

生物応答を利用した排水管理手法の活用について

平成27年11月

生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会

目 次

はじめに	1
1. 生物応答を利用した排水管理手法の活用の背景・意義	3
(1) 我が国における化学物質対策と水生生物保全の観点の取組	3
(2) 生物応答を利用した排水管理手法の活用の意義	4
(3) 各国の生物応答を利用した排水管理制度	5
(4) わが国における活用状況	8
2. 生物応答を利用した排水試験・評価方法	13
(1) 対象とする毒性	13
(2) 試験法の種類と使用する生物種	14
(3) 試料	16
(4) 試験の実施頻度	16
(5) 試験結果の評価	16
(6) 試験の簡略化	17
(7) 試験実施にあたっての留意事項	18
(8) 試験の実施体制と精度管理	19
(9) 試験実施コスト	19
3. 生物応答を利用した排水管理の在り方	21
(1) 排水管理における位置付け	21
(2) 現行の排水管理手法との関係	21
(3) 試験実施事業場	22
(4) 試験結果の活用方策	22
(5) 本手法の普及促進	23
(6) 公共用水域を対象とした生物応答試験	23
(7) 水質事故時への活用	24
おわりに	25
参考資料	26

はじめに

様々な産業活動や日常生活で利用される多種多様な化学物質の中には、人の健康や生態系に有害な影響を及ぼすおそれがあるものが存在する。これらの化学物質による環境汚染を防止するため、製造・使用・廃棄時に適切な管理を行うための様々な法規制が行われているが、10万種類にも上る化学物質が利用される現在、より効率的な管理手法について検討を進める必要がある。平成24(2012)年に策定された生物多様性国家戦略2012-2020の中でも、化学物質による生態系への影響については、多くのものがいまだ明らかではなく、適切なリスク評価の実施等の対応の必要性が指摘されている。

我が国の化学物質対策は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(昭和48(1973)年法律第117号。以下「化学物質審査規制法」という。)や「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」(平成11(1999)年法律第86号。以下「化学物質排出把握管理促進法」という。)により、化学物質による環境汚染の未然防止のための審査・規制や事業者の自主的な取組の推進が図られてきた。

また、水環境保全の観点から、環境基本法(平成5(1993)年法律第91号)第16条により維持されることが望ましい基準として、水質汚濁に係る水質環境基準が健康項目(27項目)と生活環境^{*1}項目(12項目)について定められており、その中で水生生物の保全の観点からの環境基準(3項目)も定められている。

さらに、水質汚濁防止法(昭和45(1970)年法律第138号)に基づき、人の健康の保護と生活環境^{*1}の保全を目的として、特定施設を設置する工場又は事業場(以下「特定事業場」という。)から公共用水域へ排出される排水に対して排水規制が実施されており、有害物質28物質と生活環境^{*1}項目15項目について定められた排水基準値への適合が求められている。

しかし、近年は日々の暮らしの中で使用されている化学物質等の種類が年々増加しており、毒性情報について未知のものや排水規制の対象とするに至らない化学物質について、水環境中で水生生物に影響を及ぼし得ることが懸念されている。また、全国の一級河川において原因不明の魚の浮上死も毎年報告されている¹⁾。

諸外国では、有害性が明らかにされた物質の個別規制に加え、このような未知物質や規制対象外の物質も含めて評価する取組として、排水の水生生物への影響を総体的に把握することが可能な、排水に対してバイオアッセイ(生物応答試験)を適用する手法が排水規制の一手段として実施されてきている。

一方、我が国では、平成23(2011)年3月に今後の水環境の保全の在り方について検討会報告²⁾が取りまとめられ、その中で、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^{*2}の有効性について検討が求められた。ただし、バイオ

アッセイの排水への適用にあたっては、排水に含まれる水生生物に有害性を有する未規制物質を監視することが可能と考えられるものの、試験に要する時間やコストの負担、一般的な化学分析と異なる、使用生物種の違いによる試験結果の変動等、試験を実施する上での様々な課題が指摘されている。

このようなことを受け、平成 22(2010)年度に、本手法の導入の在り方を検討する「生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会（座長：須藤隆一東北大学大学院工学研究科客員教授）」が設置され、制度・運用について検討する「生物応答を利用した水環境管理手法の制度・運用分科会（座長：森田昌敏愛媛大学農学部客員教授）」において、現行の個別排水規制との関係整理等、制度的な課題の抽出・検討を行ってきた。同時に、具体的な試験方法を検討する「排水管理のバイオアッセイ技術検討分科会（座長：楠井隆史富山県立大学工学部環境工学科教授）」も設置され、諸外国や国際的な試験法等を参考に我が国における試験法を提案し、実際の排水への適用事例から様々な課題の抽出・検討も行ってきた。

このように本検討会では、生物応答を利用した排水管理手法の必要性・技術的対応可能性等を検証するとともに、本手法を導入する場合の枠組みのあり方や課題等について様々な検討を行い、その結果をここにとりまとめた。なお、一定の結論を得るに至っていないものは、今後の検討に向けた論点の整理のため、各節に＜検討課題＞を記載した。

※ 1 環境基本法により、「生活環境」には、人の生活に密接な関係のある財産並びに人の生活に密接な関係のある動植物及びその生育環境を含む。

※ 2 米国では全排水毒性（WET：Whole Effluent Toxicity）試験という。

出典

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課（2015）：平成 26 年全国一級河川の水質現況（http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kankyo/kankyoku/suisitu/pdf/h26_suisitu/02_syousai.pdf）
- 2) 今後の水環境保全に関する検討会（2011）：今後の水環境保全の在り方について（取りまとめ）（<http://www.env.go.jp/press/files/jp/17164.pdf>）

1. 生物応答を利用した排水管理手法の活用背景・意義

(1) 我が国における化学物質対策と水生生物保全の観点の取組

①化学物質審査規制法による取組

人の健康を損なうおそれ又は動植物の生息若しくは生育に支障を及ぼすおそれがある化学物質による環境汚染を防止するため、化学物質審査規制法に基づき、新規の化学物質の製造・輸入の事前審査及び化学物質の製造・輸入・使用等について必要な規制が行われている。

この法律は、平成 15(2003)年の改正により、それまでの人の健康保護の観点だけではなく、人の健康と環境（生態系）の両者の保護に目的が拡大されたことから、事業者が新規化学物質の製造又は輸入の届出を行う際に生態毒性試験の試験成績の提出が求められることとなるとともに、水生生物、鳥類等の生息・生育に支障を及ぼすおそれのある化学物質も規制対象に加えられた。

②水質汚濁に係る環境基準及び水質汚濁防止法に基づく排水規制

環境基本法（平成 5 年法律第 91 号）第 16 条第 1 項に基づき、人の健康を保護し、及び生活環境を保全する上で維持されることが望ましい基準として、環境基準が定められている。

同法第 2 条第 3 項において、「生活環境」には「人の生活に密接な関係のある財産並びに人の生活に密接な関係のある動植物及びその生育環境を含む」と定義されており、このことを踏まえ、水産動植物に影響を及ぼす富栄養化や底層の貧酸素化の防止のための窒素・リンの環境基準の設定及び必要な排水規制が行われてきた。その後、生活環境保全の対象として、水生生物保全の観点が新たに加わり、生活環境の概念の中心にある有用な水生生物及びその餌生物並びにそれらの生育環境の保護を対象とした水生生物の保全の観点から、化学物質や重金属についても環境基準が設定されることとなり、平成 15(2003)年 11 月に全亜鉛に係る環境基準が設定された。

亜鉛の排水規制については、水質汚濁防止法の制定当初から、当時の水道への影響、漁業及び農作物被害の防止の見地からの知見に基づき、生活環境の保全に係る項目として排水基準が設定されてきたが、上記の環境基準設定を受け、水生生物保全の観点から平成 18(2006)年 12 月に排水基準が強化された。

その後、水生生物の保全の観点からの環境基準は、平成 24(2012)年 8 月にノニルフェノール、平成 25(2013)年 3 月に直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩がそれぞれ追加設定され、排水基準の設定についても現在検討が進められている。

③化学物質排出把握管理促進法による取組

事業者による化学物質の自主的な管理の改善を促進し、環境保全上の支障の未然防止を図るため、化学物質排出把握管理促進法に基づき、事業者が環境への化学物質の排出量の把握や届出等を行う PRTR 制度及び事業者が化学物質の性状及び取扱に関する情報（SDS）を提供する SDS 制度等が定められている。

対象となる化学物質のうち、動植物の生息・生育に支障を及ぼすおそれがあるものについては、水生生物（藻類、ミジンコ、魚類）に対する生態毒性を考慮して選定されている。現在 PRTR・SDS 両制度の対象となっている第一種指定化学物質 462 物質のうち、生態毒性を考慮して選定されたものは 331 物質、SDS 制度の対象となっている第二種指定化学物質 100 物質の中では 59 物質となっている。

④農薬取締法による取組

農薬の品質の適正化とその安全かつ適正な使用の確保を図るため、農薬取締法（昭和 23(1948)年法律第 82 号）に基づき、農薬の登録制度が設けられ、販売及び使用の規制等が行われている。

登録の申請のあった農薬に対し、登録を認めるかどうかの判断基準として、作物残留、土壌残留、水産動植物の被害防止、水質汚濁等様々な観点から農薬登録保留基準が定められているが、このうち水産動植物の被害防止に係る登録保留基準値は、水生生物（藻類、甲殻類等、魚類）に対する毒性試験の結果から求めた急性影響濃度を基に設定されている。農薬の成分の公共用水域における環境中予測濃度が、登録保留基準値に適合しない場合は、その農薬の登録は保留とされる。

平成 27(2015)年 9 月 14 日現在、水産動植物の被害防止に係る登録保留基準の評価が実施された 403 農薬のうち、基準値が設定済みの農薬は 293 農薬、基準値の設定が不要とされた農薬は 110 農薬となっている。

（２）生物応答を利用した排水管理手法の活用の意義

①水質の現況

現行の排水規制は、人の健康の保護と生活環境の保全を目的として、特定事業場に対し、個別物質ごとに定められた排水基準値の遵守を求めており、これまで各事業場の努力等により、公共用水域における環境基準達成率が上昇（平成 25 年度における全公共用水域の環境基準達成状況は、健康項目で 99.2%、生活環境項目（BOD 及び COD に限る）で 87.3%）し¹⁾、一定の成果が得られている。

しかしながら、平成 26 年度には、全国の一級河川において、原因物質が特定できない魚の浮上死が 139 件発生しており、またシアン、有機溶剤、農薬等の化学物質の流出が原因とされる事故も 64 件報告されている²⁾。

森田ら³⁾は、河川水の毒性影響の評価、毒性の傾向と分布等を調べるため、全国の一級河川のうち 22 水系の環境基準点 28 地点において、平成 23 年 10 月から平成 24 年 4 月にかけて、藻類・ミジンコ・魚類の慢性毒性試験を実施し、そのうち 11 地点で何らかの毒性影響が検出されたと報告している。生物種別では、ニセネコゼミジンコ繁殖阻害試験で調査対象の 4 分の 1 に当たる 8 地点で毒性影響が検出され、ムレミカヅキモ生長阻害試験では 4 地点、ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験では 5 地点で検出されている。なお、何らかの毒性影響が検出された上記 11 地点では、人の健康の保護に関する環境基準及び水生生物の保全に係る水質環境基準を達成していた⁴⁾⁵⁾。また、三島ら⁶⁾⁷⁾や大塚ら⁸⁾は、神奈川県内の河川を対象とした調査事例で、

オオミジンコ遊泳阻害が認められたと報告している。さらに、板津ら⁹⁾は、事業場排水の河川流入地点の上下流の河川水を対象としてバイオアッセイを行い、下流の河川水で藻類と甲殻類に対する影響が認められたと報告している。

このように現時点では限られた知見ではあるが、公共用水域における生態毒性の影響を示唆する調査事例が報告されており、未規制の化学物質等が水環境中で水生生物に影響を及ぼし得ることが懸念される。

②活用の意義

工場等からの排水には、現行の排水基準に適合していても多様な化学物質が含まれている場合があり、工場等から少量で排出される物質や工場内で非意図的に生成される物質による影響、あるいはそれらの相加的又は相乗的な影響を的確に把握するための対応が求められる。

すなわち、排水中の多様な化学物質による水生生物への影響については、現在環境基準や排水基準が設定されている物質が限られている一方で、排水の排出先の水域への直接的な影響が懸念されることから、毒性自体や毒性のメカニズムが不明な化学物質についても対応が可能であり、かつ、化学物質の水環境への影響や毒性の有無を総体的に把握・評価する生物応答を利用した排水管理手法の活用によって、水生生物に影響を及ぼすおそれがある化学物質による環境汚染を効率的に防止することが期待される。

水生生物の生息・生育環境は水域の護岸や河床など物理的な構造といった要因の影響も受けており、本手法のみによって水生生態系の健全性が担保されるものではないが、排水を通じて公共用水域に排出される化学物質の水生生物への影響を評価・管理する一つの「ものさし」として利用を進めることが考えられる。

このように、各工場等における予防的措置の観点から、生物応答を利用した排水管理手法の活用を図ることが有意義であると考えられる。

（３）各国の生物応答を利用した排水管理制度

我が国においては、これまで、人の健康の保護及び水生生物の生息・生育を含む生活環境の保全の観点から、個別物質の規制を中心に排水規制を実施してきたところであるが、欧米諸国では、工場等からの排出負荷の管理及び水生生物の保全の観点から、生物応答を利用した排水管理制度が導入されている国も見受けられる。また、我が国においても本手法の自主的な活用事例が広がりつつある。

①米国

米国では、化学物質同士の相互作用や副生成物、水生生物基準がない化学物質による潜在的リスクの評価に対応し、排水に含まれる有害な化学物質を総体的に評価する規制に取り組むため、1987年の水質浄化法（CWA：Clean Water Act）改正により、生物応答を用いた排水評価法がWET（Whole Effluent Toxicity）試験という名称で排水監視ツールに追加され、国家汚濁物質排出削減計画（NPDES：National Pollutant

Discharge Elimination System) による排水認可制度において WET 試験が個別物質の規制と併用して利用されるようになった¹⁰⁾¹¹⁾。

現在、藻類、大型藻類（海洋性）、無脊椎動物、魚類を対象とした急性および慢性毒性試験法が全部で 17 種類規定されており¹²⁾、排水量や放流先環境等に応じて 1 ～ 数種類の試験実施が各事業者に要求される。従来の化学物質の個別規制において、化学物質同士の相互作用や水生生物基準がない化学物質による潜在的リスクの評価が十分でない場合に、生物応答試験がリスク決定の一手段となることから、個別物質の規制と併用することで、総合的な評価が行われ、事業場排水の認可制度に利用されている。

削減計画の運用は各州や米国 EPA の地域事務所 (Region) が行うため、各州・Region は米国 EPA が定めた WET を用いた規制を実施するための技術文書 (1985 年公表、1991 年改訂)¹³⁾を参考に制度を定めている。

WET 試験では、基本的に排水口 (End of Pipe) において排水を採取し、清澄な水 (排水放流先または放流先上流の環境水、試験生物の飼育に用いている水等) で希釈して WET 試験に供試し、排水放流先のミキシングゾーン (排水の受水域) 周縁部における排水の希釈率において毒性がみられないことを排水放流許可の条件としている¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。実施する WET 試験 (急性毒性試験、慢性毒性試験) の種類や数、実施の頻度、許容される限界値超過頻度等は、業種や排水量、排出先水域の水量に占める排水量の割合及び生産工程の変更等の情報から決定されている¹⁴⁾⁻¹⁸⁾。

さらに、排水の生物応答試験において基準を超過する影響がある程度の頻度で検出された場合、排水全体の生物影響を削減することが義務づけられており、原因物質群の同定や適切な処理工程の選択を行う一連の手順が、米国 EPA により毒性削減評価 (TRE: Toxicity Reduction Evaluation) として標準化されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾ (参考資料 5 参照)。

具体的な導入・運用方法は州・Region ごとに異なっているが、例えば、メリーランド州では本手法の導入により、毒性を示す排水の発生率が 45% まで減少 (1994 年 (1988 年比)) した事例が報告されている²¹⁾。また、製造プロセスで 1 日 200 種以上の化学物質を使用している繊維製造業における排水処理の改善の事例や、大規模製油所における排水毒性を最小化する効率的で低コストの代替法の事例が報告されている¹¹⁾。

②カナダ

カナダでは、個別物質の規制に加え、魚類とその生息地の保護を目的に、排水認可制度の要件として、排水を用いた魚類への急性毒性試験が 1970 年代に順次導入された²²⁾。1971 年に紙パルプ排水、1973 年に流出油分散剤と石油精製排水、1977 年に金属採鉱業廃液と食肉・家禽生産廃液に関する規制が導入され、BOD や総懸濁固形物 (TSS) 等の汚濁物質とともにニジマスの 96 時間急性毒性試験が排水モニタリングとして規定された²³⁾。

その後、製紙業と金属鉱業についてはそれぞれ 1992 年、2002 年に排水規制が強化され、オオミジンコの急性毒性試験が排水の試験法に追加されるとともに、排水認可要件にこれらの排水試験の実施に加え、排水の放流先水域における影響を調査する環

境影響モニタリング (EEM: Environmental Effect Monitoring) の実施が規定された。

この環境影響モニタリングでは、排水及び放流先水域の化学分析と魚類・甲殻類・藻類（放流先が淡水の場合は大型植物種のウキクサも対象）の亜致死毒性試験 (Sublethal Toxicity Testing) 及び放流先の水域生態系の生物モニタリング調査が実施される²⁴⁾。試験頻度は、化学分析と亜致死毒性試験について、製紙業では年3回²⁵⁾、金属鉱業では当初3年間にわたり年2回で4年目から年1回実施する²⁶⁾。生物モニタリング調査については、いずれの業種も3年ごとの報告が義務づけられている²⁵⁾²⁶⁾。

2012年には下水処理システムの改善を図るため、下水処理施設の排水について、水量に応じてニジマス急性毒性試験の実施が義務づけられた²⁷⁾。100%排水（無希釈排水）で50%の生存基準を満たす必要があり²⁷⁾、カナダ国内の既存下水処理施設の約75%がすでに基準に適合しているが、残りの25%の施設については改善に向けて排水監視と報告書の提出が義務づけられている²⁸⁾。

このようにカナダでは対象業種を限定して制度運用がなされている。

排水による水生生物への影響を総体的に捉える手法として、米国、カナダ等では、生物応答試験（バイオアッセイ）が個別物質規制を補完する形で排水規制に導入されており、生物応答試験で示された排水毒性によって受水域の水生生物が影響を受けるかどうか予測するツールとして用いられている²⁹⁾。

米国やカナダにおける検証によると、毒性が示された排水の放流先において、魚類や底生生物の生物学的状態に影響が示されており³⁰⁾³¹⁾、排水処理の改善によって影響が改善されたケースが報告されている³²⁾。

