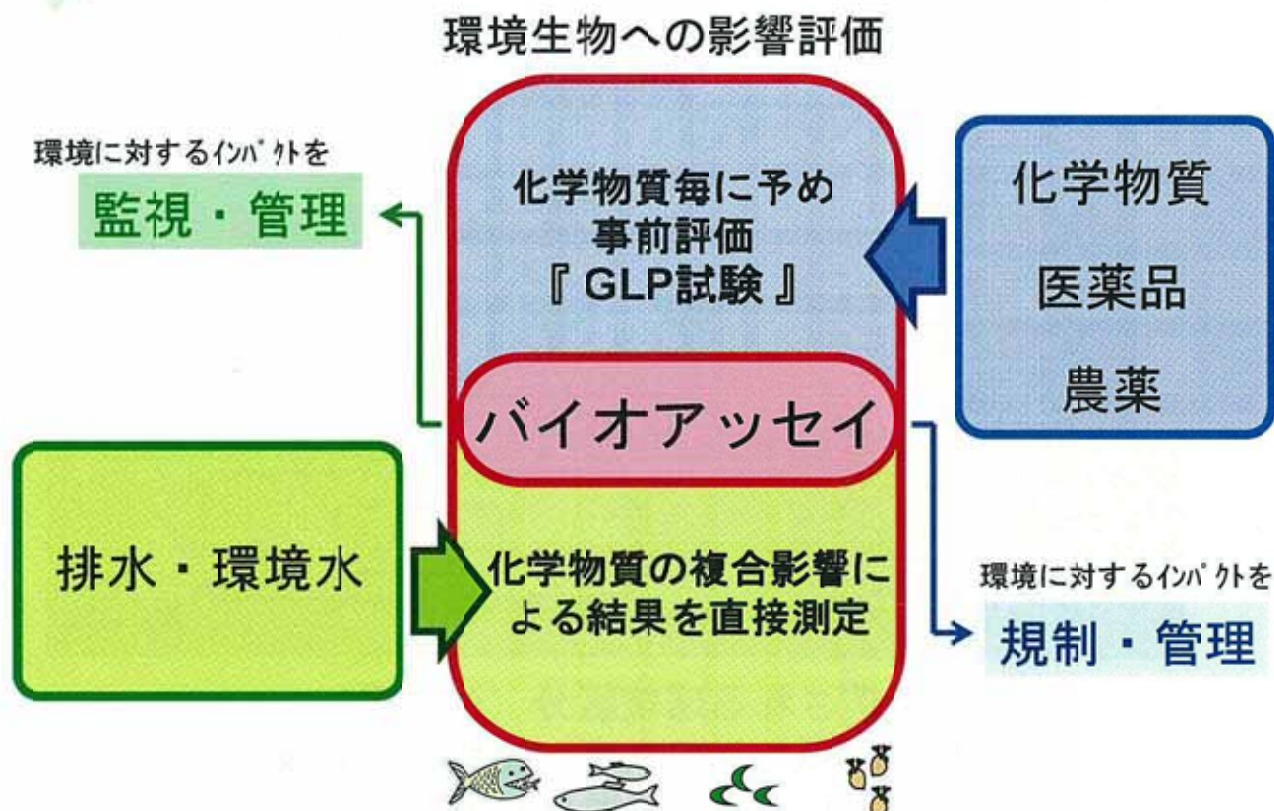
三菱化学メディエンス
環境リスク評価センター
新野竜大

三菱化学メディエンス

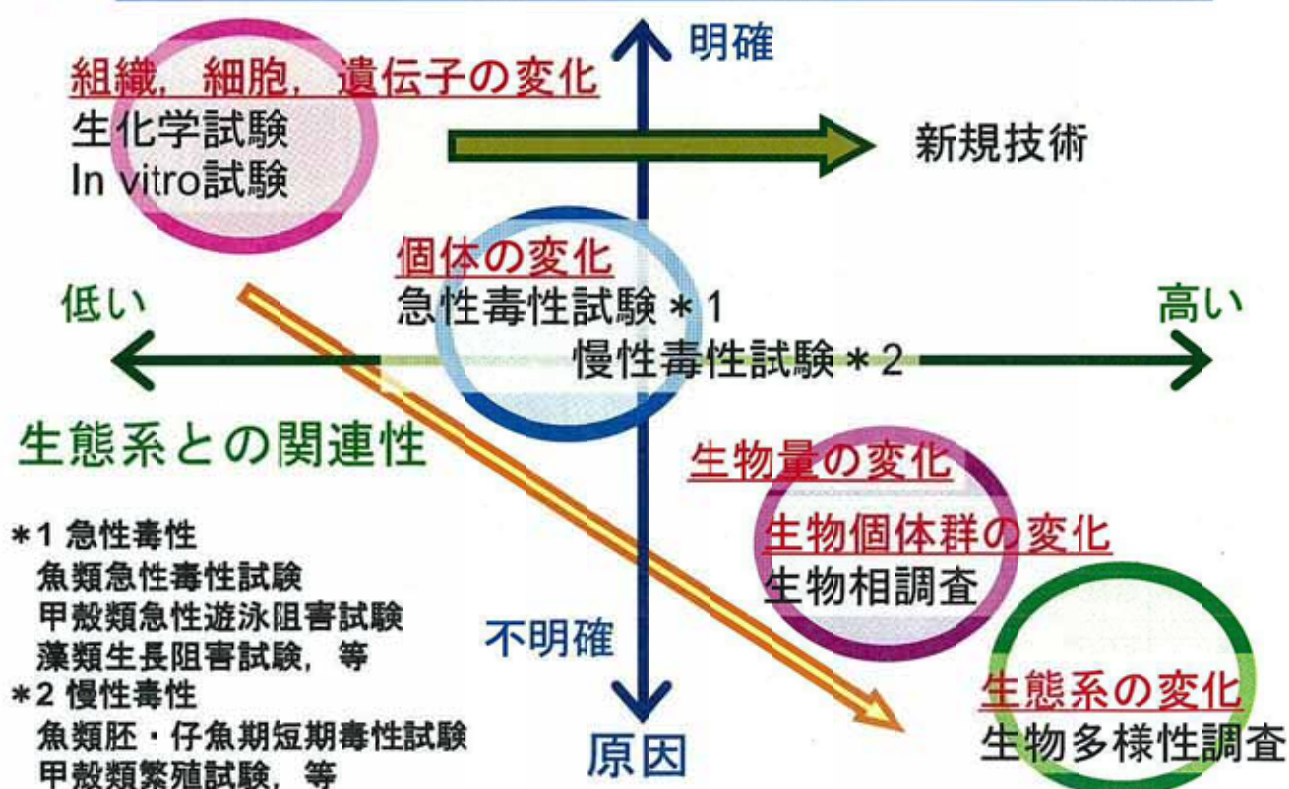
本日の主な内容

1. 化学物質の環境影響評価
2. 環境影響評価とバイオアッセイ
3. 米国における排水規制
4. WETアプローチ
 - WETの概略
 - バイオアッセイ
 - 毒性削減評価/毒性同定評価

