

バイオアッセイで環境をはかる

城内 智行*・服部 聡*・道山 晶子*・吉次 祥子*・入佐 英紀*

1 はじめに

‘バイオアッセイ’は‘生物応答’に言い換えられ、化学物質等に対する生物学的な応答を分析する方法である¹⁾。その一例として、ある物質が生物に異常または斃死を発生させる濃度を分析する‘毒性試験’が挙げられる。

環境中には、低濃度であっても多様な化学物質が含まれており、これら化学物質の生態系への毒性影響や複合影響については、ほとんど分かっていないのが現状である。近年は、安全・安心な水環境を確保し、水質汚濁や有害な汚染による水生生物等への悪影響を未然に防止するために、河川等の公共用水域および事業場などの排水中の多様な化学物質を総合的に管理する手法が求められている。

このような中、平成23年4月に、福岡県からバイオアッセイの結果の解釈に関して相談を受けたのをきっかけに、当該分野に関する文献調査を行うとともに専門家にヒアリングを行う機会を得た。バイオアッセイにおいては、日本の基準化・法令化は欧米諸国に対して立ち遅れているものの、今後、発展す

る可能性がある分野との有益な情報を得ることができた。そこで、当協会において研究会を立ち上げて、平成23年6月以降、更なる情報収集と試験技術の習得を進めてきたところである。

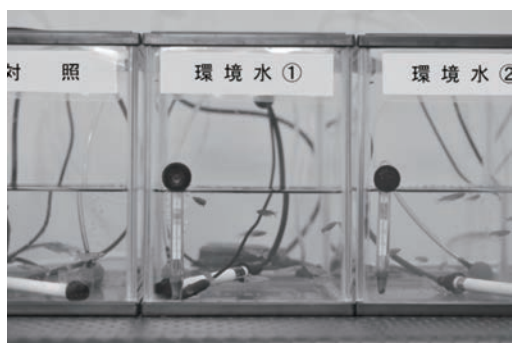
本稿では、バイオアッセイの日本を含めた世界的な動向と将来展望をまとめるとともに、当協会の試験技術のこれまでの習得状況と今後の展開を紹介する。

2 各国のバイオアッセイに関する動向

化学物質に対するある特定の生物反応を、公的に認証を受けたバイオアッセイで明らかにし、試料の有害性を導き出す方法は生態影響試験と称される。新規化学物質の登録・規制に関する法律は、経済協力開発機構(OECD)により既に世界的に標準化されており、化学物質が環境中に排出されることを想定して生態影響試験の実施が義務づけられている²⁾。これらの試験では、化学物質を単独で水に溶解させて、様々な生物を用いたバイオアッセイが実施され、その毒性が事前に評価される。

一方で、排水や環境水に関する試験では、その基準や試験方法の整備は、国で大きな差がみられる。アメリカ、カナダ、EU諸国における排水管理は、**図1**に示すように水質調査(化学的監視)、生物調査(生物学的評価)、バイオアッセイ(毒性試験)の3本立て³⁾となっており、バイオアッセイは環境をはかるツールの一つとして重要な位置を占めている。

中でもアメリカは、バイオアッセイによる排水管理を制度化し、その普及に積極的に取り組んでいる



魚類によるバイオアッセイの状況

*一般財団法人九州環境管理協会 バイオアッセイ研究会

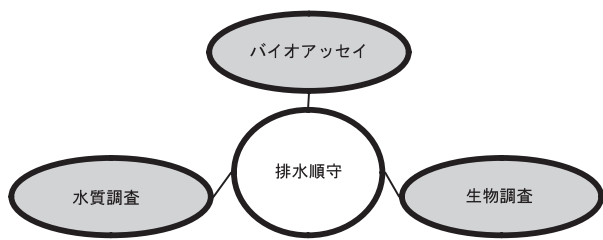


図1 欧米諸国の排水管理³⁾

国である。アメリカ環境保護庁は、バイオアッセイによる環境評価および管理手法としてWET (Whole Effluent Toxicity, 全排水毒性試験) システムを1995年に導入した⁴⁾。WETシステムでは、最終的な目的として、「国内の水域の物理化学的及び生物学的に元の状態を維持、回復させること」が掲げられており、これに基づいて水生生物保全基準といった水質環境基準が策定されている。WET試験は州で管理され、頻度、結果の解釈はそれぞれの目的に応じて設定される。

