

WET(全排水毒性)システムの試験法について

住化テクノサービス株式会社 環境科学センター 環境生態部
萩野 哲 籠島 通夫

はじめに

WETとはWhole Effluent Toxicityの略であり、米国で開発された生物応答を利用した水環境管理手法で、水質浄化法の下で早くからこのシステムが運用されている。生物多様性を維持するためにも、水環境を健全な状態に保つことは世界的な課題であろう。わが国でも平成21年度より環境省がWETシステムの導入に向けて制度・運用および技術両面から検討を行っている。

住化テクノサービス(株)環境生態部では環境省の動向に注目してWETシステムのパイロット試験に参画し、当該する3種の試験生物を用いた試験法について首尾よく完遂したので、これらの試験について解説する。

WET概要

米国では、連邦水質汚染防止法改正(1972年)を受け、全国汚染物質排水削減制度(NPDES: National Pollutant Discharge Elimination System)が立ち上がり、1974年よりWETプログラムが開始されたので、既に40年近い歴史がある。現在、46州で承認され、連邦政府、環境保護庁(EPA)を通じ、米国を10地区に分けて運用されている。排水毎に3種生物に対する試験を実施し、環境中に排出される濃度で影響がないことを示すことが必要である。米国でWET試験の適用を受ける工場は、急性IWC(河川中の排水濃度)が33%以上の工業排出者や、製造工程、処理工程、排水またはそれを受ける河川のデータなどに基づいて毒性または河川への影響を持つ可能性があると考えられるその他の排出者が該当する。過去に水生生物に対して毒性を持つ成分が排水中に含まれていたことがある工場も対象となる。試験の頻度は四半期に1度が最も一般的であるが、毒性影響の懸念が大きい場合は実施頻度を高く設定する必要がある。一方、高頻度でWETスクリーニングを実施した結果、毒性影響の懸念が少ないことが確認された工場では、実施の頻度を下げることができる。通常の毒性試験は化学物質ひとつひとつに対応したものであり、実際の環境中での様々な化学物質が混在した状

況については十分に対応しきれていない点があるが、このWETシステムは排水中の化学物質混在状態の毒性を評価することが可能と考えられている。米国以外では、カナダ、欧州10か国(英、仏、独など)、ニュージーランドがWETシステムを導入しており、お隣の韓国でも10年近い検討を踏まえて昨年より導入に踏み切った。

環境省の取り組み

環境省では、WETシステムの検討着手に当たって、一般向けのセミナーを2010年2月と2012年1月に開催し、米国や韓国のWETシステムの歴史や現状について紹介するとともに、2010年末に「生物応答を利用した水環境管理手法の制度・運用分科会」(以下、制度運用分科会と略)および「排水(環境水)管理のバイオアッセイ技術検討分科会」(以下、技術検討分科会と略)を立ち上げた。制度運用分科会では、水環境行政における水生生物等を保全するための化学物質管理の仕組み、排水管理における現行制度での問題点などを検討している。一方、技術検討分科会では技術面から排水のサンプリング方法、排水の取り扱い、試験法の立案などを検討している。2011年度には3試験法について複数機関によるパイロット試験が実施された。

WETシステムの試験法

化学物質の影響を調べるための水生生物を用いた通常の試験では、生態系の機能と構造を考慮し、①生産者(藻類など)、②1次消費者(動物プランクトンなど)および③2次消費者(魚類など)から供試生物を選択している。具体的には、①から緑藻類を用いた生長阻害試験(試験期間=72時間)、②からオオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いた急性遊泳阻害試験(同=48時間)、③から魚類(コイやメダカ)を用いた急性毒性試験(同=96時間)を実施しており、いわゆる3点セットと称している。WETシステムの試験もこの考えに基づいているが、②および③については急性影響のみならず亜慢性的な影響をも評価するため異なる試験

法が提案されている（後述）。各々の試験法は現段階では案の段階であり確定的なものではなく、今後多少の変更を伴う可能性も残されている。いずれの試験でも、排水はろ過後、段階的に希釈されて試験に供される。以下に、①②および③を用いた試験について、課題を含めて要約する。