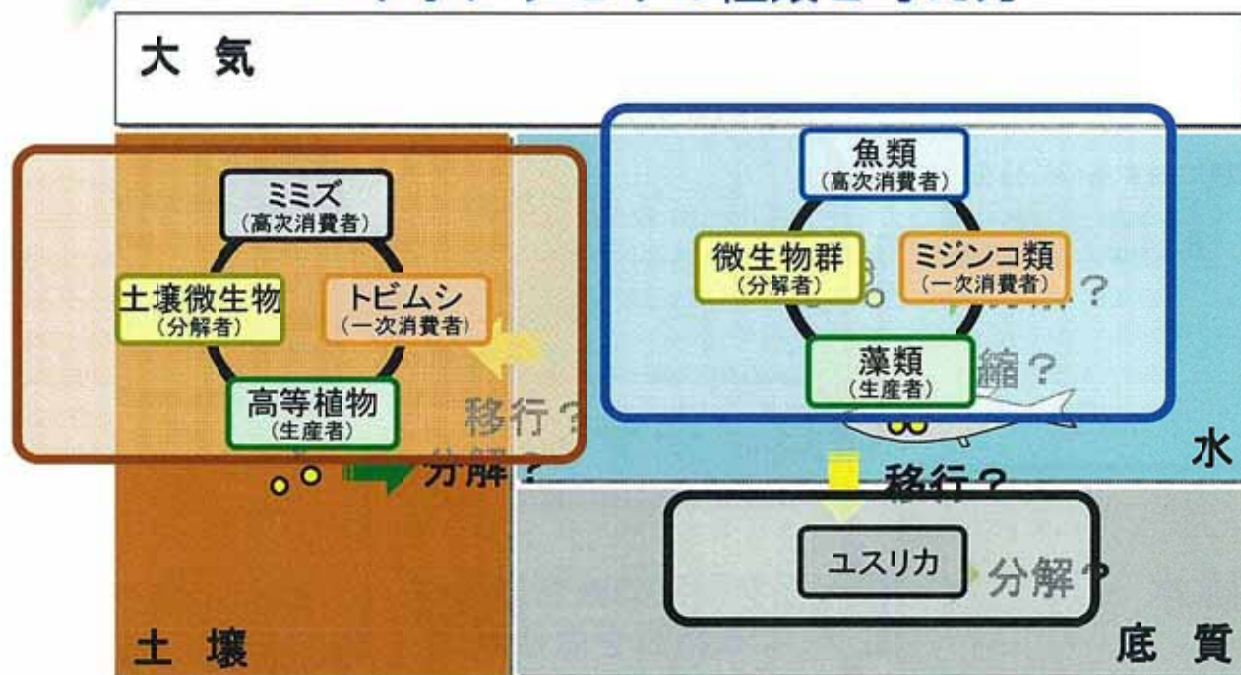
化学物質管理とバイオアッセイ



環境影響評価に利用する バイオアッセイの種類と考え方



個体の変化を捉える バイオアッセイの種類と考え方

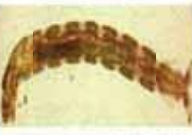


汚染が考慮される環境区分 (生態系)
 分類学的に隔たりの大きい生物種 (感受性差)
 実験生物として確立されている (OECD等GL化)