カナダも、バイオアッセイによる環境監視の技術が先行している国の一つであり、過去20年間にその技術革新を進めてきている。カナダ環境省は、1990年以降、水、底質、土壌における有害物質および混合物に関する毒性試験の実施に関する22の標準生物学的試験法の文書を出版した³⁾。プログラム開始以降、これまでに15の生物学的方法の文書が改正された。

ドイツは、欧州の中でもっともバイオアッセイへの取り組みが活発で、排水令において5種のバイオアッセイを定めている⁵⁾。

アジア諸国では、欧米に比べ基準化などで立ち遅れているが、2011年に韓国がアジアで初めてWETシステムを導入して、排水管理を始めた³⁾。韓国では、ミジンコを対象生物とした試験だけを導入しており、欧米諸国では2種以上の複数種を対象としているのに比べると簡易型の試験となっている。

試験方法は、細菌、藻類、植物、無脊椎動物、魚類など多くの種を対象としたものが基準化されており、中でも表1に示す細菌、藻類、ミジンコ類、魚類の試験法は多くの国の公的な試験方法となっている^{2) 3)}。試験生物は、表2に示すようにそれぞれ長

表1 欧米諸国のWET試験生物³⁾

	魚類	ミジンコ属	藻類	細菌
アメリカ	○	○	○	
カナダ	○	○		
イギリス		○	○	
オランダ	○	○	○	○
ベルギー		○	○	○
デンマーク	○	○	○	○
フランス	○	○	○	○
ドイツ	○	○	○	○
北アイルランド	○	○	○	○
ノルウェー	○	○	○	
スウェーデン	○	○	○	
スペイン		○		○
ニュージーランド		○	○	○
合計	10	13	12	8

表2 試験生物の比較³⁾

	魚類	ミジンコ属	藻類	細菌
感受性	2	4	3	3
試験期間	1	4	2	5
空間要件	3	4	4	4
繁殖率	2	4	4	5
採取、培養	2	4	4	4
均一性	2	4	4	4
合計	12	24	21	25

*5: 最良 4: 良 3: 普通 2: 不良 1: 最不良

所と短所をあわせもつため、試験目的に応じて選択することが重要である。

アメリカなどでは既に20年ほど試験を運用してきているため、様々な問題点も指摘されている³⁾。特に問題視されているのは、試験結果のばらつきに関するものである。複数の試験所で試験を同時に行った場合、矛盾した結果が出ることも少なくない。試験所の能力に影響される場合もあるため、試験所の認定には厳しい基準が設けられている。

3 わが国のバイオアッセイに関する動向と展望

日本では、もっぱら化学物質の人に対する健康影響や有機汚濁物質等による富栄養化の防止が環境行政の主流で、化学物質が及ぼす野生生物等の生態系への影響については十分な政策がとられていなかったが、近年その重要性が認識されるようになり、1999年以降になって、関係法令の整備が行なわれている。2003年に化審法が改正され、化学物質の登録に生態影響試験が義務付けられるようになった⁶⁾。

表3 日本の化学物質の生態影響評価への取り組み

1. 1999年 化学物質排出把握管理促進法 (PTRT法)
 - ・有害性の高い特定の化学物質の移動量, 排出量, 使用量などの届出の義務化
2. 生態毒性, 生態影響リスク評価の開始
 - ・環境省, 経済産業省など各省庁で既存化学物質の再点検作業
3. 2003年 化審法の改正
 - ・動植物を対象とした生態影響試験の導入
 - ・既存化学物質の動植物に対する毒性
 - ・新規化学物質の動植物に対する毒性
4. 2009年 化審法の改正
 - ・バイオアッセイによるスクリーニング評価の導入
5. 2009年以降 バイオアッセイを利用した水環境管理手法の検討
 - ・モデル的試行, ガイドラインの策定, 制度・運用の枠組み

また, 生態影響試験には, 優良試験所基準 (GLP, Good Laboratory Practice) が設定されており, 試験機関は登録が必要となった⁷⁾。

一方, 排水や環境水の管理においては, バイオアッセイは義務付けられていない。しかし, 未知の化学物質や複数の物質の総体的な生物影響に対して, 従来の水質規制だけでは対応が難しいとして, バイオアッセイ導入の検討を数年前から始めており⁸⁾, 環境省と独立行政法人国立環境研究所が中心となって, 排水管理手法の検討を継続しているところである。