① 淡水藻類を用いる生長阻害試験

本試験法はOECD（経済協力開発機構）の化学物質テストガイドライン201などを参考に策定されたもので、通常の化学物質試験で用いられる淡水産緑藻類の1種、ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*）を供試生物として用いる（Fig. 1）。藻類はその生長に栄養塩と光が必要であるため、培地にはOECD培地を用い、72時間の暴露期間を通して照度60～120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の連続光の下で試験を行う。暴露期間中、藻類は分裂を繰り返して細胞数を増やすので、対照区（排水が含まれていない、培地のみ）と比較した排水濃度区の細胞の増え方の阻害率が試験のエンドポイントとなる。暴露開始時の細胞密度は 1×10^4 細胞/mLである。対照区の生物量が暴露期間中に少なくとも16倍に増殖すること、毎日の生長速度の変動係数の平均値が35%を超えないこと、繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えないことが試験成立条件である。これらの条件はOECD201そのものの条件であり、問題なく対応できた。ただし、今回のパイロット試験では、排水濃度区が5%、10%、20%、40%および80%に指定され、各々藻類の生長に必要な栄養塩を含む通常の培地で希釈して調製したため、例えば、栄養塩を対照区の20%しか含まない80%区では栄養的なハンディキャップにより藻類

の生長が阻害される可能性も考えられる。今後の検討課題であろう。

② ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法

本試験法は米国EPAの試験ガイドラインなどを参考に策定された（Fig. 2）。供試生物としてはオオミジンコと同じミジンコ科のニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いる。7日間の試験であり（今回のパイロット試験では8日間）、産出当日の幼体から暴露を開始し、これらが成長、成熟して産出する生存幼体数がエンドポイントとなる。各試験区1容器に1個体を収容し、10連準備する（計10個体/試験区）。排水の影響がある場合は、産出される幼体数が減少したり、更には親ミジンコが死亡することになる。排水は2日毎に新しいものに換える（半止水式）。この場合、新しい排水を入れた新しい容器を準備しておき、そこに旧容器から生物を移す。供試生物を成長、成熟させるため、給餌する必要がある。対照区において暴露終了時の親ミジンコの死亡率が20%を超えないこと、暴露終了時まで少なくとも親ミジンコの60%が3腹の幼体を産出していること、最初の3腹で平均幼体数15個体を超えること、休眠卵の生産がないことが試験成立条件である。これらの条件については問題なく対応できた。オオミジンコの場合も繁殖試験法のガイドラインが存在する（例えばOECDガイドライン211）が、試験期間が21日間と長期にわたる。より小型のニセネコゼミジンコの場合は短期間で済む点がメリットである。一方で、小型であることや、繁殖間隔が短くなる点で、観察がより難しくなるデメリットもある。また、今後も検討が必要な点としては、幼体産出数と試験期間との関係が

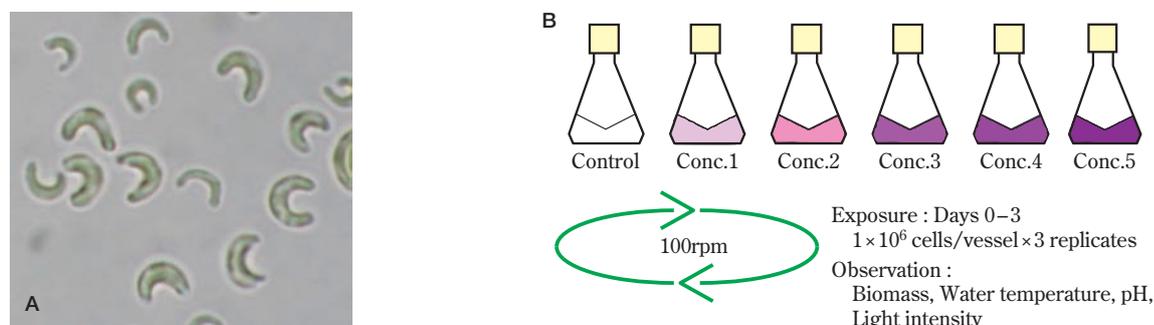


Fig. 1 Summarized diagram of growth inhibition test with unicellular green algae
A. *Pseudokirchneriella subcapitata*, B. Growth inhibition test