水生生物を利用したバイオアッセイ

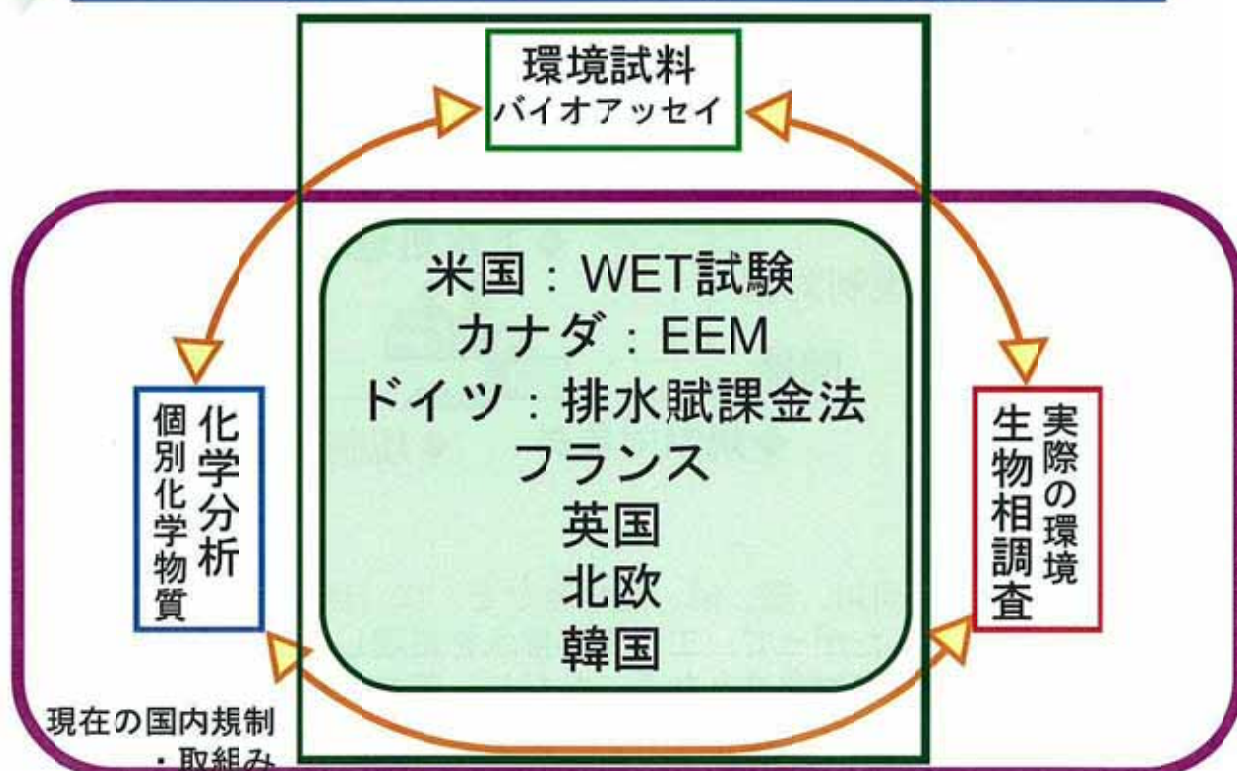
	微生物		藻類		ミジンコ類		魚類	
生物種	分解者		生産者		一次消費者		高次消費者	
	活性汚泥	細菌 <i>Pseudomonas putida</i>	緑藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	藍藻 <i>Synechococcus leopoldensis</i>	オオミジンコ <i>Daphnia magna</i>		ヒメダカ <i>Oryzias latipes</i>	
								
区分	急性	急性 (慢性)	急性・慢性		急性	慢性	急性	慢性
期間	3時間	16時間	72時間		48時間	21日間	96時間	約40日間
評価	呼吸阻害	増殖阻害	生長阻害		遊泳阻害	繁殖 (産仔数) 成体生死	致死	初期生活 段階毒性
生物数	4000 mg/L	A ₆₁₀ =0.01 指数増殖	5000-50000 cells/mL 指数増殖		20頭/試験区	10頭/試験区	10尾/試験区	60尾/試験区
試験用水	合成下水	栄養培地	無機培地		M4培地	M4培地	脱塩素水	脱塩素水
結果	EC50	EC50 EC10	EC50 NOEC		EC50	LOEC (仔) NOEC (仔) LC50 (親)	LC50	NOEC LOEC
ガイドライン	OECD 209	ISO 10712	OECD 201		OECD 202	OECD 211	OECD 203	OECD 210

陸生生物・底生生物を利用したバイオアッセイ

	土壌微生物	陸生高等植物	土壌動物		底生生物
生物種	硝化微生物	双子葉植物 - 3種 カブ、キャベツ等	トビムシ (節足動物)	ミミズ	ユスリカ
	アンモニア酸化菌 亜硝酸酸化菌 等	単子葉植物 - 3種 小麦、トモロコシ等	<i>Folsomia candida</i>	シマミミズ <i>Eisenia fetida</i>	<i>Chironomus yoshimatsui</i>
					