国立環境研究所では, 有識者による「WET手法等による水環境管理に関する懇談会」を設置して検討を行っている⁹⁾。環境中や事業場排水中の化学物質による影響を総合的に把握するため, 影響の低減を図るアメリカ WET システムを参考にしたバイオアッセイによる排水管理の国内への導入を推進している。試験方法としては, アメリカで一般的な緑藻

Pseudokirchneriella subcapitata の生長阻害試験, ニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* の繁殖阻害試験, ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の発生阻害試験が検討されており, 複数試験機関によるパイロット試験が実施されている。

試験方法に関しては, これらの3手法の試験の作業が煩雑で期間が長いため, 試験を実施できる機関が少なく, WET 導入後に試験を全国に展開することが困難であるとの指摘がある¹⁰⁾。より簡易なヒメダカ *Oryzias latipes* やオオミジンコ *Daphnia magna* による急性毒性試験をまずは導入することや, 韓国の事例のようにいずれかひとつの試験に絞ることも検討されている^{11) 12)}。

このように, 日本の WET 試験は導入一步手前の段階になっており, 導入時期は1~2年後と考えられる。WET 試験の導入後は, 自治体発注の環境調査の中でバイオアッセイが一項目として標準化されることが予想され, 将来的には需要が増える可能性を大いに秘めている。

4 当協会における取り組み

4-1. 研究のスケジュール

このような背景の中, 当協会ではバイオアッセイ研究会を立ち上げて, WET 試験に必要な知識と技術の習得を進めてきた。2年計画で, 藻類, ミジンコ類, 魚類の急性と慢性毒性試験技術を習得し, GLP への

表4 研究スケジュール

	平成23年度			平成24年度			
	6~9月	10~12月	1~3月	4~6月	7~9月	10~12月	1~3月
1. 試験の知識と技術の習得 ・情報収集 ・藻類生育阻害試験 ・ミジンコ急性遊泳阻害試験 ・ミジンコ繁殖阻害試験 ・魚類急性毒性試験 ・魚類初期生活段階毒性試験	講演会やセミナーに参加, 随時						
		試験実施				試験実施	
		試験実施					
			試験実施				
						試験実施	
2. GLP適合に向けた準備 ・情報収集 ・試験室の改築・機材の設置 ・標準操作手順書の作成 ・GLP申請	講演会やセミナーに参加, 随時						
		機材購入		改築			
			3手法				
						2手法	
							申請

登録を目指している（表4）。

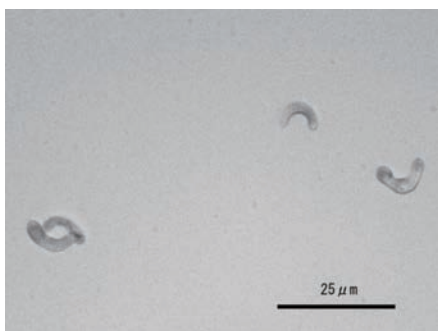
4-2. WET試験技術の習得

技術習得が必要な5つの試験の概要を以降に示す。

これまでに実施した標準物質による試験の結果は、試験マニュアルで示されている値の範囲内であり（図2,3,表5）、すでに藻類生長阻害試験、オオミジンコ急性遊泳阻害試験、ヒメダカの急性毒性試験の3手法の技術を習得したところである。あわせて、標準作業手順書（SOP）を作成した。ミジンコ繁殖阻害試験と魚類初期生活段階毒性試験については、平成24年度に習得予定となっている。

A. 藻類生長阻害試験

水系食物連鎖における生産者である藻類を対象とし、化学物質に72時間曝露した際の半数影響濃度EC₅₀から藻類の生長、増殖に及ぼす影響を把握する。同時に、72時間曝露した際の無影響濃度NOECから慢性毒性を評価する。