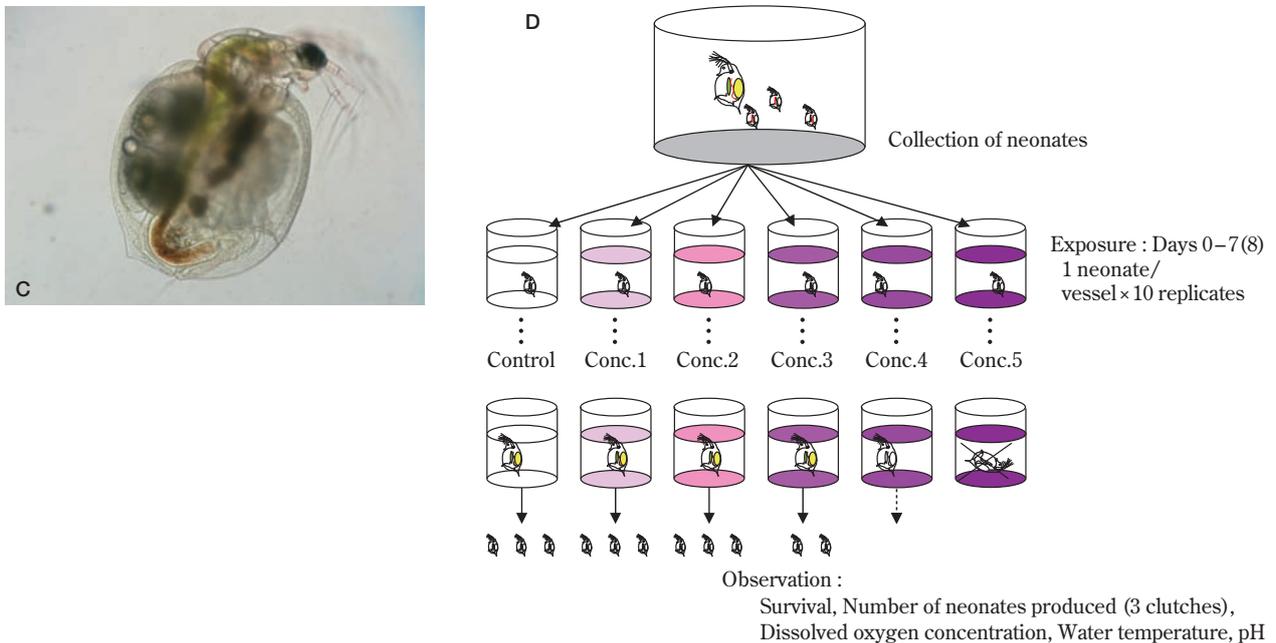


Fig. 2 Summarized diagram of reproduction test using *Ceriodaphnia dubia*
 C. *Ceriodaphnia dubia* (adult female), D. Reproduction test