③欧州

生物応答試験を環境モニタリング手法として発達させてきた欧州では、一部の国において排水規制の手法としても導入されている。ドイツでは1976年より排水の生物応答試験（急性毒性）が排水賦課金制度に用いられており、フランス、スウェーデン、ノルウェー、北アイルランドでも規制的な手法として導入されている³³⁾。

英国では、1990年代の初頭、米国とカナダで確立された全排水毒性（WET）試験の取組をモデルとした直接毒性評価（DTA: Direct Toxicity Assessment）手法が開発された³⁴⁾。水生生物が死なない水環境を目指し、試験法は現時点で急性毒性試験のみ規定されている³⁵⁾。イングランドとウェールズでは、1997年から4年間の実証プログラムを経て、2006年に統合的汚染防止管理指令（IPPC: Integrated Pollution Prevention and Control Directive）におけるDTA手法の利用法について定めたガイダンス文書が公表された³⁶⁾。この中で、DTAの実施に当たり最低限必要な手順が明示されている。

DTAが求められるのはIPPCの規制対象工業地域であり、対象事業者は、有機化学工業と無機化学工業の業種に属し、かつ、河川、湖沼、海域等の水域に直接100m³/日以上排水する工場等に限定されている³⁶⁾。また、排水中に1物質しか含まれていない場合や2物質以上でも追加の生態毒性試験をしなくても化学的及び毒性学的な相互作用

用が明確に実証されている場合は対象外となり、DTA を実施すべき工場等が約 100 箇所選出されている³⁷⁾。2012 年には、スコットランドでも同様のガイダンス文書が公開されている³⁸⁾。

また、ドイツやフランスなどでは、変異原性試験が排水管理の試験法として利用されており³³⁾、このような手法についても今後の検討課題とすることが考えられる。

④韓国

韓国では「生態学的に健全な河川」と「有害物質からの安全の確保」を目指し、排水中の化学物質を管理することを目的として、2011 年に排水の生物応答試験制度が導入された。一部の排水において、金属やフェノール等の化学物質が許容レベル未満であるにもかかわらずオオミジンコ急性毒性が検出されたことや、化学物質の相互作用から生じる未知のヒト健康リスクと生態毒性の懸念などから、水生生態環境とヒト健康の保護において、現行の個別化学物質管理では十分でないという認識が広がったため、制度が導入された³⁹⁾⁴⁰⁾。

具体的にはオオミジンコの 24 時間遊泳阻害試験による排水規制を実施しており、月 1 回の測定頻度による試験の実施が、下水処理場を含むすべての事業場に求められている³⁹⁾⁴⁰⁾。

なお、中国、シンガポール、マレーシア等他のアジア諸国でも生物応答を用いた排水監視手法の導入の検討が進められている。

(4) わが国における活用状況

我が国では生物応答を利用した排水管理の制度化はされていないが、バイオアッセイの手法自体は、化学物質審査規制法における生態毒性試験を活用する形で、様々な主体により自主的な利用が始められている。

製造事業者の自主的な取り組み例として、印刷インキメーカーの事例⁴¹⁾があげられる。当該事業者は、印刷インキ、容器包装用インキ、粘・接着剤等、様々な製品を合成、加工、販売しており、製造過程で使用する化学物質の種類は膨大で、個々の物質の環境影響評価を行うことは不可能に近い。このため、2007 から 2012 年にかけて国内主要 4 工場の排水を対象として生物応答試験を実施して排水の生物影響を定量的に把握し、工場によって影響を示した生物種が異なることやその年変動が異なることが明らかとなった。当該事業者では、排水放流後の希釈倍率を考慮すると、受水域における生態系へのリスクはほとんど無視できると判断しているが、相対的に毒性の高かった工場の排水について原因究明を実施し、排水の環境に対する生物影響負荷を低減させることに成功している。

また、住宅、管材、住宅建材、高機能プラスチック等の樹脂加工メーカーの事例⁴²⁾では、排水先の水生生物にとって安全な水環境を確保し、排水による悪影響を未然に防止することを目的として、2013 年度から本手法を活用して国内の生産事業所排水の評価を実施しており、2014 年度までに公共用水域に排出される全排水の 85%について確認を完了している。排水放流先の河川における水生生物の生息状況調査もあわせて実施するなど、生物多様性の保全を目的とした CSR の取組の一環として位置付けら

れている。

さらに、医薬品メーカー、住宅建材メーカー、半導体等電子部品メーカー等においても、国内生産事業所の排水の生物応答試験を実施する事例⁴³⁾⁻⁴⁶⁾が公表されており、工場排水が水環境に及ぼす影響を排水の総体的な毒性を把握する生物応答試験によって評価する手法が様々な業種に広がりつつある。この他、複写機・印刷複合機、光学デバイス等の機器メーカーの事例⁴⁷⁾では、国内製造拠点の排水だけではなく、海外の製造拠点の排水についても生物応答試験を実施して水生生物に及ぼす影響の有無を確認している。

このように様々な業種の製造事業者が自主的に排水の生物応答試験に取り組み、結果をCSR報告書などに積極的に公表して、生物多様性の保全や持続可能な社会構築への貢献を目指す姿勢をアピールしている。

大学等の研究機関においても、製造事業者の協力を得て排水の生物応答試験を実施し、生物影響が認められた工場排水試料に関する知見の蓄積が進められるなど、生物応答を利用した排水管理の実施例や、排水管理の試験方法としての有用性を実証するための研究事例が着実に蓄積されつつある⁹⁾。

また、本検討事業においても、公募で選出された39の事業場の59の排水サンプルについて生物応答試験を実施し、魚類（ゼブラフィッシュ）と藻類（ムレミカヅキモ）の試験では全サンプルの10%に当たる6サンプルで、甲殻類（ニセネコゼミジンコ）の試験では37%に当たる22サンプルで影響がみられ、魚類と藻類に比べて甲殻類への影響が大きい結果が得られている。（次章及び参考資料3参照）。

一方、（2）①で示したように、バイオアッセイ手法を公共用水域で使用した調査事例³⁾⁶⁾⁻⁹⁾もある。

出典

- 1)環境省水・大気環境局（2014）：平成25年度公共用水域水質測定結果
(<https://www.env.go.jp/water/suiiki/h25/01.pdf>)
- 2)国土交通省水管理・国土保全局河川環境課（2015）：平成26年全国一級河川の水質現況
(http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kankyo/kankyousuisitu/pdf/h26_suisitu/02_syousai.pdf)
- 3)森田隼平，安田侑右，駕田啓一郎，田村生弥，鑑迫典久，山本裕史（2012）：水生生物3種を用いた全国一級河川の短期慢性毒性試験，土木学会論文集G（環境），68(7):III217-III225.
- 4)環境省水・大気環境局（2012）：平成23年度公共用水域水質測定結果
(<http://www.env.go.jp/water/suiiki/h23/full.pdf>)
- 5)環境省水・大気環境局（2013）：平成24年度公共用水域水質測定結果
(<http://www.env.go.jp/water/suiiki/h24/full.pdf>)
- 6)三島聡子，大塚知泰，齋藤和久（2010）：バイオアッセイによる河川水の生態影響評価，第34回神奈川県市環境・公害研究合同発表会（平成22年6月4日開催）
(<http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/gakkai/kennishi22-4.pdf>)
- 7)三島聡子，大塚知泰，長谷川敦子，齋藤和久（2013）：河川水中化学物質による生態影響の評価，神奈川県環境科学センター研究報告，35，1-7.

- (<http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/bulletin/h24bull01.pdf>)
- 8)大塚知泰, 石割隼人, 三島聡子, 長谷川敦子 (2014): バイオアッセイによる目久尻川の水質評価, 第 38 回神奈川県環境研究合同発表会
(<http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/tyousa-kenkyu/kensi-happyou/26kensi/kensi2014-3.pdf>)
- 9)板津靖之, 高野智弘, 金俊, 福富真美子, 楠井隆史 (2015): 事業所排水の生態毒性学的評価: 毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響, 環境化学, 25(1), 19-26.
- 10)US EPA Office of Wastewater Management: Water Permitting 101
(<http://www.epa.gov/npdes/pubs/101pape.pdf>)
- 11)Diamond J. and S. Belanger (2012): 米国における全排水毒性 (WET) 試験状況および現在の課題. 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
- 12)US EPA (2002): Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Whole Effluent Toxicity Test Methods; Final Rule, 40 CFR Part 136.
- 13)US EPA (1991): Technical support document for water quality-based toxics control .EPA/505/2-90-001(<http://www3.epa.gov/npdes/pubs/owm0264.pdf>)
- 14)DeBiasi D.L. (2010): 米国における WET システムに関するセミナー (平成 21 年度) 講演資料
- 15)WDNR (2005): WET guidance document
(<http://dnr.wi.gov/topic/wastewater/WETguidance.html>)
- 16)Debra L. Denton (2010): 米国における WET システムに関するセミナー (平成 21 年度) 講演資料
- 17)Wisconsin Department of Natural Resources: Making WET limits and monitoring decisions. (<http://dnr.wi.gov/topic/wastewater/WETChecklist.html>)
- 18)US EPA (1989): Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070
- 19)US EPA (1999): Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002
- 20)US EPA (2001): Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program.
(<http://water.epa.gov/polwaste/npdes/basics/upload/owmfinaltreetie.pdf>)
- 21)Fisher, D.J., Knott, M.H., Turley, B.S., Yonkos, L.T. and Ziegler, G.P. (1998): Acute and chronic toxicity of industrial and municipal effluents in Maryland, US Water Environ. Res. 70, 101-107.
- 22)Environmental Canada (1999): Guidance Document on Application and Interpretation of Single-species Tests in Environmental Toxicology. EPS1/RM/34.
- 23)カナダ環境省 (2014): カナダにおける生物応答を用いた排水管理、鑑迫典久監修「生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向」、NTS、pp.35-71.
- 24)Scroggins R. (2012): カナダ排水規制における毒性試験の適用性. 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
- 25)Canada (2012): Pulp and Paper Effluent Regulations (2012 年 6 月 29 日修正)

- (<http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-92-269.pdf>)
- 26)Canada (2015) :Metal Mining Effluent Regulations (2015 年 1 月 1 日修正)
(<http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-2002-222.pdf>)
- 27)Canada (2015) :Wastewater Systems Effluent Regulations (2015 年 1 月 1 日修正)
(<http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-2012-139.pdf>)
- 28)Environmental Canada:
(<https://www.ec.gc.ca/eu-ww/default.asp?lang=En&n=0D689118-1>)
- 29)Grothe D. R., K.L. Dickson, D.K. Reed-Judkins (eds.)(1996) : Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts, SETAC Press, Pensacola, FL.
- 30)Diamond J., C. Daley (2000) : What is the relationship between whole effluent toxicity and instream biological condition? Environ. Toxicol. Chem, 19 (1) 158-168.
- 31)Diamond J. (2014) 米国における WET (全排水毒性) 試験、鑓迫典久 (監修)「生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内最新動向」、エヌティーエス、東京、pp.26.
- 32)McMaster M.E., L. M. Hewitt, J.L. Parrott (2006) : A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: Field studies and mechanistic research, J. Toxicol. Environ Health, Part B, 9, 319 339.
- 33)Power EA and Boumphrey RS.(2004): International trends in bioassay use for effluent management. Ecotoxicology. 13(5):377-98.
- 34)Wharfe J.(2004): Hazardous chemicals in complex mixtures--a role for direct toxicity assessment. Ecotoxicology. 13(5):413-21.(複合体中の有害な化学物質-直接毒性評価の役割、鑓迫典久監修「生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向」、NTS、pp.111-121.)
- 35)Tinsley D., J., D. Campbell, P. Chowm, D. Taylor J. Upton and C. Taylor(2004): The Use of Direct Toxicity Assessment in The Assessment and Control of Complex Effluents in The UK: A Demonstration Programme. Ecotoxicology. 13(5):423-436.
- 36)Environment Agency (2006) : Integrated Pollution Prevention & Control, Guidance on the Use of DTA in PPC Impact Assessments.
- 37)Leverett D.,P. Simpson and L. Surl (2011) : Direct toxicity assessment of mixtures in effluents: current UK experiences, SETAC Europe Annual Meeting, Poster, WE310 (http://www.wca-environment.com/wp-content/uploads/2011/05/wca_SETAC2011_DTA-effluents_WE310_May-2011_A0.pdf)
- 38)Scottish Environment Protection Agency(2012): Supporting Guidance (WAT-SG-57) Toxicity Screening for Discharges
(https://www.sepa.org.uk/media/152970/wat_sg_57.pdf)
- 39)Kim Sang-Hoon (2012) 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
- 40)新野 竜大(2015) :韓国における生物応答を用いた排水管理の現状、鑓迫監修「生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向」, p.87-93.
- 41)富川恵子, 入江俊行, 内田弘美, 渡部春奈, 鑓迫典久(2015) : WET 法を活用した工場排水

管理：化学工業における排水改善の取り組み，環境化学，25(1)，27-33.

42)https://www.sekisui.co.jp/csr/eco/env_return/biodiversity/index.html

43)<http://www.daiichisankyo.co.jp/corporate/csr/management/business/environment/risk/index.html>

44)http://www.takeda.co.jp/company/reports-publications/2013_ebook/2013cdb/index.html#page=37

45)https://www.ykk.co.jp/japanese/corporate/csr/eco/report/2014/pdf/2014_04-06.pdf

46)<http://www.sii.co.jp/eco/pickup/wet.html>

47)http://www.konicaminolta.jp/about/release/2012/0926_02_01.html

2. 生物応答を利用した排水試験・評価方法

本検討会では、生物応答を利用した排水管理に関して、既に導入されている米国やカナダ等の諸外国の動向について、導入に至る経緯、具体的な制度の内容、運用方法等の観点から整理するとともに（1（3）及び参考資料1参照）、我が国に本手法を導入する場合の課題、具体的な試験方法や試験結果の評価方法等について、我が国での排水規制や化学物質管理の現状等を踏まえて検討してきた。平成24年度には、米国EPAの試験法やOECDテストガイドライン等を参考にして、具体的な試験方法を「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（参考資料2参照）として取りまとめた。この試験法検討案は、平成23年度に実排水を用いた9機関によるリングテスト、平成25年度に10機関による感受性試験データの収集が行われ、十分な試験機関間再現性および試験精度が示された¹⁾。また、これらの試験結果については、現行の排水基準の考え方を踏まえて整理を試みた（参考資料3参照）。ここでは、具体的な試験方法の概要を示すとともに、試験の適用方法や結果の評価に当たっての検討課題を以下に示す。

（1）対象とする毒性

我が国の水生生物の保全に係る水質環境基準は、公共用水域において通常維持されるべき水質の水準を検討するものであることから、基本的に慢性影響の観点から目標値を導出することが妥当とされている。1980年代に排水管理に生物応答手法を導入した米国では、当初、急性毒性試験が使用されていたが、より感度が高くかつ生物の成長や繁殖等の個体群の維持の指標としての信頼度が高い慢性毒性試験に移行してきた。

実際、本検討会の実証事業として、我が国の事業場排水に対して実施した、藻類（ムレミカヅキモ）、甲殻類（ニセネコゼミジンコ）、魚類（ゼブラフィッシュ）の3生物種を用いた慢性毒性試験においても、約3割の排水において慢性的な影響が懸念される結果となっている（参考資料3参照）。また、慢性毒性試験は成長段階に応じて感受性が異なる生物に対する評価が可能なこと、慢性毒性試験は急性毒性試験に比べて、より低濃度の影響をみることができること、我が国の公共用水域の水質は比較的良好であること等からも、生物応答試験を排水管理手法として適用する際には、慢性影響を評価する試験法を基本とすることが望ましい。

一方、急性毒性試験は慢性毒性試験に比べて短期間で結果が得られるため、コストや手間の観点からも負担の少ない試験方法であることから、事業者にとって取り組みやすく、現実的な手法としてはあり得る。また、固相抽出法による試料濃縮を行うことによって試験法の感度を上げ、河川水の毒性を評価した事例も報告されている²⁾³⁾。このため、生物応答試験による排水管理手法への理解を促進するよう、当面は急性・慢性いずれか一方の選択が可能となるよう試験方法の検討を行うことも考えられる。

<検討課題>

- ・試験法は、慢性毒性試験を用いることを基本として検討してきたが、急性毒性試験も必要に応じて利用できるようにすべきか検討が必要。

（２）試験法の種類と使用する生物種

我が国では、化学物質審査規制法における動植物への影響評価として、新規化学物質の審査については、藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験の試験成績等に基づき判定を行っており、優先評価化学物質のリスク評価については、これらの試験に加えてミジンコ繁殖試験、魚類初期生活段階毒性試験の試験成績等に基づき第二種特定化学物質への該当性を判定している。

これらの試験法は、生物の栄養段階を考慮し、化学物質の水生生物への有害影響を予測する手法として世界的に広く利用されており、同様の手法で排水中の化学物質の影響を把握することが可能であることから、これらの試験法を参考にして、また（１）で示したように、慢性影響を評価する試験法を基本とすることが望ましいと考えられることから、日本の実情にあった効率的な試験法として、排水の生態毒性の有無を総合的に把握する試験法を、①藻類生長阻害試験、②ミジンコ繁殖試験、③魚類胚・仔魚期短期毒性試験の３種の方法として取りまとめた（別添「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（以下「試験法検討案」という。）参照）。

それぞれの試験法に用いる生物種については、以下の考え方から選定している。

①藻類生長阻害試験

藻類の試験では、単細胞緑藻類のムレミカツキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*）が、化学物質審査規制法による試験法の推奨種とされ、OECD テストガイドラインなどの既存試験法で最も広く用いられていることから、排水の試験生物種とすることが推奨される。

ムレミカツキモは昭和 59(1984)年 6 月に採択された OECD テストガイドライン 201 藻類生長阻害試験では、*Selenastrum capricornutum* とされていたが、形態的特徴から、*P. subcapitata* が正しい種名とされ、平成 18(2006)年に改訂された OECD テストガイドライン 201 では、*P. subcapitata* に変更され、現在に至っている。*P. subcapitata* は国内生息種ではないが、我が国には、当初推奨種とされていた *S. capricornutum* の同属種である *S. bibraianum*（*Synonyms: Ankistrodesmus bibraianus*）等が生息しており、水生生物の保全の観点からの環境基準の検討に際しても、ムレミカツキモの試験結果も参照されていることから、本手法の試験生物種とすることが推奨される。

②ミジンコ繁殖試験

甲殻類については、米国 EPA 試験法 1002.0 およびカナダ環境省の試験法に準じた試験法で、甲殻類の慢性影響試験として世界的に普及しているニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いた繁殖試験法が適当である。

甲殻類の試験では、化学物質審査規制法による試験法ではオオミジンコ（*Daphnia*

magna) が推奨されており、一般的にオオミジンコが使用されたデータの蓄積が多いが、ニセネコゼミジンコは感受性がオオミジンコと大きくかわらないことを示す試験結果が多数報告されており⁴⁾⁻⁶⁾、かつ、ライフサイクルが短いことが特徴であり、試験期間は7日間で、オオミジンコ(21日間)の1/3の短期間で実施可能である。