試験生物 緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*

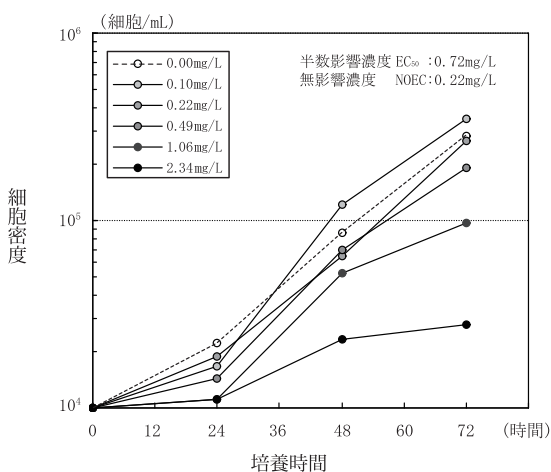


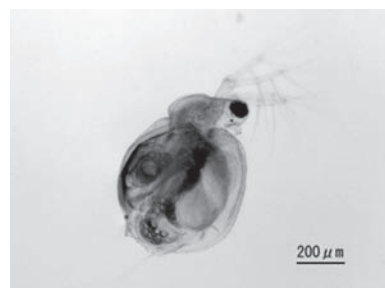
図2 標準物質（重クロム酸カリウム）を用いた藻類試験の結果（平成24年1月4日実施）

B. ミジンコ急性遊泳阻害試験

水系食物連鎖における一次消費者である動物プランクトンを対象とし、化学物質に48時間曝露した際の半数影響濃度EC₅₀から、動物プランクトンに及ぼす影響を把握する。

C. ミジンコ繁殖阻害試験

水系食物連鎖における一次消費者である動物プランクトンを対象とし、化学物質に21日間曝露した際の半数影響濃度EC₅₀から、動物プランクトンの繁殖に及ぼす影響を把握する。



繁殖阻害試験対象種 ニセネコゼミジンコ

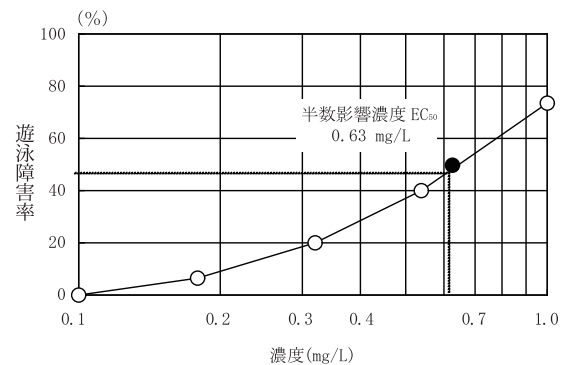


図3 標準物質（重クロム酸カリウム）を用いたミジンコ試験の結果（平成23年12月21日実施）

D. 魚類急性毒性試験

水系食物連鎖における高次消費者である魚類を対象とし、化学物質に96時間曝露した際の半数致死濃度LC₅₀より魚類に及ぼす影響を把握する。

E. 魚類初期生活段階毒性試験

魚類を対象とし、受精卵から稚魚へ生長するまで試験物質を連続的に曝露した際の最小影響濃度LOEC、無影響濃度NOECから慢性的な影響を把握する。孵化数と生存数、体形異常、行動阻害、体長、体重を測定または観察する。

4-3. GLP適合のための準備

情報収集のため、平成23年9月の‘第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会’、平成24年1月の‘諸外国における生物応答を用いた排水管理手法に関するセミナー’に参加し、講演を聴講するとともに、当分野の専門家にヒアリングを行った。GLP適合のために必要な施設、機器などの必要な知見は、概ね収集することができた。

GLPには、試験系への悪影響を防ぐ目的で、試験系を確実に隔離することができる適切な部屋、区域もしくは構造を有することと規定されているため、試験施設の改築を進め、平成24年5月に試験設備を整えたバイオアッセイ専用の実験室が完成した。



試験生物 ヒメダカ

表5 標準物質（硫酸銅(II)5水和物）を用いた魚類試験の結果（平成23年12月19日実施）

項目 試験時間	LC ₅₀ 値 (mg/L)	95%信頼限界(mg/L)
48時間後	7.2	2.3~
72時間後	5.3	1.7~
96時間後	2.3	1.2~77.7

平成25年3月までには、WET試験に完全に対応できる体制が整う予定となっている。

4-4. その他の試験

WET試験とは別に、当協会ではGLPを必要としない薬剤などのバイオアッセイを、これまでに実施した実績がある。平成24年度までに当協会において実施可能となる試験は、表6に示すとおりである。