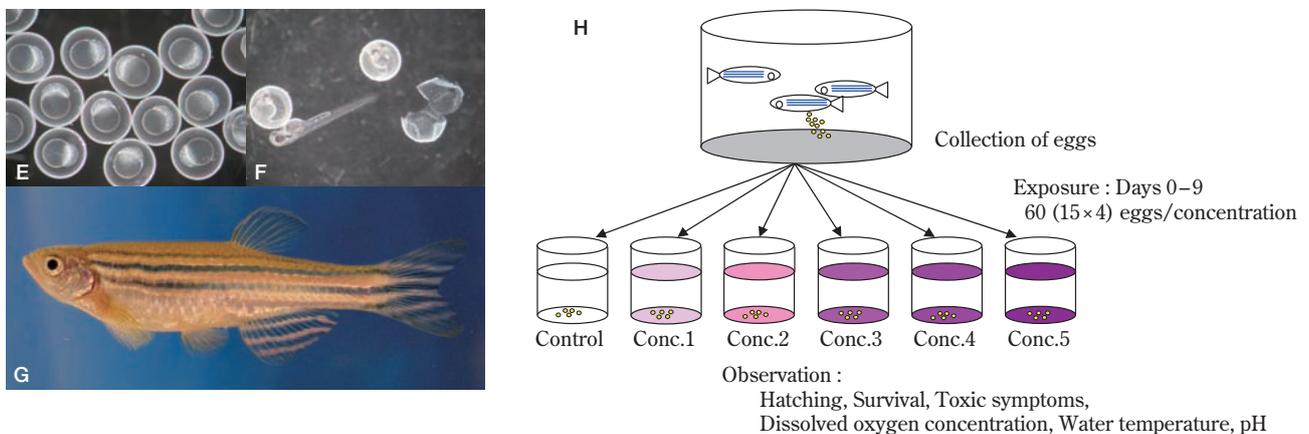


Fig. 3 Summarized diagram of fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages
 E. *Danio rerio* (embryos, morula stage), F. *Danio rerio* (sac-fry at hatching), G. *Danio rerio* (adult male),
 H. Fish short-term toxicity test

挙げられる。ミジンコ類は試験期間中に生長してサイズが大きくなり、その分、幼体産出数が1腹毎に増加するので、最後の1回を産むか産まないかにより、評価が大きく左右される可能性が大きい。このため、試験期間を7日または8日と日数で規定するか、あるいは幼体産出3腹とするのか決定する必要があると思われる。

③ 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

本試験法はOECDガイドライン212などを参考に策定された (Fig. 3)。米国では主にファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*、コイ科) が用いられるが、わが国ではゼブラフィッシュ (*Danio rerio*、コイ科) またはメダカ (*Oryzias latipes*、メダカ科) を用いることとして

いる。暴露期間は使用する魚種の卵期の長さに依存しており、卵期の長さが3日程度のゼブラフィッシュの場合は9日間、10日程度のメダカの場合は16日間である。受精後数時間の卵から暴露を開始し、孵化を経て卵黄を吸収するまでの生存率を観察する。各試験区1容器に15個体を収容し、4連準備する（計60個体/試験区）。魚類の試験でも排水は2日毎に新しいものに換える（半止水式）。試験期間中の栄養は卵黄のエネルギーでまかなえるため、給餌は不要である。対照区における孵化率が80%以上であること、暴露終了時の生存率が70%以上であること、溶存酸素濃度が暴露期間を通して飽和酸素濃度の60%以上であることが試験成立条件である。住化テクノサービス(株)の試験ではゼブラフィッシュを用い、上記の孵化率、生存率とも100%であり、問題は認められなかった。

④ 試験結果の評価

今回のパイロット試験では、各々の試験について無影響濃度（NOEC）、すなわち、観察した複数の項目について全く影響が認められなかった濃度を求めた。これによって排水をどこまで希釈すれば影響がなくなるのかがわかる。米国では基本的に排水の流入する河川水、すなわち、河川水によって希釈された排水が水生生物に悪影響を与えないことを前提に基準を設けている。基準を超過しなければ問題はないが、基準を超過する排水の場合は、その毒性の低減が義務づけられる。この低減化は毒性削減評価（TRE）として段階的な手順が定式化されており、その過程で毒性同定評価

（TIE）という手法で毒性の原因物質を探索している。原因物質がわかれば、その毒性低減が目標となるのである。日本でも、一定の希釈率以下の濃度で影響が認められた場合、何らかの対応（排水処理施設の改善、etc.）を要求される可能性もあるが、今のところ、環境省からはその辺りの情報は発信されていない。

今後の展開

環境省の技術検討分科会では試料のサンプリング方法や試験方法の改良について議論が進められている。住化テクノサービス(株)では、今回のパイロット試験でWETの3種試験法について技術面での問題はなく対応できた。試験法の項で述べた課題については今後改良や検討が必要であるが、改良・検討後の試験法についても十分に対応可能である。魚類についてもその他のガイドライン推奨種について、いずれも繁殖経験が豊富である。住化テクノサービス(株)では、いつでもWET試験を実施できる体制にあり、今後、試験法や規制動向に関する環境省や諸外国の動向を注視して最新の情報を得るとともに、質の高い試験を実施することによって、お客様の期待に応えていきたいと考えている。

お問い合わせ先：

住化テクノサービス株式会社
環境科学センター 環境生態部
〒665-0051 宝塚市高司4-2-1
TEL：0797-74-2100