このように、感受性差が大きくないこと、試料とする排水の保存性や試験コストの観点から、ミジンコ繁殖試験においてはニセネコゼミジンコの使用が推奨される。

ニセネコゼミジンコは世界の至る所で見られる種類だが、我が国では一部の水域での採集例があるものの少なく、オオミジンコと同様に外来種とされている。我が国には同属種のネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia quadrangular*)等複数種が普通に生息しており、水生生物の保全の観点からの環境基準の検討に際しても、ニセネコゼミジンコの試験結果も参照されていることから、本手法においても試験生物種とすることが推奨される。

なお、ニセネコゼミジンコはオオミジンコに比べて幼体が小さいため、試験実施機関の技術者の技能向上を図ることにより、計数の困難さや飼育水等による再現性の低下を招かないように留意する必要がある。

③魚類胚・仔魚期短期毒性試験

魚類については、OECD テストガイドライン 212 胚・仔魚期短期毒性試験および米国 EPA 試験法 1001.0 を参考に、魚の胚期から仔魚前期までの2つのステージを対象に比較的短期間かつ小スケールで、慢性影響評価に利用可能な情報を得ることが可能であり、試験に用いる生物体の用意が比較的容易な、胚・仔魚期短期毒性試験法が適当である。

化学物質審査規制法による試験法ではメダカ(*Oryzias latipes*)が推奨されているが、メダカは受精卵(胚)から仔魚への孵化に8~10日を要する。メダカと感受性が大きくかわらないゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は3~4日前後で孵化するため試験期間が8~9日と短期間で実施可能であり、また、多量の卵を得やすいという点で優れている。このため、魚類の試験では、国内生息種のメダカと、国内生息種ではないが諸外国で適用事例が多いゼブラフィッシュを本手法の試験生物種とし、任意に選択可能とすることが推奨される。

なお、外来種であるニセネコゼミジンコとゼブラフィッシュを用いた試験では、試験終了後に生態系への影響が生じないよう適切な配慮が必要である。

<検討課題>

- ・OECD テストガイドラインや化学物質審査規制法テストガイドラインにおいて推奨種とされているオオミジンコやメダカにかわり、外来種のニセネコゼミジンコやゼブラフィッシュの使用を推奨することについて、合理的な理由を示しつつ理解を求めることが必要。なお、オオミジンコを用いた試験も排除しないこととする場合は、結果の評価に当たっての留意点を示すことが必要。
- ・ニセネコゼミジンコはオオミジンコに比べて幼体が小さいため、計数が困難なこと

や飼育水等による再現性の低下を招かないように技術者の技能向上方策について検討が必要。

（３）試料

本試験は、事業者が排水管理に取り組むための手法として位置付けられたものであることから、試験の実施対象となる試料は、事業場から公共用水域に排出される排水とすることが適当である。

排水の採取は、水質や水量の変動性や有害性、連続放流か間欠放流か、排水口の構造などを考慮して採水計画を策定し、原則として最終放流口である排水口で採取することが適当である。採取後は冷蔵保存して 36 時間以内に試験を実施することとし、pH 調整によって懸濁物が生成して試験結果に影響を及ぼす可能性があるため、pH は 6.5～8.5 の範囲内であれば調整は行わないことが適当である。

（４）試験の実施頻度

現行の排水規制においては、事業者による排水の測定は、通常の操業状態において、排水の汚染状態が最も悪いと推定される時期及び時刻に排水を採取し、排出される物質について最低限年 1 回の測定を実施することとされている。

生物応答試験による排水管理手法についても、こうした現行の排水規制の考え方を踏まえると、最低限年 1 回の試験を実施することが必要と考えられる。

他方、少量多品種の製品製造工場等、使用される原材料の種類や量、施設の運転条件等が頻繁に変動すること等に伴い、排出水の汚染状態の変動が想定される場合には、実際の運転状況や試験に要するコスト等を勘案しつつ、必要に応じて試験実施頻度を上げることも考えられる。

<検討課題>

- ・ 試験の実施頻度はどの位が適当か。使用原材料の変更等により排出水の汚染状態が頻繁に変動することから回数を増やす場合や、継続的に「影響なし」の試験結果が得られることから回数を減らす場合は、どの程度を目安とすべきか。

（５）試験結果の評価

現行の排水規制では、排出水の水質は、公共用水域に排出されると、そこを流れる河川水等により、排水口から合理的な距離を経た公共用水域において、通常少なくとも 10 倍程度に希釈されると想定されることに基づき、排水基準は原則として、環境基準の 10 倍値に設定されている。

この排水基準の設定の考え方を踏まえ、排水に対する 3 種類の生物応答試験結果のいずれかにおいて、排水の毒性を無影響にするために必要な希釈倍率が 10 倍を超過する場合（排水を 10 倍以上に希釈しないと排水の毒性が無影響にならない場合）、す

なわち、最大無影響濃度 NOEC (%) の逆数 TU(Toxic Unit=100/NOEC) が 10 を超過する場合、その排水について、改善の必要があると評価することが想定される。

(参考) 米国 EPA 指針では、排出先の公共用水域における排水の希釈倍率 (IWC) が、最大無影響濃度の希釈倍率 (NOEC) より小さい場合*に慢性影響ありと判断される。

※ $TUc(=IWC/NOEC)<1$ の場合。ここで IWC(Instream Waste Concentration)は、排出先のミキシングゾーンの周縁における排水の希釈倍率を表す。

一方、水生生物の保全に係る水質環境基準の設定の際の、生物種による感受性の相違の考え方を踏まえれば、生物応答試験で使用を推奨している生物種が(2)に記載のとおり、藻類のムレミカツキモ、甲殻類のニセネコゼミジンコ、魚類のゼブラフィッシュもしくはメダカの4種の生物に限定されていることから、他の生物との感受性の差を考慮した係数として「10」を適用し、より厳しい値とすることも想定される。

このように、公共用水域における排水の希釈、生物間の感受性の相違等をいかに考慮すべきかについて、諸外国の適用例等を参照しつつ今後検討が必要である。

<検討課題>

- ・排水の毒性を無影響にするために必要な希釈倍率の評価基準の考え方について検討が必要。
- ・排水の生物応答試験結果に対する評価にあたり、生物応答試験に用いる生物とそれ以外の生物との感受性差の考え方について検討が必要。

(6) 試験の簡略化

水生生物の保全の観点からの環境基準等の水質目標は、生活環境という概念の中心にある有用な水生生物及びその餌生物並びにそれらの生育環境の保護を対象として設定されていることから、排水の生態毒性の有無の総体的な把握に関しても、藻類、甲殻類、魚類への影響を個別にすべて把握することが適当である。

また、用量反応関係を確認するための試験濃度は、無希釈の排水を 100%とした際、公比 2 で最高濃度の 80%から、40、20、10、5%の 5 濃度区と対照区が基本となる。

米国 EPA 技術指針では、2 年目以降のモニタリングは最も感受性の高い生物 1 種類のみに軽減する規定もある。このように、最初にいずれか 1 種類の試験を実施して影響があった場合に他の種類の試験を実施する逐次的な実施方法や、濃度区を少なくした試験など、試験実施の負担軽減の観点からの試験の簡略化の可能性についての指摘がある。

現時点では生物応答試験による排水管理の実績が不足していることから、当面は標準的な試験方法による排水管理を行い、試験結果や関連する知見の蓄積を図ることが適当と考えられるが、結果の蓄積が進んだ段階で、試験の精度を確保しつつよりコストのかからない方法として、簡略化した手法を用いることが可能か検討を進めることが適当と考えられる。

<検討課題>

- ・試験実施の負担軽減の観点からの効率的な試験方法について、逐次的な試験の実施や濃度区を少なくした試験の検討が必要。

（７）試験実施にあたっての留意事項

①排水の海域放流事業所・海水の工程内使用事業所への適用

海に囲まれたわが国では、海域や汽水域に排水を放流する工場等が多く存在し、また、冷却水として海水を工程内で使用する場合もある。

一方、国内生息種の海産生物を用いた慢性毒性試験はまだ十分に確立されておらず、現時点における生物応答試験は、淡水生物を用いたものとなっている。このため、前述したような海域や汽水域に排水を放流する工場等における現在の生物応答試験の有効性についての疑問が指摘されている。

本手法の主眼は、排水の水生生物に対する生態毒性の有無を総体的に把握して、水生生物に影響を及ぼすおそれがある化学物質による環境汚染を効率的に防止することであり、海産生物と淡水生物の毒性値の換算も現時点では困難であることから、当面は排水の排出先等にかかわらず、指定された淡水生物に関する生物応答試験を統一的に実施して知見の集積を図ることが適当と考えられるが、海産生物と淡水生物との感受性の違い等に関する知見を集積し、試験方法や評価方法に反映させるべく検討していく必要がある。

②排水の中和処理による塩の影響

水質汚濁防止法により水素イオン濃度指数が排水基準として定められていることから、工場等からの排出される酸性やアルカリ性の排水は、排水基準に適合するように水素イオン濃度指数の調整が行われる。

生物応答試験は基本的に環境中に排出される排水の安全性を確認する試験であることから、供試水は中和後の排水とすることが適当と考えられるが、化学物質の水生生物に対する毒性は、水中の塩分濃度やその変化の影響を受けることから、試験結果の評価に当たっては、排水の中和処理で生じた塩が水生生物に及ぼす影響について、塩により毒性が増大するか減少するかの確認の必要性を含め、評価の考え方について整理しておく必要がある。

③塩素消毒した排水への適用

排出前の排水に塩素が添加される場合には、製造工程で製造・使用等される様々な化学物質との相互作用等により、生態に影響を及ぼすおそれのある消毒副生成物が生成するおそれがある。消毒のための塩素の安易な過剰使用による水質事故事例もあることから、塩素添加が行われる場合には、②の考え方と同様、原則として塩素添加後の公共用水域に排出される排水口を試料採取地点とし、塩素が添加された排水を用いて試験を行う方が望ましいと考えられる。

他方、塩素添加後の排水を用いた試験で「影響あり」との結果がでた場合には、プロセス改善のための原因究明を目的として、塩素添加前の排水についても試験を行い

適切に評価することが有効と考えられ、②と同様に評価の考え方を整理しておく必要がある。

＜検討課題＞

- ・ 試験に用いる生物種は淡水生物に限定されているため、海域への排水に対応するための海産生物を用いた試験法の開発や、淡水生物を用いた試験結果の活用方法（感受性の違いの評価方法等）について検討が必要。
- ・ 酸やアルカリの中和による污水处理や塩素消毒を実施している事業場からの排水について、排水の中和や塩素消毒が生態毒性に影響を及ぼす場合の評価の考え方について整理が必要。

（８）試験の実施体制と精度管理

生物応答試験の排水への適用による試験方法については、現時点では、信頼性のある試験を実施できる試験機関が十分確保されておらず、実績が少ないことを考慮し、当面は、信頼性のある結果を得るために例えば OECD の優良試験所基準（GLP）に適合した機関や、自治体（地方環境研究所等）・事業者等で GLP と同等の設備や技術を有する機関で実施することが適当である。

適切な技術を有する試験機関の拡大を図るため、試験結果の蓄積を図りつつ、以下のような検討を進めていくことが望ましい。

- ①環境省における試験方法のマニュアルや評価方法のガイドラインを整備する。
- ②試験の実施に知見やノウハウを有する機関が中心となってセミナー等を開催し、事業者や分析機関による知見やノウハウの蓄積を促し、試験実施能力の向上や試験そのものの精度向上を図っていく。
- ③事業者が自ら生物応答試験を実施することを推奨するため、自ら行った試験結果について信頼性を高める方法についてマニュアルに盛り込む。
- ④環境省の優良試験所基準（GLP）に準ずる新たな認証制度の創設を検討する。

現在、国立研究開発法人国立環境研究所の環境リスク研究センター内に生態影響試験の標準機関としてレファレンスラボラトリーが設立され、生態影響試験（本検討の生物応答試験も含む）の基礎的な知識・技術等の普及を目的とした実習セミナーの開催のほか、試験用水生生物の維持及び提供が行われている。生物応答試験についても、試験結果の正確性と再現性を確保するためには、同様に試験に用いられる生物を安定的に供給できる体制の整備が必要である。

＜検討課題＞

- ・ 精度の高い試験を実施するための方策について検討が必要。
- ・ 試験に用いられる生物を安定的に供給できる体制の整備が必要。

（９）試験実施コスト

我が国では、国内の分析可能な機関が限られていることもあり、3種類の生物種の試験をすべて実施した場合の試験費用は、現時点では1検体あたり100万円程度かかると見込まれる例もある。今後、試験実績の拡大を図り、同時に試験方法に関する知見やノウハウを蓄積することにより、コストの削減が図られていくことが期待される。

他方、制度が普及するまでの間は、国による技術的・財政的支援が可能か検討していく必要がある。

(参考) 生物応答試験を排水規制に導入済みの米国の民間分析機関では、一例として3種類すべての試験を実施した場合で4,000ドル(50万円)程度となっている。

<検討課題>

- ・試験実施のコスト削減方策や本手法実施のための技術的・財政的支援の検討が必要。

出典

- 1) 渡部春奈, 林岳彦, 田村生弥, 中村中, 阿部良子, 高信ひとみ, 荻野仁子, 小塩正朗, 鑓迫典久 (2015) : 生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査, 環境化学, 25(1), 43-54.
- 2) 鈴木穰, 北村清明, 岡安祐司, 北村友一 (2009) : 都市水環境における水質評価手法に関する調査, 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, 152-158.
- 3) 高木茜, 亀屋隆志, 浦野紘平 (2004) : ヒメダカ仔魚毒性試験を用いた多摩川水系の水質健全性評価, 第38回日本水環境学会年会講演集, 563.
- 4) Versteeg, D.J., Stalmans, M., Dyer, S.D. and Janssen, C. (1997) : *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere, 34, 869-892.
- 5) Constantine, L.A. and Huggett, D.B. (2010) : A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. Chemosphere, 80, 1069-1074.
- 6) 新野竜大, 阿部良子, 山口直子, 新倉良之, 吉村奈緒子, 押岡香, 中山光二, 鑓迫典久, 新野竜大, 北村清明, 岡安祐司, 北村友一 (2015) : 数種類の有機化学物質に対する淡水性甲殻類 *Daphnia magna* および *Ceriodaphnia dubia* の慢性毒性による感受性比較, 環境化学, 25(1), 55-60.

3. 生物応答を利用した排水管理の在り方

これまでの検討を踏まえ、生物応答試験の結果を活用して行う排水管理の方向性と検討課題を以下に示す。

(1) 排水管理における位置付け

生物応答を用いた排水管理手法は、化学物質の水環境への影響や毒性の有無を総体的に把握・評価することが可能であり、また、毒性自体や毒性のメカニズムが不明な化学物質についても対応が可能であるため、工場等から排出される多様な化学物質が水環境に及ぼす影響を予防する観点から、事業者が生物応答試験を排水管理に適用する意義は大きい。

一方、生物応答試験は、現行の有害性が確認された個別物質による排水規制とは異なる考え方で実施される試験であり、生物応答試験そのものの制約や結果の不確実性に対応する知見の蓄積が必要である。また、試験に要する費用は現時点では高額であり、事業者にかかる負担にも十分配慮する必要がある。

このように、生物応答を用いた排水管理手法の導入については、多くの課題が存在する。また、水質汚濁防止法等の既存の規制体系との整合性も十分考慮する必要がある。

このため、現時点では、本手法を排水管理に適用するか否かは、個々の事業者の自主的な判断に委ねることとし、生物応答を用いた排水管理手法の制度的枠組みとしては、当面、排水中の化学物質による水環境への影響の低減につながる工場内の工程改善を目的とした自主的取組の一環として位置付けることが適当と考えられる。

水質汚濁防止法第 14 条の 4 においては、事業活動に伴う汚水等の公共用水域への排出等を把握し、水質汚濁防止のために必要な措置を講ずることが、事業者の責務として規定されている。このことも踏まえ、生物応答を利用した排水管理手法の活用について、事業者による取組みを促し、事例の蓄積を図ることも考えられる。

今後、知見が蓄積された段階で、排水改善に伴う生態影響の軽減効果やコスト等についての調査・検討を踏まえ、水質汚濁防止法等の規制体系への取り入れについて改めて検討することが適当である。

<検討課題>

- ・ 当面は自主的な取組の一環として位置付けることが適当と考えられるが、将来的に事業者に義務づけるかどうかについて検討が必要。

(2) 現行の排水管理手法との関係

化学物質のうち、生態毒性等の知見が蓄積された物質で、その物質の物理化学的特性や生産・使用状況等からみて水環境中で広範にあるいは継続して存在し、水生生物が継続して暴露しやすい物質については、個別に規制が行われている。

具体的には、水生生物の保全に係る環境基準項目として、全亜鉛、ノニルフェノール、LAS の 3 物質が定められている。また、亜鉛については排水基準値が設定され、他の 2 物質についても排水基準の設定について検討が進められている。

このような現行の個別物質による排水規制との重複を指摘する意見もあるが、基本的には、生物応答による排水管理手法は、個別物質の規制を補完するものとしてとらえ、規制対象となっている個々の物質や現時点では規制対象外の物質を含め様々な化学物質の影響の総和を評価できる手法であると位置付けることが適当と考えられる。

<検討課題>

- ・ 現行の個別物質規制との関係について整理が必要。

(3) 試験実施事業場

生物応答試験による排水管理は、様々な化学物質による水生生物への影響を総体的に把握し、水生生物に影響を及ぼすおそれがある化学物質による環境汚染を効率的に防止することが目的である。

生態毒性を有する化学物質を複数製造・使用している工場・事業場や、生態毒性を有する化学物質を含む排水を大量に排出している工場等については、排水中の多様な化学物質又はそれらの総和により、生態毒性を有する排水を排出して公共用水域の水環境を損なうおそれがあることから、生物応答試験による排水管理を実施することが望ましい。

(参考) 前述したとおり、化学物質排出把握管理促進法に基づく PRTR 制度では、生態毒性を考慮して対象物質の選定が行われており、今後、PRTR の届出状況を解析し、生物応答試験による排水管理を実施することが望ましい事業場として、生態毒性を有する化学物質の排出量の多い業種等を特定することが考えられる。

<検討課題>

- ・ 化学物質による環境汚染を効率的に防止するため、生物応答試験による排水管理を実施することが望ましい事業場等について検討が必要。

(4) 試験結果の活用方策

(事業者)

工場等からの排水に生物応答試験を適用することにより、工場排水が水生生物の生息・生育に影響を及ぼす可能性があるかどうかの判断材料が得られることから、データのフィードバックにより得られた結果に基づいて排水管理の改善に活用することが期待される。