区分	急性	急性・慢性	慢性	急性	急性・慢性
期間	28日間	約30日間	28日間	14日間	28日間
評価	硝酸生成能 土壌微生物の 窒素変換活性	出芽率 幼苗生長 病変	繁殖(単為生殖) 幼体産出数 成体生存数	死亡率 (供試生物数 - 生存数)	羽化率 変態速度 感受性雌雄差
生物数	バイオマス: >1%/全有機C	1生物あたり 20種子以上/試験区	50頭/試験区	40匹/試験区	80匹/試験区
試験土壌	天然土壌	天然土壌 人工基質	人工土壌	人工土壌	人工底質
結果	EC50 EC25	EC50 EC25 NOEC	NOEC (幼体) EC50 (成体)	LC50 (7および14日目) LC0、LC100	Ecx NOEC
ガイドライン	OECD 209	OECD 208	ISO 11267	OECD 207	OECD 218

9/32

排水中の化学物質管理のための総合的アプローチ





米国の水質規制



Clean Water Act : 米国の水質規制

① CWAにおいて、事業場等の点源からのすべての水域への排出には全国汚染物質排出削減システム（NPDES）プログラムが適用。

② NPDES許可において、2つの考え方による排水規制を考慮しなければならないとされている。

1. 事業場の技術基準に基づく排水規制（全米一律）

2. 水質に基づく排水規制（州規制）

化学アプローチ：化学物質個別管理

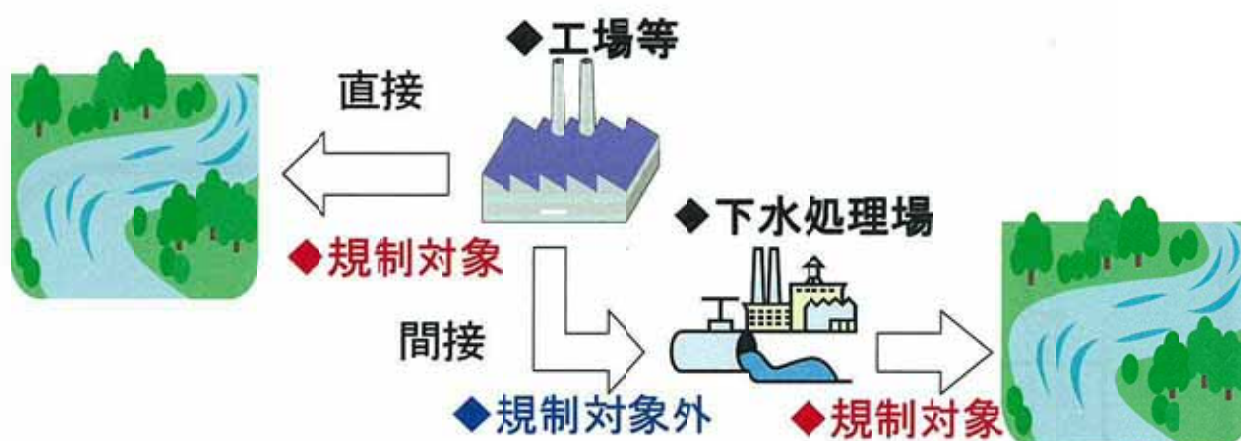
WET(Whole Effluent Toxicity)アプローチ：

数値または「毒性が無い」

生物学的評価アプローチ：生物群集モニタリング、調査



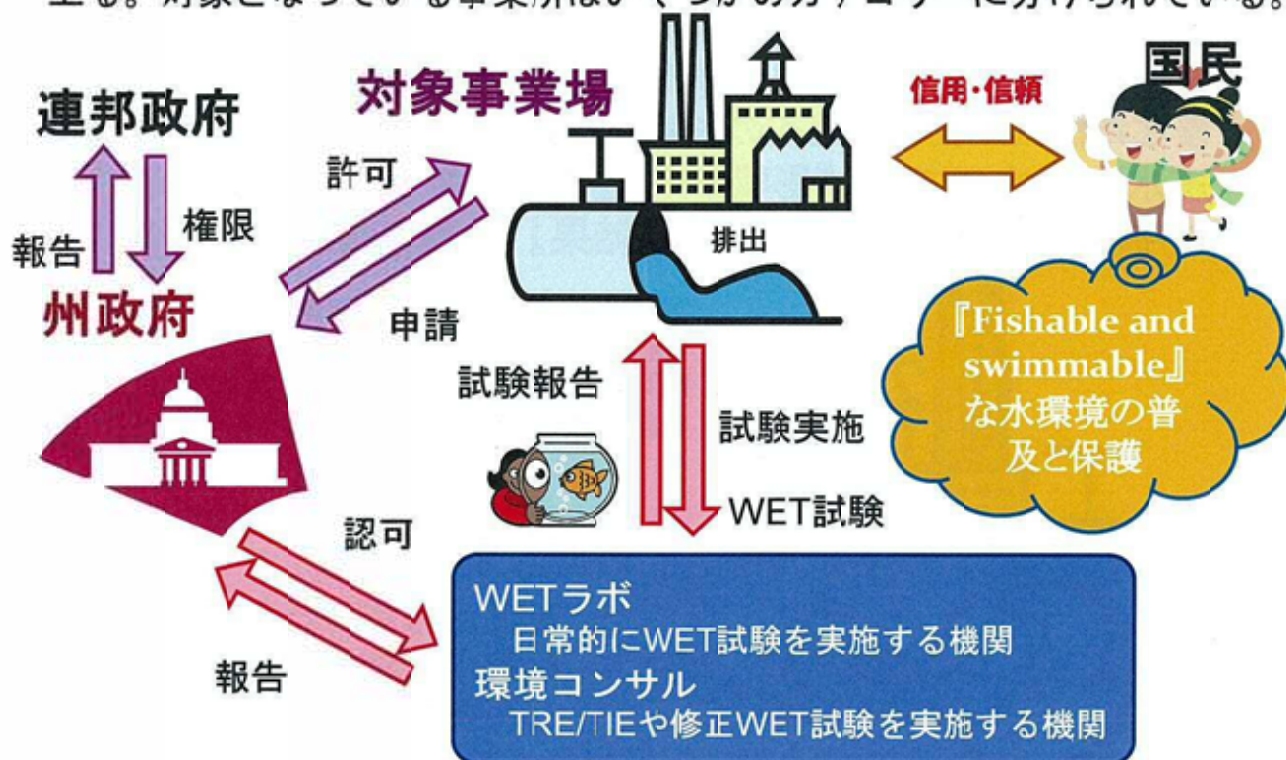
NPDESの規制範囲



NPDESでは水域（河川、湖、沼、湿地帯など）に『直接』排出される排水を規制している。したがって、工場内で排水を処理し、下水道や地下水に排出する場合は規制の対象外となる。ただし、下水処理場で処理された排水を水域に排出する場合、排水は規制の対象となる。

米国では・・・

NPDESの対象となっている事業所数は全米で約17万事業所（2009年）に上る。対象となっている事業所はいくつかのカテゴリーに分けられている。



米国のWET試験受託機関

◎ WETラボには民間機関、公共機関が存在する。

民間：WETラボ → ウィスコンシン州で4機関

環境コンサル → TETRA TECH, 等

大学：バージニア工科大学, クレムソン大学, 等

公的機関：バージニア州公衆衛生地区

シカゴ大都市圏水資源再生特別区

◎ WET試験とTRE/TIEを実施する事業を行っている大抵の試験機関はWETおよびTRE/TIE実施部門を切り分けている場合が多い（客観性見地から??）。

◎ 一部の都市や産業は自前のコンサルタントを抱え本件に対応している。

◎ 民間企業は自前のWETラボを持つところはほとんどない。大抵は外部の環境コンサルおよびWETラボに委託し、本件に対応している。

WETアプローチ

① バイオアッセイ

工場（事業場）から河川等への排出口を対象として生物応答試験を実施。毒性の有無は年間数回試験を実施して判断。亜慢性毒性（成長や繁殖への影響）試験が主に推奨されている。

排水中のすべての『影響』を直接測定する。

化学物質の『複合影響による結果』を直接測定する。