試験目的によっては、公的な方法に限らず、海水種、水産有用種など目的に応じて選択する必要があるため、様々なバイオアッセイに対応できる体制は重要と考えている。

5 今後の展開

WET試験の法令化は、平成25年度以降となる見込みのため、当面は、環境省の化審法で定められたGLPに登録できるように準備を進めているところである。環境水を扱うWET試験に比べると新規の化学物質を取り扱う化審法の規制は厳しいが、化審法に適合できればWET試験への参入がスムーズに進むと考えられる。また、工場排水、農薬、廃棄物処理施設の放流水など新規分野での業務獲得に役立てられる。

試験方法についても、有用な手法は積極的に習得を進めていきたいと考えている。細菌類の試験¹³⁾は、

表6 実施可能なバイオアッセイの一覧

試験項目	生物種	試験基準	
急性毒性試験	藻類 淡水 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	OECD化学品テストガイドライン WET試験 ISOマニュアル	
	魚類 淡水 ヒメダカ	OECD化学品テストガイドライン	
	ミジンコ類	淡水 オオミジンコ	OECD化学品テストガイドライン JISマニュアル ISOマニュアル
		海水 シオダマリミジンコ	海産生物毒性試験指針(水産庁)
	甲殻類 海水 クルマエビ	海産生物毒性試験指針(水産庁)	
長期間毒性試験	魚類 淡水 ヒメダカ	OECD化学品テストガイドライン	
	海水 マダイ, ヒラメ	海産生物毒性試験指針(水産庁)	
	甲殻類 海水 クルマエビ	海産生物毒性試験指針(水産庁)	
慢性毒性試験	藻類 淡水 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	OECD化学品テストガイドライン WET試験	
	魚類 淡水 ゼブラフィッシュ		
	ミジンコ類 淡水 ニセネコゼミジンコ		
発生阻害試験	ウニ類 海水 ムラサキウニ, アカウニなど	海産生物毒性試験指針(水産庁)	

試験期間が1時間程度と短い点や再現性の点で優れており、また発がん性や突然変異を引き起こす物質の検出が可能となる。諸外国でも試験実績が多く³⁾、日本でも公的な方法になる可能性があり、今後、導入を検討していきたいと考えている。

我々は、様々な化学物質に囲まれ生活しており、これらの化学物質は私たちに豊かな恩恵を与えてくれる一方で、健康や自然環境に悪影響を及ぼす危険性を含んでいる。バイオアッセイは、これらの化学物質を管理していく上で必要不可欠な手法であり、今後も研究会を継続し、当協会の環境調査への導入を進めていきたい。

謝辞

鹿児島大学水産小山次朗教授（前当協会理事、現当協会技術諮問委員）、国立環境研究所環境リスク研究センター菅谷芳雄博士、同センター鎌迫典久博士に、バイオアッセイについて様々なアドバイスをいただいた。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 岩波生物学辞典第4版. 岩波書店. 1998年
- 2) 生態影響試験ハンドブック - 化学物質の環境リスク評価 -. 日本環境毒性学会編集. 2003年
- 3) 諸外国における生物応答を用いた排水管理手法に関するセミナー講演資料. 環境省・独立行政法人国立環境研究所共催. 2012年
- 4) 米国におけるWETシステムに関するセミナー講演資料. 環境省・独立行政法人国立環境研究所共催. 2010年

- 5) 水環境における化学物質の管理. 滋賀県立衛生環境センター編集, 衛生と環境 No.95:1-3, 2001年
- 6) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (平成22年度) 講演資料. 環境省・独立行政法人国立環境研究所共催. 2011年
- 7) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について. 厚生労働省・経済産業省・環境省. 2011年
- 8) 環境リスク研究プログラム (中間報告). 独立行政法人国立環境研究所. 国立環境研究所研究報告 SR-84-2008, 2008年
- 6) バイオアッセイによって環境をはかる - 持続可能な生態系を目指して -. 国立環境研究所, 環境儀 No.38, 2010年
- 10) 門田, 中村, 西田, 岩田, 大久保 (2011) 排水生物影響の原因究明および削減対策法. 第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集 p70-71
- 11) 西田, 門田, 中村 (2011) 排水水質管理における生物影響評価の方法について. 第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集 p72
- 12) 西田, 門田, 中村 (2011) 排水の生物影響評価に用いる甲殻類毒性試験の比較・検証. 環境毒性学会誌 14(1): 99-107
- 13) 荒川, 野々村, 栗田, 杉森 (2007) 海洋性発光バクテリアを用いた簡易毒性試験方法. 東京都立産業技術研究センター研究報告 2: 110-111