環境省としても、試験結果を踏まえて事業者が排水管理を改善するためのガイドラインを作成し、事業者による取り組みを支援していくことが必要である。

（行政）

地方自治体においては、事業者の本試験の実施を促すとともに、これらの結果を踏まえて、水域ごとの水生生態系の保全のための効果的な対策を検討していくことが期待される。

＜検討課題＞

- ・ 生物応答試験を適用して生態毒性が検出された場合に、原因物質やその発生源の特定を事業者に促すためのガイドライン作りが必要。

（５）本手法の普及促進

国内の一部の製造事業者では、自社工場の排水を対象とした生物応答試験を自主的に実施し、結果を CSR 報告書などに積極的に公表している事例もみられるが、現時点では限定的である。

今後、事業者に対して生物応答による排水管理手法のメリットや適用範囲・限界について正しい知識を持ってもらうよう、普及促進を図るとともに、自主的に行う事業者には何らかのインセンティブを与えるような取り組みについての検討が必要である。例えば、本手法を実施して実際に水質改善が図られた事業者の表彰や、本手法実施のための技術的・財政的支援などが考えられる。

他方、処理プロセスの見直しによる排水改善が実施された場合等の試験結果の公表も含めた取扱いについて、事業者と行政との間で十分検討しておく必要がある。本試験を自主的に実施したことにより、事業者が不利益を被るのではこの試験法の普及は進まない。自主的な取組を促すためにも、試験結果の取扱いに関するガイドラインを定めておく必要がある。

＜検討課題＞

- ・ 当面は事業者による自主的な取組として実施することが適当と考えられることから、生物応答試験による排水管理手法の意義についての理解を増進し、現時点で限定的な事業者の取組事例を増やしていくための方策の検討が必要。
- ・ 排水改善が実施された場合等の試験結果の公表も含めた取扱いについて、事業者と行政との間で十分検討し、試験結果の取扱いに関するガイドラインを定めておくことが必要。

（６）公共用水域を対象とした生物応答試験

米国の WET 試験では、排水が放流先の河川である程度希釈された状態において、慢性影響が検出されないことを排水放流許可の条件としているケースが多いが、事業者が比較的密集して立地し、様々な排水が河川や海域で混じり合っている我が国の実態を踏まえれば、影響が検出された場合の原因究明の実施可能性の観点から、生物応答試験は、2（３）で示したように、排水口において採取した排水を用いて試験を実施

することが適当である。

他方、国や先進的な自治体等の研究機関が公共用水域において生物応答試験を実施することは、周辺住民への水環境への理解を促す材料として有効であり、知見の蓄積が図られることから期待される。ただし、この場合は、多くの排水が混じり合った後の状況を見ることになることから、影響が判明した場合の原因究明は一般的に困難であるため、さらに多くの知見を集積した上で結果の評価や取扱いについて検討すべきである。

<検討課題>

- ・ 生物応答試験の適用対象として工場排水だけでなく、公共用水域についても対象とすべきか、適用する際の留意点も含め検討が必要。

(7) 水質事故時への活用

水質汚濁防止法では、事業場から事業活動に伴って公共用水域に排出される排水に対し、排水基準の遵守を求める規制を行っているほか、事故時については、応急の措置と知事への報告に関する規定が定められている。このような事故時への対応のために生物応答試験が活用できないかとの指摘がなされることがある。

事故時の対応では、速やかに排水や環境水の分析を実施して、排水の改善状況や環境の回復状況を確認する必要があるが、ニセネコゼミジンコによる繁殖試験や魚類による短期毒性試験は、24 時間齢未満の仔虫や受精後 4 時間未満の受精卵を試験に供する必要がある、任意のタイミングで速やかに試験を開始できる体制を整えておくことは、供試生物の日常管理にかかる負担が非常に大きい。このため、生物応答試験は、通常の操業時における排水を日常的に管理することを目的として使用することが適当である。

他方、水質事故による環境汚染からの回復措置が適切に実施されているかを確認する作業として生物応答試験を活用し、地域住民に分かりやすい形で情報提供する活用方策等も想定されるため、事故時における生物応答試験の活用方法についても検討することが望ましい。

<検討課題>

- ・ 水質事故発生時における汚染回復状況を確認するための手法等として、生物応答試験の適用可能性について検討してはどうか。

おわりに

水生生物が多くの化学物質に長期間暴露される状況が生じている一方、化学物質による水生生態系への影響については多くのものがいまだ明らかではない。

本検討会では、排水中の多様な化学物質による生態影響が懸念されることから、化学物質の水環境への影響を総体的に把握・評価する生物応答を利用した排水管理手法について、その必要性、技術的な課題を踏まえた適用可能性、さらにはわが国への本手法の導入のあり方について検討を重ねてきた。

その結果、現行の個別物質による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が有効であることが示されたが、一方で導入する際の様々な具体的課題も指摘された。

今後、環境省においては、本報告、特に運用に当たって検討すべきとして指摘された課題を踏まえ、生物応答を利用した排水管理手法の実効性等について検討するため、幅広く意見を求めるとともに、産業界や地方自治体等の意見も聴きつつ、さらに検討を深めることが期待される。

生物応答を利用した排水管理手法については、その実効性も含めてようやく広く関係者が参加できる検討が可能となったところであり、上記検討の結果を踏まえて、より良い水環境の実現に向けた新たな取り組みとして、その活用が図られるよう求めるとともに、今後の生態系・生物多様性保全施策の一助となることを期待する。

参 考 資 料

- 1 諸外国における生物応答を用いた排水試験の導入状況
- 2 生物応答を用いた排水試験法（検討案）
- 3 事業場排水実態調査結果
- 4 化学物質排出把握管理促進法による第1種指定化学物質の公共用水域への排出状況
- 5 米国 WET 試験における排水改善手法
- 6 「生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会」委員名簿

(参考 1) 諸外国における生物応答を用いた排水試験の導入状況

	米国	カナダ	韓国	イギリス	ドイツ
法制度における位置付け	規制上の要件（排出許可制度）	規制上の要件（排出許可制度）	規制上の要件	規制なし	規制上の要件
導入の目的	発生源抑制、水環境保全	発生源抑制、水環境保全	発生源抑制	水環境保全（＋発生源対策）	発生源抑制 業種によって技術（BAT）ベースの排水基準を設定
試験生物	藻類、無脊椎動物、魚類	藻類、大型植物、無脊椎動物、魚類	無脊椎動物	藻類、無脊椎動物、魚類	藻類、無脊椎動物、魚類
試験手法	【淡水生物】*1 ・[急]24,48,96h ミジンコ急性毒性試験 ニセネコゼミジンコ,ミジンコ,オオミジンコ ・[急]24,48,96h 魚類急性毒性試験 ファットヘッドミノー,ニジマス,カワマス ・[慢]96h 藻類生長阻害試験 ムレミカツキモ ・[慢]6-8d ミジンコ毒性試験（生残・繁殖） ニセネコゼミジンコ ・[慢]7d 魚類仔魚毒性試験（生残・成長） ファットヘッドミノー ・[慢]7d 魚類胚・仔魚期毒性試験（生残・催奇形性） ファットヘッドミノー 【海洋生物】*1 ・[急]24,48,96h アミ科急性毒性試験 ・[急]24,48,96h 魚類急性毒性試験 シーブスヘッドミノー,トウゴロウイワシの仲間 ・[慢]5-7d ワツナギソウ生長阻害試験 ・[慢]7d アミ科毒性試験（生残・成長・繁殖） ・[慢]7d 魚類仔魚毒性試験（生残・成長） シーブスヘッドミノー,トウゴロウイワシの仲間 ・[慢]9d 魚類胚・仔魚期毒性試験（生残・催奇形性） シーブスヘッドミノー ・[慢]1h20min ウニ受精試験（精子1時間暴露後、卵子を追加し20分暴露）	【淡水生物】*3 ・[急]オオミジンコ急性毒性試験 ・[急]ニジマス急性毒性試験 ・[慢]96h 藻類生長阻害試験 ムレミカツキモ ・[慢]7d ウキササ増殖試験 ・[慢]6-8d ニセネコゼミジンコ繁殖試験（3 腹慢性毒性試験） ・[慢]7d 魚類胚・仔魚期毒性試験(死亡・成長) ファットヘッドミノー ・[慢]魚類初期生活段階試験 ニジマス ①胚試験（7d）：発育 ②胚・仔魚試験（対照区で胚が半数以上ふ化してから7d）：ふ化異常、仔魚の発育、変形 ③胚～稚魚試験（対照区生残魚が遊泳し始めてから30d）：死亡、成長、遊泳遅延、異常行動 【海洋生物】*3 ・[慢]5-7d ワツナギソウ生長阻害試験（米国と同様） ・[慢]10min ウニ綱受精試験 ・[慢]7d 魚類仔魚試験（米国と同様） トウゴロウイワシの仲間	【淡水生物】 ・[急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験	【淡水生物】 ・[急]72h 藻類生長阻害試験 ムレミカツキモ ・[急]48h オオミジンコ遊泳阻害試験 ・[急]96h 魚類急性毒性試験 ニジマス 【海洋生物】 ・[急]72h 藻類生長阻害試験 スケルトネマ ・[急]24h オイスター胚発達試験 マガキ ・[急]96h 魚類急性毒性試験 イシビラメと同属種	【淡水生物】（急性（一部慢性）） ・[慢]72h 藻類生長阻害試験 ・[急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験 ・[急]48h 魚類胚試験 ゼブラフィッシュ ・30min 発光バクテリア試験 ・変異原性試験
試験対象水	事業場排水、放流先の公共用水	事業場排水、放流先の公共用水（製紙業、金属鋳業）	事業場排水	事業場排水、放流先の公共用水（影響が出てきた場合のみ）	主に事業場排水、公共用水（河川）
対象とする事業場	汚染物質（有害物質、アンモニア、塩素等）を排出している事業場 詳細な規定は州・Regionによって異なる*2	・製紙業（PPER、1992年改正） ・金属鋳業（MMER） ・平均2,500m ³ /日以上排出している事業場 （Wastewater Systems Effluent Regulations、2013年改訂、2015年から法的義務へ）	下水処理場を含む全ての事業場（業種・排水量別に段階的に導入）	下水処理場、一部の業種の工場	

【急】：急性毒性試験、【慢】：慢性毒性試験

*1：事業場排水を試験対象とする場合、排水の塩分濃度にかかわらず、放流先の公共用水の塩分濃度が1,000mg/L未満の場合は淡水生物を用いて試験を実施する。

放流先の公共用水の塩分濃度が1,000mg/L以上の場合、排水が塩分を含有するときは海洋生物を用いて試験を実施し、排水が塩分を含有しないときは、排水の塩分濃度を放流先の塩分濃度に調整して海洋生物で試験を実施若しくは州の水質基準で海洋生物の利用が規定されていないときは淡水生物で試験を実施する。

州ごとにどの試験を何種類用いるか規定されている。例：バージニア州では無脊椎動物と魚類の2種、ウィスコンシン州では淡水生物について急性試験を2種、慢性試験を3種

*2：例：バージニア州 下水処理場110箇所（排水量100万ガロン/日以上）、一般事業場233箇所

*3：放流先の公共用水が淡水の場合は淡水生物、海水の場合は海洋生物を用いて試験を実施する。

(参考 2) 生物応答を用いた排水試験法 (検討案)

生物応答を用いた排水試験法 (検討案)

平成 25 年 3 月

排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会

目次

1		
2	第1部 はじめに.....	1
3		
4	第2部 排水の採取.....	1
5	1. 採取計画.....	1
6	1.1 対象とする排水.....	1
7	1.2 採取計画の立案において参考となる事項.....	1
8	1.3 その他の参考情報.....	2
9	2. 排水の採取と取り扱い.....	3
10	2.1 適用範囲.....	3
11	2.2 排水の採取.....	3
12	2.3 試料の輸送方法.....	5
13	2.4 試験機関における試料の取り扱い.....	5
14		
15	第3部 試験の実施.....	7
16	1. 試験計画の立案.....	7
17	1.1 試験計画立案の流れ.....	7
18	1.2 実施する試験（試験生物）の選定.....	7
19	1.3 試験濃度の設定.....	7
20	1.4 スケジュールの策定.....	7
21	1.5 留意事項.....	8
22	2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法.....	9
23	2.1 試験の概要.....	9
24	2.2 試験生物.....	9
25	2.3 試験用水.....	10
26	2.4 試験容器、装置および器具.....	10
27	2.5 試験方法および条件.....	11
28	2.6 結果の算出方法.....	13
29	2.7 参考文献.....	14
30	3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法.....	20
31	3.1 試験の概要.....	20
32	3.2 試験生物.....	20
33	3.3 試験用水.....	21
34	3.4 試験容器、装置および器具.....	21
35	3.5 試験方法および条件.....	22
36	3.6 結果の算出方法.....	23
37	3.7 参考文献.....	24
38	4. 淡水藻類を用いる生長阻害試験法.....	25
39	4.1 試験の概要.....	25
40	4.2 試験生物.....	25

1	4.3 培養方法.....	25
2	4.4 試験容器、装置および器具.....	26
3	4.5 試験方法および条件.....	26
4	4.6 結果の算出方法.....	28
5	4.7 参考文献.....	29
6		
7	第4部 試験結果のとりまとめ.....	30
8	1. 統計解析—無影響濃度（NOEC）の算出.....	30
9	1.1 定義.....	30
10	1.2 解析手順の概要.....	30
11	1.3 各試験法における解析手順.....	30
12	1.4 ECx/ICx の算出.....	33
13	1.5 参考文献.....	33
14	2. 試験結果のとりまとめ.....	35
15	2.1 基本的な事項.....	35
16	2.2 補足的な事項.....	36
17		
18	第5部 試験結果の信頼性評価.....	38
19	1. 基本的な事項.....	38
20	2. 試験結果の信頼性にかかわる事項.....	38
21	3. 試験成立要件.....	38
22	4. 標準物質を用いた感受性試験.....	38

初 版：2013 年 3 月 1 日^{注1}

第二版：2014 年 3 月 12 日^{注2}

第三版：2015 年 3 月 20 日^{注3}

注1：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナー（2013 年 3 月 1 日開催）にて配付（セミナー後、再推敲し、誤字脱字等を修正）

注2：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナー（平成 25 年度）（2014 年 3 月 12 日開催）にて配付

注3：排水管理等に用いる生物応答手法に関する技術セミナー（平成 26 年度）（2015 年 3 月 20 日開催）にて配付

第1部 はじめに

本試験法（検討案）は、事業場排水の水生生物への総合的な影響の程度を魚類、甲殻類、藻類の3種の生物を用いて把握することを目的とするものである。本書では、排水の採取から試験の実施まで、利用者が使いやすいよう、できるだけ具体的に記載し、各項目で独立して利用できる構成としている。なお、本検討案の内容は、試行試験を実施する中で明らかとなった課題や科学技術の進歩などを踏まえて、適宜改訂する。

第2部 排水の採取

1. 採取計画

1.1 対象とする排水

事業場から排出される代表的な排水を採取することを基本とする。しかし、化学物質の使用工程を考慮して、工程内の排水などを採取することも有効である。

1.2 採取計画の立案において参考となる事項

採取計画の立案にあたっては、以下の点を参考に、効率的かつ有効的に行うことが望ましい。なお、以下の事項は参考情報であり、強要するものではない。

① 排水の質（有害性、変動性など）

（具体的な考慮事項）

- ・水生生物への影響が懸念される化学物質が排水中に含まれる可能性がある場合、当該化学物質についての情報（SDSシート、使用実績、物理化学性状など）を収集する。
- ・排水の質についてその変動や傾向を示す情報がない場合は、排水の質の変動要因を考慮の上、経時的な採取の可否を検討する。
- ・排水の質の変動に応じて、採取方法（グラブ（スポット）採水あるいはコンポジット採水、2.2項参照）を選択する。特にグラブ採水の場合はそのタイミング、コンポジット採水の場合は時間と回数を考慮する。
- ・採取方法、採取地点の状況に適切な採水器具、装置を用いる。

② 排出の特徴（連続放流、間欠放流など）

（具体的な考慮事項）

- ・事業場の操業計画、操業日誌などを参考にして、平常操業時でありかつ排水量が大きく変動していない時に採取を行う。
- ・バッチ式処理や間欠放流を行っている事業場排水については、排水中の有害な物質の挙動に配慮した採取方法を検討する。
- ・連続放流排水の場合でも、日間変動、月間変動がある場合は、排水の発生源（製造品目、製造量の変動など）を考慮し、排水処理工程での処理時間を加味した上で、最も負荷が高いと予想される時期、時間に採取を行うことが望ましい。
- ・採取時に、通常排水中に含まれないと考えられる不純物（浮遊物やゴミなど）は除外してもよい。

③ 排水口の特徴（排水口の位置、構造、数、排水の種類など）
（具体的な考慮事項）

- ・複数の排水口が存在する場合や排水の種類などを考慮して、排水の採取地点を決定することが望ましい（詳細は2.2（1）を参照）。

④ その他

- ・採取計画は、採水側の事情だけではなく、試験を迅速かつ確実に進めるように考慮して立案されることが望ましい。

1.3 その他の参考情報

排水採取を行う者は、秘密保持の範囲内で事前に排水の情報を収集しておくことが望ましい。具体的には下記の事項などが挙げられる。

- ① 事業場で扱っている化学物質（物質名、量、使用時の形態、使用場所、該当する法制度（化学物質排出把握管理促進法、化学物質審査規制法ほか））
- ② 排水に含まれるまたは含まれる可能性のある化学物質（基準項目などを基本に、可能であれば含有化学物質、予想される変化物など）
- ③ 排水の状況（基本的な水質測定項目。BOD などの変動有無、処理排水量の変動幅、排水処理方法、排水口の位置と周囲の状況、排水の系統図）
- ④ 用水の水源および水質
- ⑤ 排出先の公共用水域の状況（可能であれば水位、流量など、また、〇〇川右岸〇〇橋下流 300 m など、具体的に記載）
- ⑥ 法制度への対応（水質汚濁防止法上の特定施設、地方条例、自主的な排水監視項目など）
- ⑦ その他（操業日誌、採水時間、事業場側の担当者、採取後の取り扱いなど、後日採水時の問題点などの確認を可能とする情報）

なお、第三者機関が採取計画を立案し、実施する場合は、事業者への情報の開示を求めることが望ましいが、困難な場合においては、公的機関において公表されている情報などの収集に努める。

2. 排水の採取と取り扱い

2.1 適用範囲

本検討案は、生物応答手法（バイオアッセイ）を用いて排水の生物影響を評価する場合の、排水の採取に適用される。

なお、事業場などから排出される排水について、バイオアッセイを実施するために必要な排水の採取、保存および輸送などの方法並びに留意事項については、本検討案に示されているが、必要に応じて、日本工業規格（以下、「JIS」という。）K 0094(工業用水・工場排水の試料採取方法)、JIS K 0410-3-1～10(水質—サンプリング—第 1 部～第 10 部)も参照することが推奨される。