通常データを継続的に収集。

（例：バージニア州は2年半）

WET限度値を設け超過とその反復性を統計的に捉え、毒性の有無を判断。

② TRE/TIE

毒性が確認された場合
事業場は毒性を削減することが要求される。

米国で承認されているバイオアッセイ

急性（淡水）

1. *Ceriodaphnia dubia* acute.
2. *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* acute.
3. Fathead Minnow, *Pimephales promelas*, and Bannerfin shiner, *Cyprinella leedsii*, acute.
4. Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, and brook trout, *Salvelinus fontinalis*, acute.

急性（海水）

5. Mysid, *Americamysis bahia*, acute.
6. Sheepshead Minnow, *Cyprinodon variegatus*, acute.
7. Silverside, *Menidia beryllina*, *Menidia menidia*, and *Menidia peninsulae*, acute.

亜慢性（淡水）

8. Fathead minnow, *Pimephales promelas*, larval survival and growth.
9. Fathead minnow, *Pimephales promelas*, embryo-larval survival and teratogenicity
10. *Daphnia*, *Ceriodaphnia dubia*, survival and reproduction
11. Green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth.

亜慢性（海水）

12. Sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*, larval survival and growth.
13. Sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*, embryo-larval survival and teratogenicity.
14. nland silverside, *Menidia beryllina*, larval survival and growth.
15. Mysid, *Americamysis bahia*, survival, growth, and fecundity.
16. Sea urchin, *Arbacia punctulata*, fertilization.

急性と慢性毒性試験とに大分され州毎に組み合わせが異なる

取り組むべき内容（１）・バイオアッセイ

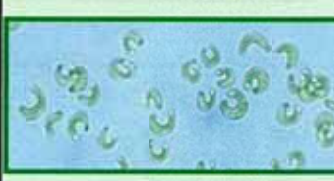
- 安定した生物管理
- 安定した試験結果を得るための準備
- 効率的な試験系の構築
- 信頼性のあるデータの提供，蓄積
- ．．．等