2.2 排水の採取

(1) 採取地点

原則として排水を公共用水域に排出する最終排水口を採取地点とする（水質汚濁防止法により届出されている排水口）。ただし、以下に示す事例を参考に適切な場所（位置）を採取地点とすることが望ましい。

1) 最終排水口の位置、構造などの物理的要因により採取が困難な場合

事業場の排水の最終処理施設と最終排水口間で採取が可能または適した地点を選択する。採取地点の決定に際しては、当該事業場以外の排水の影響が全くないか極めて小さく、かつ当該事業場の特性を最もよく示していると考えられる排水（場所、種類）であることを考慮する。

2) 同一事業場内に複数の最終排水口が存在する場合

事業場内のすべての排水口で採取し、排水量比に合わせて混合したものを代表排水とする。または排水の種類、量などを考慮し、明らかに当該事業場を代表すると考えられる排水が存在する場合、その特定の排水口を採取地点とする。採取地点の決定に際しては、当該事業場と相談の上で適切に判断することが望ましい。

3) 最終放流水に海水などが含まれている場合

本検討案では淡水生物種を用いていることから、採取した排水に海水が含まれると生物試験が成立しない。よって最終排水口で海水の混入が考えられる場合は、海水の影響を受けない範囲で最終排水口に近い場所（位置）を採取地点とする。

4) その他

事業場の状況に応じ、排水の生物影響を評価する上で最も妥当であると判断される地点を専門家と相談の上決定しても構わない。例えば、最終排水口より前の排水経路において、事業場固有ではない排水（雨水、生活排水など）や化学物質の影響が考えられない排水（冷却水など）が混合されている場合や、塩素処理による影響が懸念される場合、それらが混合する前に採取することもありうる。

(2) 採取方法と採取時間

1) 採取方法

排水の採取方法は、グラブ（スポット）採水とコンポジット採水に類別される。バイオアッセイに供する排水は、事業場の稼働状況などを考慮して最も適切な条件で採水を行うことが望ましい。排水の変動性などを考慮しなければならない場合にはコンポジット採水が推奨される。しかし、採水担当者の負担などを考慮して、事業場の定常操業時に 1 日 1 ～数回のグラブ採水を行い、それぞれ試験に供することも可能である。

①グラブ（スポット）採水：特定の時間に 1 回だけ採取する方法。グラブ（スポット）

採水には、採取にかかるコストが少ないなどの利点がある反面、特定の時間に 1 回だけ採取した排水であるため、必ずしも事業場排水の平均的または代表的な排水ではな

い可能性もある。

②コンポジット採水：持続的または間欠的に採取した排水を混合する方法。コンポジット採水は、グラブ（スポット）採水に比べて事業場排水の平均的または代表的な水質を得ることが可能ではあるが、時間とコストがかかる。

【考慮事項】

- ・平均的な操業時でも、排水の質が日内または日間で大きく変動することが分かっている時間帯、たとえば、機器の稼働時や点検時に定常時と異なる排水が排出される場合などに注意する必要がある。
- ・間欠排水を行っている場合、たとえば、排水を一時的に貯留して一定時間後に排出する場合などに注意する必要がある。
- ・使用する原材料あるいは製造する製品の変更などによって排水の質が大きく変化することが判明した場合には、改めて採取を行うことが望ましい。

2) 採取時間

排水の質が日内または日間で変動することが分かっている場合、採取を行う日時を決定するための目安（判断基準）を定めておくことが望ましい。たとえば、継時的にモニタリングされた COD（化学的酸素要求量）を指標として、最も COD が高い時に採取を行うことが考えられる。排水の COD と生物影響とは必ずしも相関しないが、事業場の活動（操業）に伴う排出負荷が最も高い状態と想定され、より安全側に立つ採取ができると考えられる。

なお、排水の評価結果の信頼性を担保する上で、同一排水を複数の試験機関でバイオアッセイ（または化学分析など）に供し、結果のばらつきなどを把握することは重要であり、質の変化が想定される排水では、それらも考慮して採取方法などを計画することも有効な手段である。排水の種類や特徴によって推奨される採取方法が異なる場合もあるため、JIS K 0410-3-2（水質—サンプリング—第2部）を参照し、あらかじめ適切な採取方法を選択しておくことが推奨される。

(3) 採取に使用する器具および装置

採取に使用する器具や装置などは、採取地点の状況（高さや足場など）、排水の質（含有することが想定される化学物質など）、採水方法（グラブ（スポット）採水またはコンポジット採水）に応じて、適切なものを選択する。たとえば、グラブ（スポット）採水の場合には、バケツや柄付きひしゃく、採水器などを使用する。一方、コンポジット採水の場合には、排水を連続的または間欠的に自動採取できる装置を使用することが望ましい。いずれの場合においても、採取には、排水の汚染（コンタミネーション）を招かないように、適切に洗浄された清浄な器具や装置を使用する。

なお、排水の採取に使用できる器具および装置などの種類、特徴および使用方法などに関しては、別途、JIS K 0094 および K 0410-3-10 を参照することが推奨される。

(4) 試料容器および採取量

採取した排水（以下、試料）を入れる容器（試料容器）には、できるだけ不活性かつ破損しにくい材質のものをを用いる。排水の質（容器への吸着）や採取時の状況など（採取量

など）に応じて選択する。たとえば密栓できる 3~4 L 容の褐色ガラス製容器や液体用の折りたたみ式ポリタンクが挙げられる。輸送時はできるだけ遮光する。排水の必要採取量は、3 生物 1 試験分として 6 L 程度必要とするが、実施を予定しているバイオアッセイの種類と量、化学分析実施の有無、保存試料の必要性などに応じて採水量を調整する。

なお、バイオアッセイとは別に化学分析などを行う場合には、別途、試料容器を用意し、輸送中の損失を最小限にするための工夫をすることが望ましい。

(5) 試料採取時の記録

試料採取時には、以下の内容を記録する。

- 1) 試料の名称（またはその識別記号）※明瞭かつ容易に消えない方法で記載またはラベルを添付する。
- 2) 採取日時（作業の開始時刻と終了時刻）
- 3) 採取地点（可能であれば、採取地点を示した排水経路図）
- 4) 試料の性状（水温、色調、浮遊物、臭気および pH など）
- 5) 採取担当者、立会者の氏名
- 6) 採取方法
- 7) 採取試料量
- 8) 採取時の状況（天候、気温など）
- 9) その他 試験結果に影響を与えると考えられる事象

また、採取を行った排水口での一日あたりの排水量、年間排水量、事業場の操業日誌、排水について過去（採取時の直近）に測定された COD（または BOD）、pH、SS などのデータ（事業場が保有する記録の写し）、排水の放流先の状況（放流先が河川の場合にはその水量や河床の状況）などを採取時の記録に添付しておくことが望ましい。

2.3 試料の輸送方法

バイオアッセイは、採取終了時から 36 時間以内にばく露を開始することが望ましい。そのため、試料は速やかに以下の処理を行い、保冷しながら輸送する。宅配便で輸送する場合には冷蔵指定（0~6℃）にする。

試料輸送中の揮発性物質の損失を最小にするため、できる限り気相部分がない状態で容器を密栓（密封）する。試料を容器に封入後、できるだけ速やかに粗熱を取り（可能であれば、氷水中で水温を 4℃付近まで低下させる）、輸送用の容器に収容する（試料容器がガラス製容器の場合は、輸送中の破損を防ぐために各容器の間に緩衝材（発泡スチロールなど）を入れる）。なお、このとき内容証明も同封しておく。

2.4 試験機関における試料の取扱い

(1) 試料の受け入れ

試験施設は、輸送で受け入れた試料について、同封の内容証明と照合して同一性を確認する。また、搬入日時、搬入（輸送）方法、搬入時の状態（試料の漏えい、容器破損の有無など）、水温および受け入れ担当者の氏名などを記録する。

1 (2) 試料の前処理

2 排水の生物影響評価を適切に行うには、試料は採取終了時から 36 時間以内にバイオアッ
3 セイに供することが望ましい。そのため、試験機関は、試料の搬入後、直ちにバイオアッ
4 セイを開始できるように事前の準備を行う。試験機関が排水採取後 36 時間以内にバイオア
5 ッセイを開始できない場合には、改めて採取を行うか、開始できない理由を示して関係各
6 所の合意を得た上で試験を実施する。

8 1) 試験機関に搬入された試料は、遮光および保冷された状態で試験施設に搬入後、粗大
9 な夾雑物を除去する目的で、速やかに目開き約 60 μm のプランクトンネット（ナイロ
10 ン製）で通水し、粗大な夾雑物を除去する。

11 なお、藻類用の試料は、ろ過滅菌(0.2~0.4 μm)が認められていることから（第 3 部 4.5.1
12 項）、ろ過中の目詰まりが懸念される場合、事前にガラス繊維ろ紙 (GF/F、孔径 0.7 μm)
13 でろ過することが望ましい。

14 2) 粗大な夾雑物を除去した後、当日使用分を除いて、一日に使用する分量ずつ密栓でき
15 るガラス製容器に試料を分注し、できるだけ速やかに暗所（または遮光容器）にて冷
16 蔵保存（0~6℃）する。これらの保存容器には、試料の名称（またはその識別記号）
17 および容器個別の識別記号などを記載しておく。

18 3) 残留塩素、SS、TOC、pH、硬度、塩分（もしくは電気伝導率）などの水質分析を行う。

19 4) なお、粗大な夾雑物を除去前の排水についても残留塩素、SS、TOC、pH などを測定
20 しておくことが望ましい。

22 (3) 試料の水質測定

23 バイオアッセイに用いる試料は、試験に供する前に一部をガラスビーカーに分取して pH
24 および溶存酸素（以下、DO）を測定する。pH は排水基準を遵守していれば 6.5~8.5 の範
25 囲内であるため、原則として調整しない。ただし、輸送・貯蔵途中で pH が 6.5 未満あるい
26 は 8.5 以上に変化した場合はその限りではない。pH が 6.5 未満の場合には水酸化ナトリウ
27 ム (NaOH、1 N 程度) の添加により pH 6.5 付近に、pH が 8.5 を超える場合には塩酸 (HCl、
28 1 N 程度) の添加により pH 8.5 付近に調整する。

29 また、DO が飽和濃度の 60%未満の場合には、先端の口径が 1 mm 程度のガラス管（パス
30 ツールピペットなど）を用いて緩やかに通気し、溶存酸素が飽和濃度の 60%以上になった
31 時点で止める。

33 (4) バイオアッセイ終了後の試料の取扱い

34 試験施設で保存する試料については、バイオアッセイの終了後、適切な方法により処分
35 する。事業者の要望などにより、バイオアッセイの再実施などに備えた長期保存も可能で
36 あるが、1 年を経過した試料については適宜処分しても構わない。

38 (5) バイオアッセイ終了後の試験生物の取扱い

39 試験終了後の試験生物は回収し、環境中に排出されないよう適切に処理する。

第3部 試験の実施

1. 試験計画の立案

1.1 試験計画立案の流れ

試料採取後に速やかに試験を開始できるように、採取計画と試験計画の立案に当たっては、あらかじめよく調整しておく必要がある。よって試験計画は、採取担当者と試験担当者の合意の上に作成されなければならない。

1.2 実施する試験（試験生物）

魚類・甲殻類・藻類の3種の生物を用い、標準化された試験法に基づき実施されることを基本とする。排水の自然環境への影響についてより理解を深めるために、上記生物以外の試験を追加で行うことは構わない。本検討案ではゼブラフィッシュ、メダカ（魚類）、ニセネコゼミジンコ（甲殻類）、ムレミカヅキモ（藻類）を用いた短期慢性毒性試験法を示す。

試験開始前にそれぞれの試験生物を供給機関（たとえば、国立環境研究所）から入手し、馴化しておく。また入手した生物について、標準物質による感受性試験を実施しておくことが望ましい。

試験は十分な経験を有する試験機関によって実施されなければならない（試験機関の認証制度については未定）。

1.3 試験濃度の設定

- 試験に用いる排水は、試験用水を用いて希釈し、指定濃度に調製する。試験用水とは通常試験機関で用いている飼育水または OECD（経済協力開発機構）テストガイドラインなどに記載されている試験標準水を指し、試験の対照区としても用いられる。試験用水の一般水質分析は定期的に行う。

- 無希釈の試料を 100% と定義する。試験に用いる希釈濃度区の範囲は、80% 以下とする。
理由：特に藻類の試験において、排水 100% では窒素、りんが不足している場合に生長阻害が起きる。20% の OECD 培地存在下では窒素・りん不足が解消されることが確かめられているため、最低でも 20% の OECD 培地を含有させる。また、魚類及び甲殻類の試験においても、100% 排水で試験をする場合、水質の急激な変化によるストレス反応を起こす可能性があるため、藻類の試験に合わせて、試料の最高濃度を 80% とする。

- 試験濃度は、希釈倍率を公比 2 とし、5 濃度区を基本とする。すなわち、80、40、20、10 および 5% とする。ただし、過去に実施した試験の結果などから、濃度区を増減することも可能である。

1.4 スケジュールの策定

- 採取計画を熟知した上で試験実施のスケジュールを作成する。
- 排水入手日に速やかに試験が開始できるように、下記に示すような各試験の準備を十分に整える（詳細は各試験法を参照のこと）。
- 魚類試験の場合：試験開始時刻に受精卵を必要数だけ用意しなければならないため、

1 事前に産卵周期を調節するなどの配慮が必要となる。

2 ・甲殻類試験の場合：試験開始の約1週間以上前から、供試個体を選別するための個別
3 飼育（シングルカルチャー）を開始する。

4 ・藻類試験の場合：試験開始の2～4日前から、指数増殖期の藻類細胞を得るための前
5 培養を開始する。

6 ・排水入手時の状態（入手時の様態、水温、pHなどの一般水質）に関する記録用紙を用
7 意する。

8 ・試験期間中の試料保存（保存容器、保存場所、保存期間中の試料の性状の観察、温度
9 など）に関する記録用紙を用意する。

11 1.5 留意事項

12 ・各試験における観察項目だけではなく、試験結果に影響を与えと考えられる試験中
13 の事項についても記載する。

14 ・客観的に試験が遂行されていることを証明できるように、結果の記載方法などについ
15 て工夫する。

16 ・試験の有効性条件を満たさなかった場合の対応（再試験や試料の再採取の実施など）
17 については、試験依頼者と相談の上、決定する。

2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

2.1 試験の概要

本試験は、魚類の胚を排水（以下、試料）に受精直後からふ化後の卵黄吸収完了の直前までばく露し、ふ化率や生存率、発生異常などを調べ、対照区と比較することにより、胚・仔魚期の魚類に対する試料の致死影響（急性毒性）および亜致死的影响（亜慢性毒性）を明らかにすることを目的とする。器官形成や体成長など、生物にとって重要な外的影響を受けやすい時期（発生・成長段階）である胚期の魚類をばく露に用いることから、試料の魚類に対する（亜）慢性毒性に相当する影響が推定できると考えられる。

本試験法は、OECD テストガイドライン 212 “Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages”⁽¹⁾、国際標準化機構（ISO）規格 15088 “Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)”⁽²⁾および米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法 “Fathead Minnow, *Pimephales promelas*, embryo-larval survival and teratogenicity test method”⁽³⁾を参考にして策定したものである。本試験の実施には、本試験法のほかに、胚期を含む時期の魚類が試験生物として用いられている既存試験法のガイドラインなど⁽¹⁾⁽⁷⁾も参考となる。

2.2 試験生物

2.2.1 生物種

ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）またはメダカ（*Oryzias latipes*）が推奨される※。

※ゼブラフィッシュとメダカは、既存の排水（または環境水）を対象とする試験ガイドラインまたは国際規格などで用いられている魚種であり⁽²⁾⁽³⁾、小型で飼育や繁殖（採卵）手法が確立されている。本種は、現在世界各国の大学や研究機関（国立環境研究所等）等から入手できるが、適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再現性のある試験結果が得られることを確認しておく。試験生物の繁殖飼育および採卵方法などについては、本検討案のほかに、既存の試験法ガイドラインやガイダンスドキュメントなどの方法⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁹⁾⁻⁽¹²⁾を参考にしてもよい。

2.2.2 採卵に用いる親魚

(1) 系統

試験には、化学物質の毒性試験に用いられている系統を用いることが望ましい。観賞用、特殊な実験への利用を目的に作出された系統（近交系など）、遺伝子組み換え魚などは推奨しない。

(2) 履歴

試験に用いる受精卵を得るための親魚には、試験に用いるまでの履歴が明確な個体を用いる。そのため試験施設で継代的に繁殖・飼育されている個体を用いることが推奨される。採卵には、繁殖が可能な大きさ（齢）に達した成熟した雌雄を用いるが、初回産卵や老成した雌から得た卵は受精率や受精卵のふ化率が低い場合があるため注意する。

1 (3) 飼育および選抜

2 成熟期までの期間は、魚種または発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。
3 この飼育群から、外見的に異常がなく成熟した雌雄を親魚として選抜する。性別（雌雄）
4 および成熟状態は、魚種に応じて二次性徴、体型、体色などから判別する。

5 採卵用の親魚は、受精卵の採取を実施するまでの間、ばく露試験に用いる試験用水と同
6 質の水で飼育する。飼育水槽は、個体数に合わせて適切な大きさのものをを用いる。飼育は
7 流水式または半止水式で行う。適切な餌を十分に与えるが、餌の食べ残しや糞などによる
8 水質悪化を招かないようにする。

9 試験開始に合わせて確実に良好な受精卵を得るためには、飼育中に雌が産卵した卵の受
10 精率やふ化率を定期的に調べ、良い個体を選別しておくといよい。

12 2.2.3 受精卵の採取

13 (1) 採卵および受精卵の選別

14 良質な受精卵を得るためには、選抜した親魚を適切な密度および性比で水槽（産卵用水
15 槽）に収容して産卵させることが重要である。採卵に用いる親魚の個体数は、試験に必要
16 な受精卵数と雌 1 個体あたりの産卵数を考慮して決める。試験には、胞胚期までの卵（胚）
17 を用いるため、試験の開始予定時刻に合わせて採卵ができるように親魚を準備しておく（た
18 とえば、照明の点灯時刻を調節するなどの方法により産卵時刻の人為的な調整を行う）。参
19 考として、ゼブラフィッシュおよびメダカでの親魚の飼育および採卵方法を別添 1 および 2
20 に示す。

21 産卵用水槽に産出された卵は、ピペットやサイフォンなどを用いて飼育水と一緒に速や
22 かに回収する。このとき、卵は、可能な限り空気に晒さないように注意して取り扱う。回
23 収した卵を適量の飼育水と一緒にシャーレなどに移し入れ、実体顕微鏡下で観察し、未受
24 精卵や形態などに異常が認められる卵を除去し、試験に必要な数の受精卵（供試用受精卵）
25 を得る。このとき、容器内の糞などの異物をできる限り除去する。