技術検討例

- ・水生生物亜慢性毒性試験について
- ミジンコ類，魚類，藻類についての感受性比較

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

		魚類胚・仔魚期 短期毒性試験	ミジンコ類 繁殖試験	藻類 生長阻害試験
供試生物	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>)	 緑藻 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)
	使用齢	受精後4時間の受精卵	24時間齢未満の雌	指数増殖期の細胞
	使用数	4連/濃度区，15卵/連	10連/濃度区，1頭/連	3連/濃度区，5000cells/mL
エンドポイント		胚発生，孵化，生存	生存と繁殖	生長（細胞数，増殖速度）
試験温度，光		25±1℃，明暗光	25±1℃，明暗光	25±1℃，連続光
暴露方法		半止水式	半止水式	止水式
暴露期間		9日間 (<i>D. rerio</i> の場合)	8日間	72時間
試験濃度		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）	無（100 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	OECDテストガイドライン201 EPA -600-4-91-022 Test method number 1003



Ceriodaphnia dubia と *Daphnia magna*



C.dubia

和名：ニセネコゼミジンコ
 体長：0.9～1.0 mm
 寿命：約3週間
 初産：3～5日目
 産仔頻度：1～2日毎

D.magna

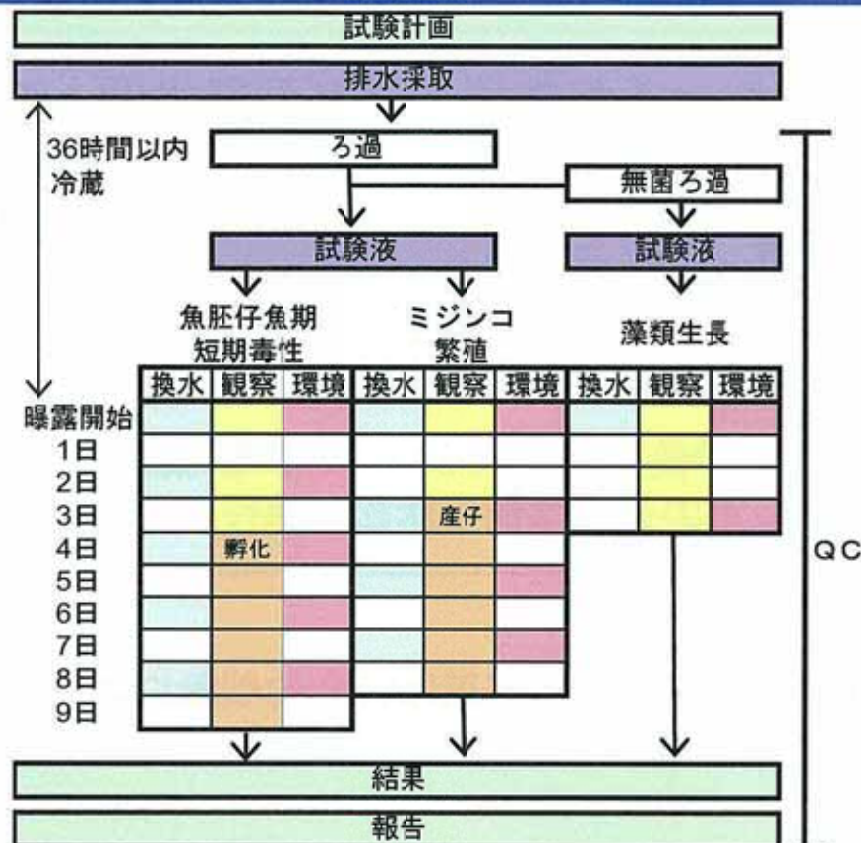
和名：オオミジンコ
 体長：3.0～5.0 mm
 寿命：約8週間
 初産：7～9日目
 産仔頻度：約3日毎



C.dubia および *D.magna* の繁殖試験条件の比較

	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Daphnia magna</i>
試験用水	: 脱塩素水道水	Elendt M4 medium
暴露期間	: ≤8日間	21日間
暴露方式	: 半止水式（期間中 2回以上換水）	半止水式（毎日換水）
生物数	: 10個体／試験区	10個体／試験区
試験液量	: 15 mL	80 mL
餌	: YCT + <i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
試験温度	: 25±1℃	20±1℃

ガイドラインに沿った試験の流れ



WETアプローチ

① バイオアッセイ

ライセンス制 ⇒ 維持審査に試験継続



② TRE/TIE

毒性が確認された場合 → 事業場に毒性削減要求。

“毒性の削減”は排水毒性に対する原因物質（群）の名前を明らかにすることではなく、原因となる有害物質の“特性”すなわち“環境インパクト”を明らかにすることであり、それが有用な除去手段につながる。

技術者、毒性学者、処理オペレータと一緒に作業→成功率が高くなる

米国の排水規制における罰則

CWAにおける事業場および受託機関への罰則

■事業所

- 改善できない場合は排水量を制限される
ウィスコンシン州：12,000GaL/Day未満に制限

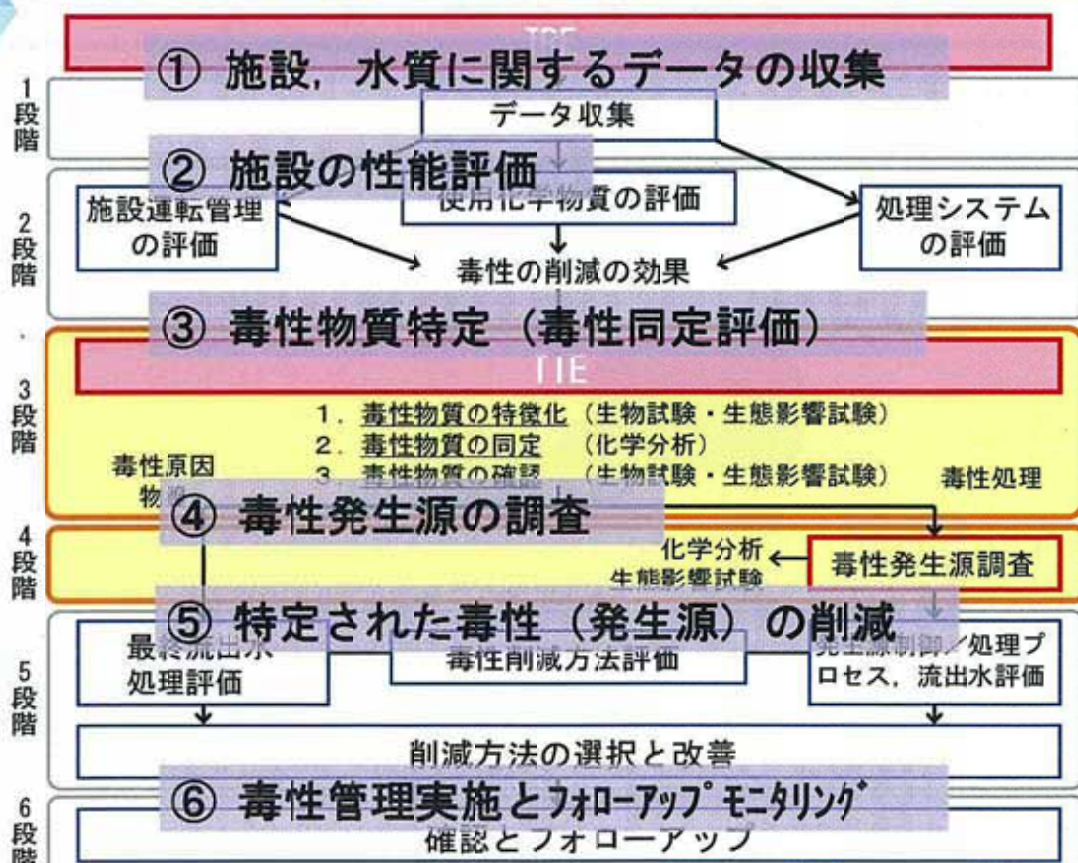
■試験機関

- データ偽装は重大な犯罪、試験機関の閉鎖
- 故意の違反は刑事訴訟、懲役

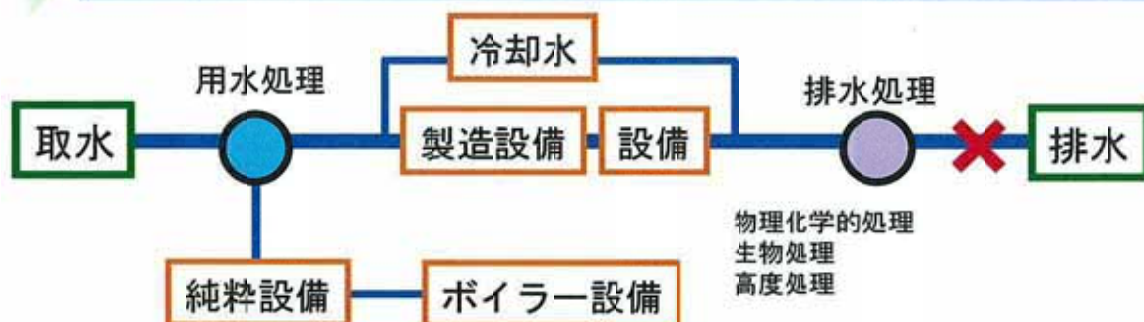


故意による不正は社会的制裁による影響大

毒性削減評価(TRE)／毒性同定評価(TIE)の例



工場排水の流れと試験サンプリングポイント



× 毒性同定評価（第3段階）

- EPA manual では排水の特性を変化させることによる特徴化を提案
- 第1,2段階で効果が見られない場合、毒性の原因物質(群)を特定する通常いくつかのステップを踏む。都度バイオアッセイを実施して確認

Phase 1：バイオアッセイにより毒性の原因物質(群)を特徴化

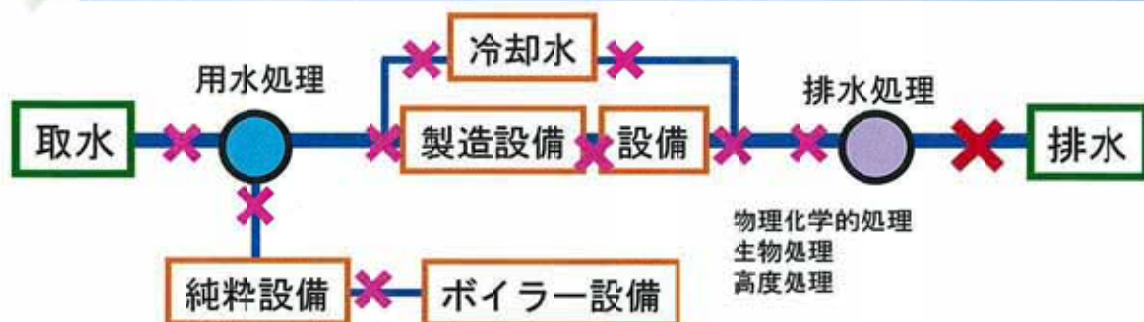
→ 排水に処理を加え、毒性の削減の有無を確認

(pH調整, エアレーション, ろ過, 固相抽出, 硫酸ナトリウム添加, EDTA添加等)