26 供試用受精卵を入れた容器は、ばく露開始時まで試験温度に調整した恒温装置内に静置
27 しておく。

29 2.2.4 試験に用いる受精卵

30 試験には、受精後から胞胚期までの発生段階にある胚（受精卵）を供することが望まし
31 い。ゼブラフィッシュでは受精後 4 時間以内、メダカでは受精後 10 時間以内の胚であるこ
32 とが望ましい。

34 2.3 試験用水

35 試験用水には有害物質が含まれていない良質の淡水（たとえば、活性炭で脱塩素処理した
36 水道水など）を用いる。pH は 6.5～8.5、溶存酸素は飽和酸素濃度の 80%以上とする。試験に
37 は必ず試験用水を対照区として設ける。

39 2.4 試験容器、装置および器具

- 40 ・試験容器：容量 100 mL 程度のガラス製容器（直径 5 cm 程度）

- (水分蒸発や揮発成分の周囲への影響を防ぐために、透光性のあるふたなどで容器を覆うなどの工夫をする。)
- ・ 恒温装置：温度、照明条件（照度、明暗周期）を一定に維持できる装置（インキュベーター、ウォーターバスなど）または部屋
 - ・ 観察装置：実体顕微鏡
 - ・ 水質測定装置：水温計、溶存酸素計、pH 計など
 - ・ 器具類：メスシリンダー、ガラスピペット（先端の口径を 3～4 mm に広げ、バーナーなどで焼き丸めたもの）、ガラス容器（ビーカーまたは試薬瓶）など（器具類の材質は適切なものを選択する。）

2.5 試験方法および条件

2.5.1 試料の前処理

試料は、第 2 部 2.4 項に示した前処理を除いて、前処理せずに試験に供することが望ましい。

2.5.2 試験溶液の調製

試験溶液は、試験濃度ごとに適当量の試料を試験用水と混合（試料を試験用水で希釈）して調製する。なお、試験濃度（試験溶液中の試料の濃度）は、無希釈の試料を 100% とする。対照区の試験溶液には、試験用水を用いる。

試験濃度は、希釈倍率を公比 2 とする 5 濃度区を基本とする。80、40、20、10 および 5% の 5 濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含まれるように、濃度区を増減することも検討してよい。

試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器（ビーカーまたは試薬瓶）を用意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合して、所定濃度に希釈する。沈殿物がある場合はよく攪拌してから希釈を行う。

調製した試験溶液の水温は、恒温装置内に静置などして試験温度に調温する。

2.5.3 試験条件

- ・ ばく露方式：半止水式（少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
- ・ ばく露期間：ふ化日*から 5 日後まで
 - ゼブラフィッシュ：ばく露開始から 8～10 日間
 - メダカ：ばく露開始から 13～16 日間
- ・ 繰り返し数：4 容器以上/濃度区
- ・ 供試卵数：最低 10 粒/容器（15 粒/容器が推奨される）
- ・ 試験溶液量：50 mL/容器
- ・ 試験温度：ゼブラフィッシュ 26±1℃
メダカ 24±1℃
(容器間変動および日間変動は 1.5℃以下であることが望ましい)
- ・ 照明：室内光で明期 12～16 時間、暗期 8～12 時間
- ・ 給餌：なし

・通気：なし

※対照区において 50%を超える胚（受精卵）がふ化した日をふ化日（ふ化 0 日後）とする。

2.5.4 試験操作

後述の試験操作を行う際は、操作中試験溶液の水温ができるだけ変化しないように配慮する（たとえば、ウォーターバスの使用や実験室の室温を試験温度付近にしておくなど）。

（１）ばく露開始時の操作

試験容器には、試験濃度や容器番号などを記載（またはラベルを添付）しておく。

あらかじめ調製した各試験溶液の水温を測定し、試験温度の範囲を外れている場合は、再度、恒温装置内に静置などして水温を調整する。各試験容器に調製した試験溶液を分注する（各 50 mL）。前述 2.2.3 で用意した供試用受精卵を、試験濃度ごとに試験容器に必要な数（試験濃度あたりの供試数）を手早くガラスピペットを用いて移し入れる。この時点をばく露開始とする。

受精卵を入れた試験容器は、ふたなど（透光性のあるもの）で覆い、速やかに恒温装置内に入れる。

（２）ばく露期間中の操作

原則としてばく露開始から 24 時間ごとに、すべての試験容器について試験生物の観察を行う。死亡個体がみられた場合は、速やかに除去する。観察の終了後、試験溶液を少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水する。換水時には試験溶液の水質測定を行う。試験溶液の換水または観察終了後、試験容器を速やかに恒温装置内に戻す。

一般に胚期および仔魚期の魚類は、物理的刺激に対して脆弱で、ガラスピペットで試験溶液とともに吸引された際などに骨折による奇形を生じることがある。そのため試験溶液の換水は、試験容器内の試験溶液のみを抜き取って新しいものに入れ替える方法で行うことを基本とする（換水手順①）。ただし、試験容器内に顕著な微生物の増殖（容器壁面のバイオフィーム形成など）が認められるなど、試験結果に影響を及ぼす可能性が考えられる場合には、換水時に試験容器も清浄なものに交換する方法で換水を行う（換水手順②）。いずれの方法を用いる場合でも、換水する際に、試験生物を傷つけたり逸失したりしないように注意する。

換水手順①：試験容器を交換しない場合

ガラスピペットを用いて、試験生物を吸わないように注意して試験容器内の試験溶液を約 5 mL 残して除去する。そこにできるだけ試験生物をかく乱しないよう緩やかに、新調した試験溶液（水温調整したもの）を 50 mL 入れる。この方法により換水した場合は、試験溶液の約 90%が新鮮な試験溶液に入れ替わり、換水後の試験液量は約 55 mL になる。

換水手順②：試験容器を交換する場合

新しい試験容器に新調した試験溶液 50 mL を入れる。ガラスピペットを用いて、換水

1 前の試験容器内の試験生物を少量の試験溶液とともに新しい試験容器に移し入れる。こ
2 のとき試験生物と一緒に新しい試験容器に持ち越す試験溶液は 5 mL 以下（試験液量の
3 10%以下）にする。

5 (3) ばく露終了時の操作

6 すべての試験容器について、試験生物の観察および試験溶液の水質測定を行う。すべて
7 の試験操作の終了後、試験に供した試料および生物は適切な方法で処分する。

9 2.5.5 水質の測定

10 すべての試験濃度について、ばく露開始時、ばく露期間中の換水前後、ばく露終了時の
11 試験溶液の水温、pH、溶存酸素を測定し、記録する。なお、換水前の試験溶液とは新調し
12 た試験溶液、換水後の試験溶液とは換水時に除去した試験溶液を指す。

14 2.5.6 試験生物の観察

15 試験容器中の試験生物を肉眼または実体顕微鏡下で観察し、生死およびふ化した胚体数
16 を記録する。発生前期（器官形成前）の胚では、全体の透明性が消失して白濁したものを
17 死亡とみなす。発生後期（器官形成後）およびふ化後の仔魚では、白濁または心臓の拍動
18 が認められないものを死亡とみなす。卵膜から胚（体軀部）が完全に出ていない状態のも
19 のはふ化前とみなす。観察後、死亡した胚、仔魚およびふ化後の卵膜を除去する。

20 ばく露開始から 48 時間後以降の観察では、各試験濃度の生存する胚または仔魚のうち、
21 対照区と比較して、「体軀の発育不全」、「尾部の卵黄からの不分離」などの形態異常、「心
22 拍数の低下」あるいは行動などに異常が認められる個体数を記録しておくことも、供試試
23 料の毒性の評価などにおいて有効である⁽²⁾⁽⁵⁾。

25 2.5.7 試験の有効性

26 本試験は、以下を満たさなければならない。

- 27 ・対照区におけるふ化率（2.6.1（2）参照）が 80%以上であること。
- 28 ・対照区におけるばく露終了時の生存率が 70%以上であること。
- 29 ・対照区における溶存酸素がばく露期間を通して飽和酸素濃度の 60%以上であること。

31 2.6 結果の算出方法

32 2.6.1 影響指標の算出

33 試験から得られたデータをもとに、以下に定義される影響指標値を試験容器ごとに算出
34 する。

36 (1) 生存率

37 供試卵数に対する、ばく露終了時に生存した胚体*または仔魚数の割合（％）。

38 生存率＝ばく露終了時の（生存胚体数＋生存仔魚数）／供試卵数×100

39 ※発生は進んでいるがふ化前の胚（卵）。

1 (2) ふ化率

2 供試卵数に対する、最大ふ化所要日数*までにふ化した卵数の割合 (%)。

3 ふ化率＝最大ふ化所要日数での総ふ化仔魚数／供試卵数×100

4 ※ゼブラフィッシュの最大ふ化所要日数はばく露開始から 5 日後、メダカの最大ふ化所
5 要日数はばく露開始から 14 日後。

7 (3) ふ化後生存率

8 ばく露期間にふ化した仔魚数に対する、ばく露終了時に生存した仔魚数の割合 (%)。

9 ふ化後生存率＝ばく露終了時の生存仔魚数／ばく露期間の総ふ化仔魚数×100

11 (4) 生存指標

12 ふ化に対する遅延の影響も加味した胚期からふ化後の仔魚に対する影響の指標※。

13 生存指標＝ふ化率×ふ化後生存率／100

14 ※試料の胚に対する影響（ふ化率）とふ化後の仔魚に対する影響（ふ化後生存率）を総合する指標。なお、
15 最大ふ化所要日数までにすべての供試卵がふ化または死亡した場合には、生存指標は（1）の生存率と
16 等しくなる。

18 2.6.2 最大無影響濃度

19 ふ化率、ふ化後生存率、生存率または生存指標について、対照区と比較して統計学的に
20 有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度（LOEC）、その一つ下の試験濃
21 度を最大無影響濃度（NOEC）とする（ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上
22 の影響がみられること）。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
23 差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度を NOEC とする。

24 なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、
25 非線形回帰モデルなどを用いて推定した ECx/ICx（x%影響/阻害濃度）を算出してもよい⁽¹⁴⁾
26 （詳細は第 4 部を参照のこと）。ECx/ICx 推定では、各試験濃度における影響指標値は全試
27 験容器の平均値を用い、以下の式（Abbott's formula）による補正を行う。

$$28 \quad P = 100 - \{(C - P') / C \times 100\}$$

29 ここで、

30 P： 補正された各試験濃度における影響指標値

31 P'： 各試験濃度における観察された影響指標値

32 C： 対照区における観察された影響指標値

34 2.7 参考文献

- 35 (1) OECD (1998), OECD Guideline for testing of chemicals 212, Fish, Short-term toxicity test on
36 embryo and sac-fry stages.
- 37 (2) ISO (2007), International Standard 15088, Water quality — Determination of the acute toxicity
38 of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*).
- 39 (3) U.S. EPA (2002), WET Test Method 1001.0, Fathead Minnow, *Pimephales promelas*,
40 embryo-larval survival and teratogenicity test method, Short-term methods for estimating the

- 1 chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition,
2 pp.112-140.
- 3 (4) OECD (1992), OECD Guideline for testing of chemicals 210, Fish, early-life stage toxicity
4 test.
- 5 (5) OECD (2013), OECD Guideline for testing of chemicals 236, Fish Embryo Acute Toxicity
6 (FET) Test.
- 7 (6) U.S. EPA (1996), Ecological effects test guidelines OPPTS 850.1400, Fish early-life stage
8 toxicity test.
- 9 (7) ASTM (2005), Standard guide for conducting early life-stage toxicity tests with fishes,
10 E1241-05, Annual books ASTM standards, vol 11.06, 2008, pp.308-336.
- 11 (8) ECETOC (2005), Alternative testing approaches in environmental safety assessment, ECETOC
12 Technical Report No.97.
- 13 (9) U.S. EPA (1991), Guidelines for conducting early life stage toxicity tests with Japanese
14 Medaka (*Oryzias latipes*), EPA/600/3-91-063.
- 15 (10) Umweltbundesamt (2006), Background paper on fish embryo toxicity assays, UBA Conduct
16 Number 203 85 422)
- 17 (11) Monte Westerfield (2007), The zebrafish book, A guide for laboratory use of zebrafish (*Danio*
18 *rerio*), edition 5, Institute of Neuroscience, University of Oregon.
- 19 (12) Environment Canada (1992), Biological Test Method: Test of larval growth and survival using
20 *Fathead minnows*, Report EPS 1/RM/22.
- 21 (13) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to
22 application, OECD series on testing and assessment, Number 54.
- 23 (14) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II,
24 Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.
- 25 (15) 岩松鷹司 (1998), メダカ学全書, 株式会社大学教育出版.
- 26

1 (別添 1) ゼブラフィッシュでの受精卵の採取法

2 ゼブラフィッシュでは、以下に示す方法により効率的に採卵予定日（ばく露試験の開始
3 日）に受精卵を採取することができる。なお、下記以外の方法で親魚を飼育して産卵させ
4 受精卵を得ることも可能である⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

6 (1) 採卵に用いる親魚

7 採卵に用いる親魚は、4～12 カ月齢の個体が適している。試験施設で繁殖・飼育した個体
8 を用いることが望ましい。

10 (2) 親魚の維持飼育および選抜

11 ふ化から約 4 カ月齢までは、発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。この
12 飼育個体群から外見的に異常が認められない成熟した個体を試験に供する受精卵を得るた
13 めの親魚として選抜する。性別（雌雄）および成熟状態は、体型および体色から判別可能
14 である。

15 選別した親魚は、後述の受精卵採取まで以下の条件下で維持（飼育）する。水槽は、飼
16 育する個体数に合わせて適切な大きさのものをを用いる。飼育水には、ばく露試験に用いる
17 試験用水と同質の水（たとえば、活性炭で脱塩素処理した水道水など）を用いる。雌の産
18 卵数や卵質は餌料にも依存するため、維持飼育中はできるだけ多様な餌を十分に与える。
19 そのため採卵に用いる親魚は、飼育水を連続的に供給する流水式で飼育することが望まし
20 いが、半止水式で飼育する場合は、餌の食べ残しや糞などによる水質悪化を招かないよう
21 に適切な頻度で換水する。

22 一般にゼブラフィッシュでは、初回の産卵は産卵数が少なく受精率が低い。また、低い
23 受精率やふ化率は、雄よりも雌（卵質）に依存する場合が多く、受精率やふ化率が低い卵
24 を産んだ雌はその後も受精率やふ化率の低い卵を産む傾向にあるとされている。そのため、
25 可能であれば、維持飼育中に後述する受精卵採取の方法などにより雌に数回産卵させ、受
26 精率やふ化率の高い卵を産む個体を選別しておくといよい。親魚の飼育条件は以下のとおり
27 である。

29 (3) 親魚の飼育条件

- 30 ・水温：26±1℃
- 31 ・照明：12～16 時間明/12～8 時間暗（照度は通常の室内程度）
- 32 ・飼育密度：飼育水 1 L あたり 1 個体未満
- 33 ・餌料：市販の観賞魚用飼料、ふ化直後のアルテミアやミジンコ類など

35 (4) 採卵用親魚の準備（雌雄の分離飼育）

36 採卵予定日（ばく露試験の開始日）前に維持飼育している親魚群から、採卵に用いる親
37 魚（雌：雄の比＝約 1：2）を選抜する。選別した親魚は、採卵予定日の前日～1 週間程度
38 前から雌雄を別々の水槽に隔離して飼育しておく（適切な雌雄分離の日数は、個体によっ
39 ても異なるため、事前に使用する採卵用の親魚で調べておくことが望ましい）。飼育条件な
40 どは維持飼育と同じでよい。

(5) 親魚のペアリング (参考例)

採卵予定日の採卵時刻の 1 時間程度前に、分離飼育しておいた雄と雌を同じ産卵用水槽に収容する。産卵用の水槽として、雌の産卵後に沈降した卵を同居する親魚が食べるのを防ぐために、底に直径 1~1.5 cm のガラスビーズを敷き詰めるか、水槽底から 2~3 cm の位置に目合い 2 mm 程度のメッシュを設置しておく。卵の回収が容易であり、また受精率の高い卵のみを選択して試験に用いることができるように、親魚のペアリングは、複数の小型水槽を用いるのが望ましい(たとえば、10 L 程度のガラス水槽を用いる)。産卵用水槽には、約 1:2 の比率で雌雄を入れる。飼育密度は飼育水量 1L あたり 1~2 個体とする(たとえば、10 L の水槽に雄 10~6 個体と雌 5~3 個体)。採卵に用いる雌の個体数は、試験に必要な受精卵数を考慮して決める。

なお、採卵予定日前日の消灯直前に雌雄をペアリングし、翌日の照明点灯直後に産卵させることもできる。ただし、雌の産卵時刻は、それまでの照明周期(点灯時刻)の影響を受ける場合があるので、予定の採卵時刻に産卵が行われるように事前に照明周期に馴化させておくことが必要である。また、雌雄の親魚を入れた水槽は、照明の点灯まで光が入らないように水槽全体を箱などで覆い完全に遮光(暗条件)した状態にしておく。

(6) 採卵

採卵用の親魚(雌)が産卵可能な状態であれば、ペアリングしてからおよそ 30 分~1.5 時間後までに産卵がみられる。

雌の産卵を確認できたら(または明条件にしてから 1.5 時間後に)、水槽底に沈降した卵を回収する。ガラスビーズを敷いた産卵用水槽を用いた場合は、ネットなどで水槽内の親魚を別の水槽に移してから、ガラスビーズが入らないように目合い 2 mm 程度のネットを通して別の容器に飼育水と一緒に回収する。メッシュを設置した産卵用水槽を用いた場合は、親魚を別の水槽に移してからメッシュを外して、サイフォンなどを用いて水槽底に沈降している卵を飼育水と一緒に別の容器に回収する。

(7) 受精卵の選別

容器に回収した卵は、ピペット(先端の内径は 4 mm 程度)で適量の飼育水と一緒にシャーレに移し入れ、実体顕微鏡下で観察して、未受精卵(外見的に、「透明感がない」または「細胞分裂がみられない」状態のもの)を除去する。また、受精卵のうち、「形状が歪んでいる」、「卵膜や卵黄に白濁部がみられる」、「卵割のサイズが不均一である」などの異常が認められるものも除去する。このとき混入している糞なども除去する。

選別後、受精卵の入ったシャーレの飼育水を試験に用いる試験用水で置換する。試験用水の水温は試験温度(26±1℃)に調整しておく。

この受精卵の選別作業は、各産卵用水槽から回収した卵を混合せずに、産卵用水槽ごとに別のシャーレに移し入れて行う。また、作業中の水温変化を防ぐために、室温(実験室)を試験温度付近に調整しておくことが望ましい。

1 (別添 2) メダカでの受精卵の採取法

2 メダカでは、以下に示す方法により親魚の飼育（繁殖）し、試験に用いるための受精卵
3 を採取することができる。なお、親魚飼育および受精卵採取の方法は、既存の文献なども
4 参考にすることが望ましい⁽⁹⁾⁽¹⁵⁾。