Phase 2：毒性原因物質をケミカルアッセイにより同定

Phase 3：毒性原因物質をケミカルまたはバイオアッセイにより確認

工場排水の流れと試験サンプリングポイント



× 毒性発生源評価（第4段階：排水ラインの調査）

原因物質が特定できない場合、バイオアッセイやケミカルアッセイにより発生源を調査する



第5段階：第3段階、第4段階で得られた知見により、削減対策。

第6段階：削減効果を確認するために、定期的にバイオアッセイによる確認



取り組むべき内容（２）・TRE/TIE



- 国内の状況にあったTRE/TIEの提案
- 新しい技術の提案
- TRE/TIEをベースにした排水影響
総合管理手法構築
- 新しいビジネスの創出

．．．．等

技術検討

・ 新たなTIE手法の模索



取り組むべき内容（３）

QA/QCシステムの構築

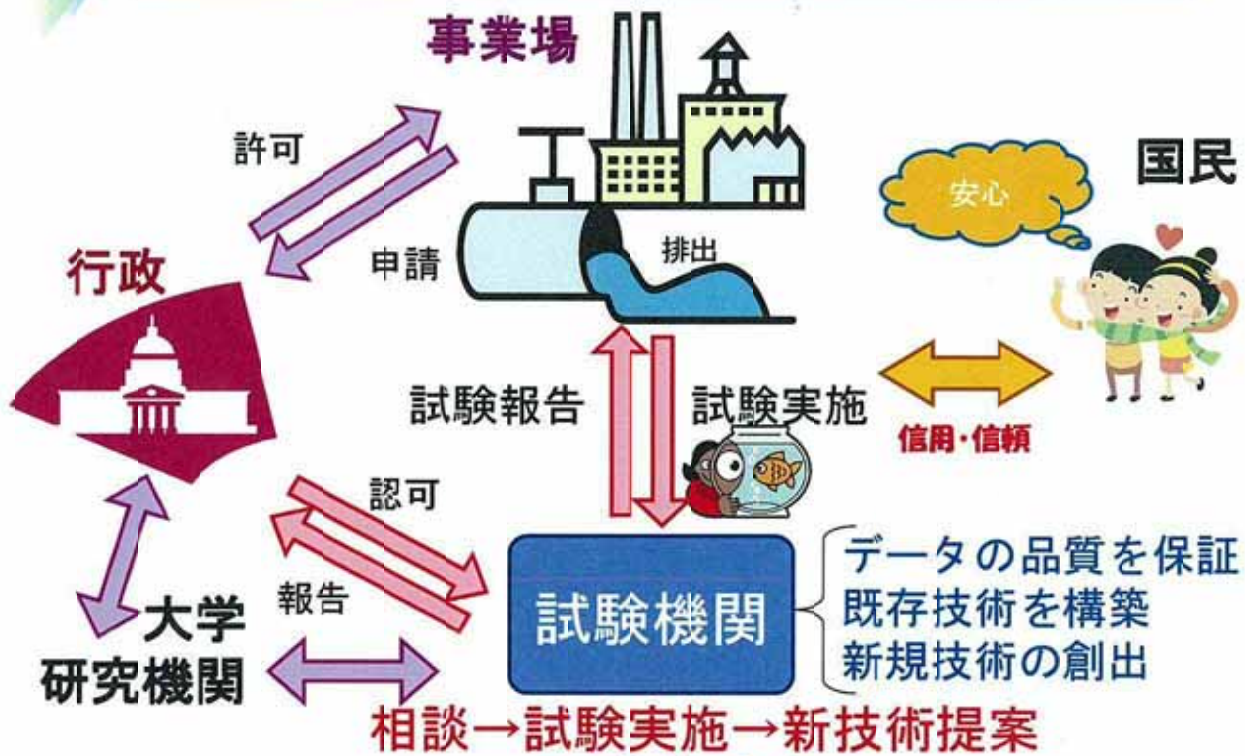
試験データの品質・信頼性を確保することが運営上、最も重要な要素の一つとなると考えるべき。WET試験に適した品質管理システムの構築が重要。

→ 品質・信頼性は『正確性』と『再現性』により確保される。客観的立場による試験および施設全般を見る役割をもった内部監査組織が、試験の信頼性の確保に重要な役割を担う。

『ヒト』の教育も重要

試験担当者にどのような教育・訓練を受けさせ、どのような作業に携わらせるかということが、試験の質の向上と担当者の育成の両面から重要な課題。

取り組むべき内容・システムの構築に向けて



※整備が重要

是非、三菱化学メディエンスにお問い合わせください。