6 (1) 採卵に用いる親魚

7 3 カ月齢以上の成熟した個体を採卵用の親魚として用いる。ただし、老成した雌では受精
8 率が低い場合があるので注意する。

9 採卵用の親魚は、試験施設で繁殖・飼育した個体を用いることが望ましい。ふ化から成
10 熟期（約 3 カ月齢）までは、発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。この飼
11 育個体群から外見的に異常が認められない成熟した個体を試験に供する受精卵を得るため
12 の親魚として選抜する。性別（雌雄）および成熟状態は、体型および体色から判別可能で
13 ある。

15 (2) 親魚の飼育

16 メダカの親魚は、以下の条件下で飼育（繁殖）する。水槽は、飼育する個体数に合わせて
17 適切な大きさのものをを用いる。飼育水には、ばく露試験に用いる試験用水と同質の水（た
18 とえば、活性炭で脱塩素処理した水道水など）を用いる。一般に、メダカは十分に給餌し
19 て良好な環境で飼育すれば毎日産卵させることも可能である。そのため、受精卵を得るた
20 めの飼育は、飼育水を連続的に供給する流水式で行うことが望ましい。半止水式で飼育す
21 る場合は、餌の食べ残しや糞などによる水質悪化を招かないように適切な頻度で換水する。

22 飼育する個体数は、試験に必要な受精卵数を考慮して決める。一般にメダカの産卵数は 1
23 個体当たり 10～40 粒/日であるが、採卵予定日にすべての雌が産卵するとは限らないため、
24 その点も考慮して必要な受精卵を得るのに十分な個体数を用意する。

- 25
- 26 ・水温：24±1℃
- 27 ・照明：12～16 時間明/12～8 時間暗（照度は通常の室内程度）
- 28 ・飼育密度：飼育水 1L あたり 2 個体程度として、雄：雌＝1：2 とする。
- 29 （たとえば、30L 水槽に雌 40 個体と雄 20 個体）
- 30 ・餌料：市販の観賞魚用飼料、ふ化直後のアルテミアやミジンコ類など
- 31

32 (3) 採卵

33 メダカの雌は、照明の点灯後 30 分～1.5 時間に産卵する。雌の産卵を確認できたらネッ
34 トなどで雌をすくい、腹部（総排泄口）に付着している卵塊を採取する。水槽底に落下し
35 ている卵塊はサイフォンなどを用いて飼育水と一緒に別の容器に回収する。採取した卵塊
36 は、適量の飼育水と一緒にシャーレに入れる。

37 (4) 受精卵の選別

38 採取した卵塊は、付着糸を除去して 1 粒ずつに分離する。たとえば、シャーレに適量の
39 飼育水と一緒にガーゼを敷き、その上に卵塊を置いて指先で転がすようにすることで付着
40

糸を除去することができる。付着糸を除去した卵について、実体顕微鏡下で観察して、未受精卵（外見的に、「透明感がない」、「囲卵腔が形成されていない」または「細胞分裂がみられない」状態のもの）を除去する。また、受精卵のうち、「形状が歪んでいる」、「卵膜や卵黄に白濁部がみられる」、「卵黄が小さい」、「囲卵腔が狭い」などの異常が認められるものも除去する。このとき混入している糞なども除去する。

選別後、受精卵の入ったシャーレの飼育水を試験に用いる試験用水で置換する。試験用水の水温は試験温度（ $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）に調整しておく。また、受精卵の選別作業中の水温変化を防ぐために、室温（実験室）を試験温度付近に調整しておくことが望ましい。

3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法

3.1 試験の概要

本試験は、ふ化後 24 時間以内のミジンコを排水（以下、試料）に 7 日前後（最大 8 日間）ばく露し、ばく露中の死亡および産まれた仔虫の数（産仔数）を調べ、対照区と比較することにより、ミジンコの繁殖に対する試料の影響（慢性毒性）を明らかにすることを目的とする。

本試験法は、カナダ環境省（Environment Canada）の試験法“Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*”⁽¹⁾、米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法“*Ceriodaphnia* 7-day survival and reproduction test”⁽²⁾、および米国試験材料協会（ASTM）のガイドライン⁽³⁾を参考に策定したものであり、本試験の実施にあたっては、本試験法のほかに、これらの既存の試験法ガイドラインなども参考になる。

3.2 試験生物

3.2.1 生物種

ニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いる※。

※ニセネコゼミジンコは、成体で体長 0.9～1.0 mm、仔虫で体長 0.1 mm 程度の小型のミジンコであり、寿命は 3 週間程度と OECD テストガイドラインなどで推奨されるオオミジンコ（*Daphnia magna*）より短い（オオミジンコの寿命は 60 日以上）。本種は、現在世界各国の大学や研究機関（国立環境研究所等）等から入手できるが、適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再現性のある試験結果が得られることを確認しておく。

3.2.2 飼育方法

試験に用いる少なくとも 3 週間前から、試験用水（3.3 に後述）中で試験条件と同じ環境下において飼育する。

飼育方法には、マスカルチャー（集団飼育）とシングルカルチャー（個別飼育）がある。マスカルチャーでは、適当数のミジンコを 1 個体/15 mL 程度の密度となるように飼育する。試験用水を適度に換水し、仔虫を除去する。生後 1 週間以上飼育し、成熟した個体から産まれた雌仔虫を毎週継代し、一定数のマスカルチャーを維持する。多くの死亡個体や体色などの異常がみられる個体、休眠卵やオスが観察された、または 1 回目の産仔までの期間遅延など異常が生じたマスカルチャーは、継代やシングルカルチャーの作製には使用しない。

シングルカルチャーは、マスカルチャーで生後 1 週間以上飼育した個体から産まれたメス仔虫を用いて開始する。シングルカルチャーでは、15 mL の試験用水を満たした容器で 1 個体ずつ飼育を行い、飼育開始から約 7 日間の産仔数を記録する。マスカルチャーと同様に、異常が観察されない個体から産まれた仔虫を用いて継代するが、3.2.3 に後述する条件を満たした成熟個体の仔虫を継代に用いることが望ましい。一連のシングルカルチャー（たとえば同じマスカルチャーから作製した 30～40 個体）に識別番号を付ける。

飼育中は、供試個体の条件（3.2.3 参照）を満たすよう、適当量の YCT および単細胞緑藻類を毎日与える。YCT（Yeast・Cerophyll・Trout Chow）は、Environment Canada または U.S. EPA の試験法⁽¹⁾⁽²⁾の手順に準拠して作製されたものを用いる。また、単細胞緑藻類は、クロ

レラ (*Chlorella vulgaris*) を用いるが、感受性や産仔数に影響がなければムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いてもよい。1 日当たりの給餌量は、たとえばシングルカルチャーにおいては、ミジンコ 1 個体当たり、YCT を 50 μ L、藻類濃縮液を有機炭素換算量で 0.02-0.05 mgC を目安とする。

3.2.3 供試個体の準備

試験を開始するために、以下の条件を満たした個体を十分数含む一連のシングルカルチャーを準備しておくことが望ましい。

- ・試験前 7 日間の平均死亡率が 20%を超えないこと
- ・試験に用いる 3 腹目以降の産仔数が 1 親個体あたり 8 個体以上であること
- ・試験前 7 日間の 3 腹分の合計産仔数の平均値が 15 個体以上であること
- ・休眠卵が観察されないこと

試験開始日に、容器内に産出された仔虫を肉眼または実体顕微鏡下で観察する。試験には、外見的に異常が認められない生後 24 時間以内のメス仔虫を供する。なお、供試する仔虫の生後の経過時間のばらつきは 12 時間以内にすることが望ましいが、ニセネコゼミジンコでは、産仔のタイミングをコントロールすることは困難であるため、仔虫の大きさを目視で確認し、大きさをそろえることで対応する。なお、試験に用いた親個体の由来がわかるように、識別番号、作製日を記録しておく。

3.3 試験用水

試験用水は、水道水または地下水を活性炭ろ過した水、M 4 培地(硬度は約 250 mg CaCO_3/L)を希釈した水、U.S. EPA の試験法⁽²⁾などに準じて調製した人工調製水や市販のミネラルウォーターなどが適当である。硬度は 60~100 mg CaCO_3/L が望ましい。たとえば、U.S. EPA 推奨の人工調製水 (Moderately hard water) の硬度は 80~100 mg CaCO_3/L 、国立環境研究所で使用している試験用水の硬度は 70~80 mg CaCO_3/L 程度である。

試験用水は、水温を $25\pm 1^\circ\text{C}$ に調整し、溶存酸素量が飽和濃度の 90~100%になるようにする。エアレーションしてから試験に用いる。なお、エアレーション後に過飽和にならないよう注意する。試験用水の pH は 6.5~8.5 が望ましいが、この範囲を外れる場合には、水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液または塩酸(HCl)で調整する。

3.4 試験容器、装置および器具

- ・試験容器：容量 50 mL 程度のガラス製容器
(水分蒸発や揮発成分の周囲への影響を防ぐために、透光性のあるふたなどで容器を覆うなどの工夫をする。)
- ・恒温装置：温度、照明条件(照明の種類、明暗周期)を一定に維持できる装置(インキュベーター、ウォーターバスなど)または部屋
- ・観察装置：実体顕微鏡
- ・水質測定装置：水温計、溶存酸素計、pH 計など
- ・器具類：メスシリンダー、ガラスパスツール、ガラスピペット(先端の口径を 3~4 mm

に広げ、バーナーなどで焼き丸めたもの)、ガラス容器(ビーカーまたは試薬瓶)、
分注器など(器具類の材質は適切なものを選択する。)

3.5 試験方法および条件

3.5.1 試料の前処理

試料は、第2部2.4項に示した前処理を除いて、できるだけ前処理せずに試験に供することが望ましい。

3.5.2 試験溶液の調製

試験溶液は、試験濃度ごとに適当量の試料を試験用水と混合(試料を試験用水で希釈)して調製する。なお、試験濃度(試験溶液中の試料の濃度)は、無希釈の試料を100%とする。対照区の試験溶液には、試験用水を用いる。

試験濃度は、希釈倍率を公比2とする5濃度区を基本とする。80、40、20、10および5%の5濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含まれるように、濃度区を増減することも検討してよい。

試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器(ビーカーまたは試薬瓶)を用意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合して、所定濃度に希釈する。

調製した試験溶液の水温は、恒温装置内に静置またはウォーターバスに水浴させるなどして試験温度に調整する。

3.5.3 試験条件

- ・ばく露方式：半止水式(少なくとも週3回または2日ごとに換水)
- ・ばく露期間：最長8日間(対照区で60%以上の個体が3腹以上産仔するまで)
- ・繰り返し数：10容器/濃度区
- ・供試生物数：10個体/濃度区(1個体/容器)
- ・試験溶液量：15 mL/容器
- ・試験温度：25±1℃
- ・硬度：60～100 mg CaCO₃/L が望ましい
- ・照明：室内光で明期16時間、暗期8時間
- ・餌：適量のYCTおよび単細胞緑藻類を毎日与える。給餌量は、1日1個体当たり、YCTを50 μL、藻類濃縮液を有機炭素換算量で0.02-0.05 mgCを目安とする

3.5.4 試験操作

(1) ばく露開始時の操作

あらかじめ調製した各試験溶液の水温を測定し、試験温度の範囲を外れている場合は、再度、恒温装置内に静置などして水温を調整する。各試験容器に調製した試験溶液を分注する(各15 mL)。

3.2.3の条件を満たした一連のシングルカルチャーから、仔虫数が試験区数(5濃度区の場合、対照区を含めて試験区数は6となる。)以上いる容器を繰り返し数(通常10)分用

意する。ガラスピペットなどを用いて、同じ親個体から産まれた同一腹仔の仔虫を 1 個体ずつ、対照区と各濃度区の試験容器に移し入れる。同様に、各容器から繰り返し分の試験容器（通常残り 9）に仔虫を投入する。この時点をばく露開始とする。

(2) ばく露期間中の操作

毎日、試験容器ごとに供試個体（親個体）の生死の観察および産まれた仔虫の計数を行う。産まれた仔虫のうち、計数時に死亡していた個体は産仔数に含めない。容器内の仔虫は、計数時にガラスピペットなどを用いて除去する。このとき、何腹目の産仔かを記録することが望ましい。同一記録日において 2 腹分の仔虫が混在している場合、仔虫の大きさを観察することにより、腹目の区別をするとよい。

換水は供試個体の生死の観察後、供試個体を新しく用意した試験容器に移すことで行う。仔虫の計数は、換水前後のどちらで行ってもよい。

(3) ばく露終了時の操作

毎日の上記操作の終了後、対照区における産仔数を集計し（3.6.1 参照）、60%以上の供試個体（対照区を繰り返し数 10 で実施した場合は 6 個体以上）で 3 腹以上の産仔が確認された日をもって、試験を終了する。ただし、ばく露期間は最長 8 日間とする。

3.5.5 水質の測定

すべての試験濃度区および対照区について、ばく露開始時、ばく露期間中の換水前後、ばく露終了時の試験溶液の水温、pH および溶存酸素を測定し、記録する。換水後の試験溶液の測定は、各繰り返し容器（通常 10）より分取し、混合したものを用いてよい。なお、換水前の試験溶液とは新調した試験溶液、換水後の試験溶液とは換水時に除去した試験溶液を指す。塩分の測定は換水前の試験溶液について 1 回以上行うことが望ましい。

3.5.6 試験の有効性

本試験は以下の条件を満たさなければならない。

- ・対照区における親個体の死亡率が 20%以下であること
- ・対照区における供試個体の 60%以上が最大 8 日間で 3 腹分の産仔をすること
- ・対照区における 3 腹分の合計産仔数が平均して 15 個体以上であること
- ・対照区において休眠卵の生産が確認されないこと

3.6 結果の算出方法

3.6.1 産仔数の集計

対照区における供試個体の 60%以上が仔虫を 3 腹産んだ時点において、濃度区においても 3 腹分の産仔数を容器ごとに集計し、各濃度区で平均値を算出する。集計に当たっては以下の点に留意する。

- ・原則、1 日の産仔数が 2 個体以上の場合に 1 腹とみなす。ただし、初産の場合や、ばく露の影響が認められる場合は、1 個体でも 1 腹とみなす。
- ・産仔途中の換水操作などにより、1 腹分の産仔が 2 日間に分かれて観察された場合は、1 日の産仔数が 2 個体以上でも 2 日分をまとめて 1 腹とみなす（たとえば 24 時間齢以上とみられるサイズの仔虫が数個体観察され、前日にも産仔があった場合、前日の

産仔と同一腹仔とみなす)。

- ・ 供試個体が死亡した場合、それまでの産仔数(産仔開始前の場合は 0 とする)を集計に含める。ただし、死亡原因が試験操作上の問題など、試料に起因しないことが明確な場合は、集計から除外する。

3.6.2 供試個体の半数致死濃度 (LC50)

供試個体の死亡率について、試験最高濃度区での死亡率が 50%以上であった場合には、可能であれば供試個体の半数致死濃度 (LC₅₀) を推定する(詳細は第 4 部を参照のこと)。

3.6.3 最大無影響濃度 (NOEC)

産仔数について、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度 (LOEC)、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度 (NOEC) とする(ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上の影響がみられること)。すべての試験濃度において対照区と有意差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度を NOEC とする。

なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、非線形回帰モデルなどを用いて推定した ECx/ICx (x%影響/阻害濃度) を算出してもよい⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾(詳細は第 4 部を参照のこと)。

3.7 参考文献

- (1) Environment Canada (2007), Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, EPS1/RM/21, Second Edition
- (2) U.S. EPA (2002), 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.141-196.
- (3) ASTM (1989), Proposed new standard guide for conducting three brood, renewal toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia*, American Society for Testing and Materials, Committee E-47, Draft no.6, 79p. Philadelphia PA
- (4) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.

4. 淡水藻類を用いる生長阻害試験法

4.1 試験の概要

本試験は、指数増殖期の藻類を排水（以下、試料）に添加して 72 時間ばく露し、ばく露中およびばく露終了時に生物量（細胞濃度）を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する試料の影響を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において生長とは、ばく露期間中の生物量の増加を言う。

本試験法は、2006 年に改訂された OECD テストガイドライン 201” Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”⁽¹⁾および化学物質審査規制法の藻類試験法⁽²⁾を基本に、国際標準化機構（ISO）規格 8692 “Water quality — Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae”⁽³⁾および米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法 “Green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth test”⁽⁴⁾ならびに”Algal Toxicity, Tier I and II”⁽⁵⁾も参考に策定したものである。本試験の実施にあたっては、本試験法のほかに、これらの既存の試験法ガイドラインなども参考になる。

4.2 試験生物

ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*（旧 *Selenastrum capricornutum* Printz））が推奨される※。ムレミカヅキモ以外の藻類（*Desmodesmus subspicatus* など）を用いる場合は、ばく露期間中、指数増殖期が維持されることが確認されていなければならない。継代方法などについて既存の試験法ガイドラインやガイダンスドキュメントなど^{(1), (3)-(5)}を参考にすること。

※適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再現性のある試験結果が得られることを確認しておく。ムレミカヅキモは OECD テストガイドラインなどの既存試験法で最も広く用いられている単細胞緑藻類であり、系統保存されている本種は、国内の研究機関では、国立環境研究所で入手できる。

4.3 培養方法

4.3.1 培地

OECD テストガイドライン 201 に示された OECD 培地⁽¹⁾が推奨されるが、U.S. EPA の AAP 培地や C 培地など⁽⁴⁾⁽⁵⁾と同程度の培地を使用することもできる。なお、OECD 培地の組成ならびに調製時の留意点などは以下のとおりである。

- ・塩化アンモニウム (NH_4Cl) 15 mg/L
- ・塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 12 mg/L
- ・塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 18 mg/L
- ・硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 15 mg/L
- ・リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 1.6 mg/L
- ・塩化鉄（Ⅲ）六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.064 mg/L
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.1 mg/L
- ・ホウ酸 (H_3BO_3) 0.185 mg/L
- ・塩化マンガン四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.415 mg/L
- ・塩化亜鉛 (ZnCl_2) 0.003 mg/L
- ・塩化コバルト六水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.0015 mg/L

- ・塩化銅二水和物 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.00001 mg/L
- ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.007 mg/L
- ・炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 50 mg/L

これらをイオン交換水などに直接もしくは濃厚保存液として必要量添加する。大気と平衡状態であれば pH は 8.1 となる。pH が 8.1 にならない場合は、通気や攪拌などを行う (pH の調整は行わない)。調製した培地の滅菌は、孔径 0.22 μm 程度のフィルターによるろ過滅菌もしくはオートクレーブにより行う。

4.3.2 前培養

供試に適した指数増殖期の藻類細胞を得るため、試験を開始する前に、生物を試験と同じ条件で 2～4 日間、前培養する。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、ばく露開始時に指数増殖期になるようにする。前培養において形態の異常な細胞が出現した場合は、それらを試験に使用しない。なお、指数増殖に達するまでの前培養の期間や添加する生物量などは、前培養中の温度や光強度、培地の容量などにも依存するため、あらかじめ前培養に使用する培養装置や条件で生長曲線を描き、初期添加生物量と指数増殖期間の関係、最終増殖量などを調べておくといよい。以下に前培養の例と指数増殖期の目安を示す。

- ・250 mL の三角フラスコに 100 mL の試験培地を入れる。
- ・滅菌したピペットを用いて、生物量が約 5,000 cells/mL となるように供試藻類を無菌的に接種する。この際、加える藻類懸濁液は 5mL 以内とする。
- ・温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照度約 60～120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に調整した培養器内などで、連続光下で振とう培養する。
- ・毎日、培養液を分取して生物量を計数し、生物量が $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL に達した時点で本試験に供する。

4.4 試験容器、装置および器具

- ・試験容器：原則として容量 250～500 mL のガラス製三角フラスコ（通気性のあるシリコン栓などを装着）
- ・培養装置：温度、照明条件を一定に維持できる装置または部屋、振とう器
- ・生物量計測装置：粒子計数装置、粒子分布解析装置、顕微鏡（血球計算盤を使用）、蛍光光度計、分光光度計、比色計など
- ・観察装置：光学顕微鏡（100～400 倍での観察が可能なもの）
- ・水質測定装置：温度計、pH 計、光量子計など
- ・器具類：メスシリンダー、メスピペット、メンブレンフィルターユニットなど（器具類の材質は適切なものを選択する。）

なお、試験容器は、使用前に滅菌しておく。また、その他の器具類についても、必要に応じて適切な方法で滅菌しておく。

4.5 試験方法および条件

4.5.1 試料の前処理

試料は、第2部2.4項に示した前処理を除いて、できる限り前処理せずに試験に供することが望ましいが、藻類生長阻害試験では試料中の浮遊物質や他の藻類等による試験結果への影響を除外するため、フィルター（0.2~0.4 μm ）を用いたろ過滅菌が認められる。（なお、試料中の懸濁物が多い場合には、ろ過滅菌前に、孔径 0.7 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過してもよい）（第2部2.4参照）。

4.5.2 試験溶液の調製

1.3に従い、試験溶液は、試験濃度ごとに適当量の試料を4.3.1に示す培地と混合（試料を培地で希釈）して調製する。なお、試験濃度（試験溶液中の試料の濃度）は、無希釈の試料を100%とする。対照区の試験溶液には、培地を用いる。

試験濃度は、希釈倍率を公比2とする5濃度区を基本とする。80、40、20、10および5%の5濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含まれるように、濃度区を増減することも検討してよい。

また、対照区を含む各試験区の培地濃度を統一して試験しても良い。その場合は、試料をイオン交換水など（培地の調製に用いた水）で所定濃度になるように希釈し、そこに培地の20%濃度相当になるように培地中の栄養塩を添加する。

試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器（ビーカーまたは試薬瓶）を用意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合して、所定濃度に希釈する。調製した試験溶液は、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌してから、滅菌された試験容器に分注する。あるいは、試料を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌してから、同様にろ過滅菌した培地で希釈して各試験濃度区の試験溶液を調製してもよい。

試験容器に分注後、培養装置内（または恒温器や恒温室内）で静置して液温を試験温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整する。

4.5.3 試験条件

- ・ばく露方式：止水式、原則として振とう培養（100rpm）
- ・ばく露期間：72 時間
- ・繰り返し数：3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- ・初期生物量： 5×10^3 cells/mL が推奨される
- ・試験溶液量：原則として 100 mL/容器
- ・試験温度：21~24 $^{\circ}\text{C}$ の範囲内で設定し、培養装置内および試験期間中の変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内とする
- ・照明：白色または昼光色の蛍光灯光、24 時間明期、試験容器内の液面付近の光強度として 60~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

4.5.4 試験操作

前培養した供試藻類の生物量を測定し、試験溶液中の初期生物量が 5×10^3 cells/mL となる

1 ように、前培養液（藻類懸濁液）の所定量を温度が試験温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整された各試験容器
2 の試験溶液に添加する。各試験容器を培養装置内に置き、ばく露を開始する。なお、藻類
3 の接種は、無菌室やクリーンベンチ内などの無菌的条件下で行うことが望ましい。

4 ばく露開始から 24、48 および 72 時間後（ばく露終了時）に、各試験容器より試験溶液
5 を適量採取し、粒子計数装置などを用いて生物量を測定する。試験終了時には、光学顕微鏡
6 下で細胞の形態などを観察し、異常の有無を記録する。また、ばく露開始時および終了時
7 に、各試験区の試験溶液の pH を測定する。なお、培養装置内の温度および光強度を少なく
8 ともばく露開始時および終了時に測定することが望ましい。

10 4.5.5 水質の測定

11 すべての試験濃度区および対照区について、ばく露開始時およびばく露終了時に試験液
12 の pH を測定し、記録する。対照区の pH は 1.5 以上変動してはならない。各濃度区の測定
13 は、各繰り返し容器（通常 3）より分取し、混合したものを用いてよい。

15 4.5.6 試験の有効性

16 本試験は以下の条件を満たさなければならない。

- 17 ・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
- 18 ・対照区の毎日の生長速度の変動係数（平均値）がばく露期間を通じて 35%を超えない
19 こと
- 20 ・対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が 7%を超えないこと

22 4.6 結果の算出方法

23 4.6.1 生長速度の算出

24 対照区*および各濃度区について、ばく露開始時およびばく露中に測定した細胞濃度に基
25 づいて、次式より生長速度(μ)を算出する。4.6.2～4.6.4 では、通常、ばく露開始時からばく
26 露終了時（72 時間後）までのばく露期間を通じた生長速度を用いる。

$$27 \mu_{i-j} = (\ln N_j - \ln N_i) / (t_j - t_i)$$

28 ここで、

29 μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり(d^{-1})で示す。

30 N_i : t_i 時の生物量 (cells/mL)。ばく露開始時 (t_0) の生物量については設定値 (5×10^3
31 cells/mL) を用いる。

32 N_j : t_j 時の生物量 (cells/mL)

33 t_i : ばく露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

34 t_j : ばく露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

36 ※対照区については、1 日毎の生長速度を容器ごとに算出し、その変動係数がばく露期
37 間を通じて 35%を超えないことを確認する。

39 4.6.2 生長阻害率の算出

40 各濃度区・各容器について、対照区の生長速度の平均値(μ_c)と各濃度区の生長速度(μ_i)に基

づいて、次式により生長（速度）阻害率(I_{μ})を算出する。各濃度区の平均生長阻害率は、各容器の生長阻害率の平均ではなく、各濃度区における平均生長速度から次式により算出してもよい。

$$I_{\mu} = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \times 100$$

μ_c ：対照区の平均生長速度

μ_t ：各濃度区における（平均）生長速度

4.6.3 50%生長阻害濃度（EC₅₀）の算出

各濃度区の平均生長阻害率あるいは各容器の生長阻害率 I_{μ} の値を試料濃度の対数に対してプロットし、非線形回帰モデルなどを用いて 50%阻害濃度を求める。

4.6.4 最大無影響濃度（NOEC）

ばく露開始時からばく露終了時までの生長速度について、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度（LOEC）、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度（NOEC）とする（ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上の影響がみられること）。すべての試験濃度において対照区と有意差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度を NOEC とする。

なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、非線形回帰モデルを用いて推定した EC_x/IC_x（x%影響/阻害濃度）を算出してもよい⁽⁴⁾⁽⁷⁾（詳細は第4部を参照のこと）。

4.7 参考文献

- (1) OECD (2006), OECD Guideline for testing of chemicals 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- (2) 厚生労働省医薬食品局長，経済産業省製造産業局長，環境省総合環境政策局長（2011），新規化学物質等に係る試験の方法について，別添IV藻類生長阻害試験.
- (3) ISO (2004), International Standard 8693, Water quality — Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- (4) U.S. EPA (2002), WET Test Method 1003.0, Green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth test, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition, pp.197-230.
- (5) U.S. EPA (1996), Ecological effects test guidelines OPPTS 850.5400, Algal toxicity, Tier I and Tier II.
- (6) 松浦武, 国内排水規制に関わる WET 手法によるバイオアッセイへの取り組みと今後の展開, 第15回化学物質評価研究機構研究発表会-技術報告講演要旨集 p.43-46.
- (7) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.

第4部 試験結果のとりまとめ

1. 統計解析—最大無影響濃度 (NOEC) の算出

1.1 定義

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最も低い試験濃度を最小影響濃度 (LOEC)、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度 (NOEC) とする (ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上の影響がみられること)。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、最も高い試験濃度を NOEC とし、LOEC は推定しない。

1.2 一般的な解析手順の概要

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り行う。一般的な解析手順の概要は以下になる⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。なお、それぞれの検定における有意水準は 5% とし、片側検定を前提とする。

- ① 試験区間 (対照区を含む) の等分散性を検定する (Bartlett または Levene 検定)
- ② ①で等分散性が認められた場合、パラメトリック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検定する。
- ③ ②で有意差が認められた場合、Dunnett の多重比較検定により、対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を NOEC とする。②または多重比較検定で有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区以上とする。
- ④ ①等分散性が認められない場合は、データを変換 (比率データは Arcsine 変換、連続データは Log 変換など) して再度等分散性を検定する。等分散性が認められた場合は②を実施する。
- ⑤ ④で有意差が認められた場合、ノンパラメトリックによる Kruskal-Wallis の順位和検定により試験区間内に有意差があるか検定する。
- ⑥ ⑤で有意差が認められた場合、Steel の多重比較検定 (または Bonferroni 補正による Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検定)) により、対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を NOEC とする。④または多重比較検定で有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区以上とする。

以上の手順を基本として、米国環境保護庁 (U.S. EPA)⁽⁴⁾ やカナダ環境省 (Environment Canada)⁽⁵⁾ で用いられている解析手順、各生物・各エンドポイントのデータの性質を踏まえて、一部手順の省略、検定法の選択などを行った。次項に魚類、ミジンコ、藻類それぞれの解析手順を示す。

1.3 各試験法における解析手順

(1) 魚類試験

図 1 に魚類試験データのふ化率、ふ化後生存率、生存率および生存指標の解析手順を示した。これらのエンドポイントは、特に対照区において、分散が 0 (例: 4 つの繰り返し容

器すべて 100%を示す) となることが多く、データの正規性や等分散性を仮定することは適切ではないと考えられる。そこで初めから等分散性の検定を省略し⁽³⁾、ノンパラメトリック手法を選択する。さらに多重比較検定前に実施する ANOVA や Kruskal-Wallis の順位和検定は必ずしも必要ではないという考えが近年主流になりつつあり⁽²⁾⁽³⁾、U.S. EPA の解析手順からも省略されていることから⁽⁴⁾、これも省略した。

まず解析前に、影響値がすべて 0%の濃度区は除外してもよい⁽⁴⁾。多重比較検定は Steel の検定あるいは Bonferroni 補正による Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検定) を実施する。有意差検出力は Steel の検定の方が大きい。データ欠損により繰り返し数が試験区間内で異なってしまっても検定できるが、繰り返し数が 2 以下になった場合は、ダミーデータを入れて検定を実施する (ただし、NOEC/LOEC 近辺ではダミーデータの導入は避けるべきである)。U.S. EPA の試験法で提示されている Steel's Many-One Rank Test は Steel の検定を簡略化したものであり、繰り返し数がすべて等しいことが前提となっている。

5 濃度区、繰り返し数 4 で試験する魚類試験の場合、Steel の検定の特徴として、濃度区において 1 つでも対照区のデータより大きい数値があると有意差は検出されない。あるいは逆に、わずかな差でもすべて対照区より低ければ有意差がついてしまう。そのため、補足データとして、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett の検定などを実施する、あるいは非線形回帰分析により ECx/ICx を推定してもよい。これらの結果やデータのバラツキ、生物学的に有意であると考えられる差を考慮し、ノンパラメトリック手法の結果を採用するか判断する。

例: 40%濃度区において生存率 $60 \pm 45\%$ (平均 $\pm$ SD) であり、ノンパラメトリック手法では有意差がつかなかったが、パラメトリック手法では有意差がついた。Probit 法により推定した IC₁₀ は 27%濃度、IC₅₀ は 45%濃度であったことから、40%濃度区において生物学的に有意な影響があったと判断しても妥当であると考えられる。

(2) ミジンコ試験

図 2 にミジンコ試験データの親個体の死亡率および産仔数の解析手順をそれぞれ示した。親個体の死亡率は繰り返し数がないデータ (供試数 10 個体中の死亡数) として扱い、非線形回帰分析により LC₅₀ を推定する。

産仔数データは、解析前にまず、すべて 0 の濃度区を除外してよい。そして等分散性の検定を行うが、等分散性の検定後によく実施される ANOVA や Kruskal-Wallis の順位和検定は (1) 魚類試験と同様に省略する。等分散の場合はパラメトリックの Dunnett の多重比較検定を行う。濃度依存性のある (高濃度ほど値が増加あるいは減少する) データの場合、Canada では Dunnett の検定より検出力の高い Williams の検定が推奨されている⁽⁵⁾。ただし、試験区間で繰り返し数の異なるデータに対しては検出力が下がるため、OECD では、そのようなデータに対し使用するべきではないとされている⁽⁵⁾。

非等分散の場合はノンパラメトリックの Steel の検定あるいは Bonferroni 補正による Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検定) を実施する。魚類試験と同様に、結果の妥当性を検討するために、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett の検定などを実施する、あるいは非線形回帰分析により ECx/ICx を推定してもよい。

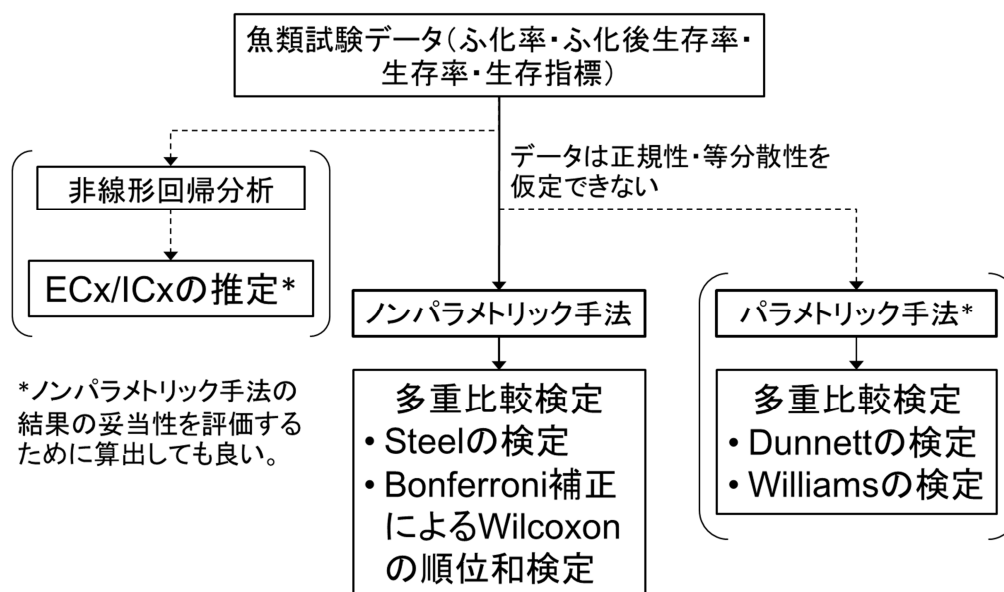


図 1 魚類試験データの解析手順

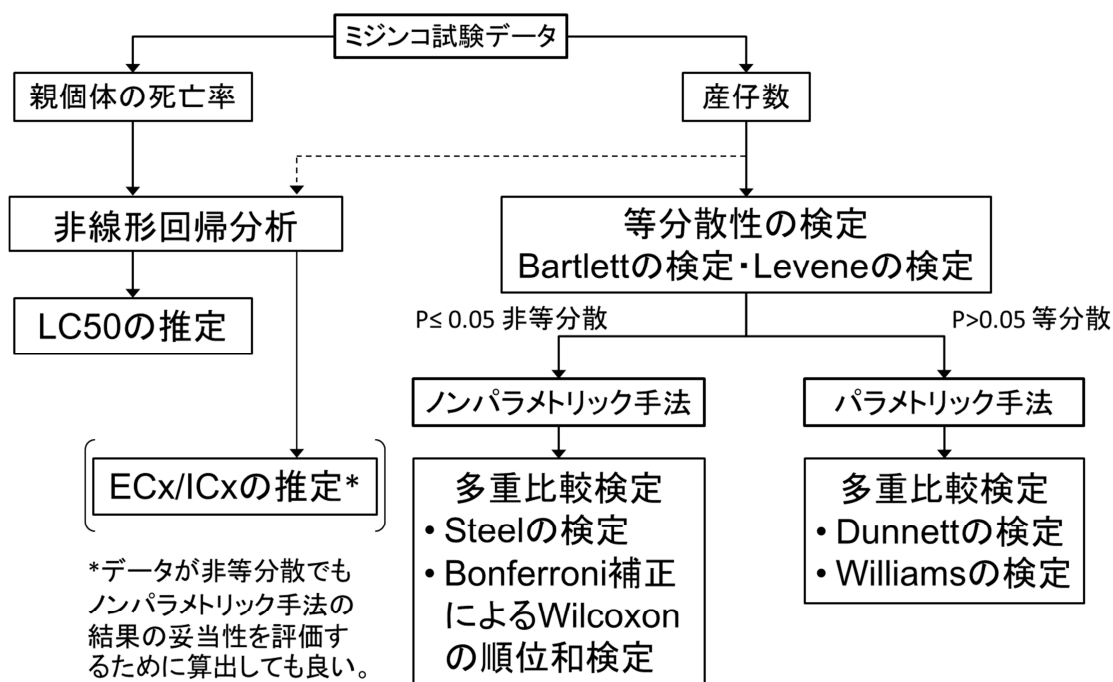


図 2 ミジンコ試験データの解析手順

(3) 藻類試験

図 3 に藻類試験データの生長速度の解析手順を示した。藻類試験においては化学物質審査規制法での試験法や OECD テストガイドラインと同様に、NOEC だけではなく、非線形回帰モデルにより EC50 も求めることが望ましい。NOEC の算出は、ミジンコ試験の産仔数データと同様に、等分散性の検定およびパラメトリックまたはノンパラメトリックの多重比較検定を行う。

繰り返し数が、対照区は 6、濃度区は 3 であるため、魚類試験と同様に、Steel の検定では数が 3 であるため、濃度区において 1 つでも対照区のデータより大きい数値があると有

意差は検出されない。あるいは逆に、わずかな差でもすべて対照区より低ければ有意差がついてしまう。そのため、補足データとして、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett の検定などを実施する、あるいは非線形回帰分析により ECx/ICx を推定してもよい。これらの結果やデータのばらつき、生物学的に有意であると考えられる差を考慮し、ノンパラメトリック手法の結果を採用するか判断する。

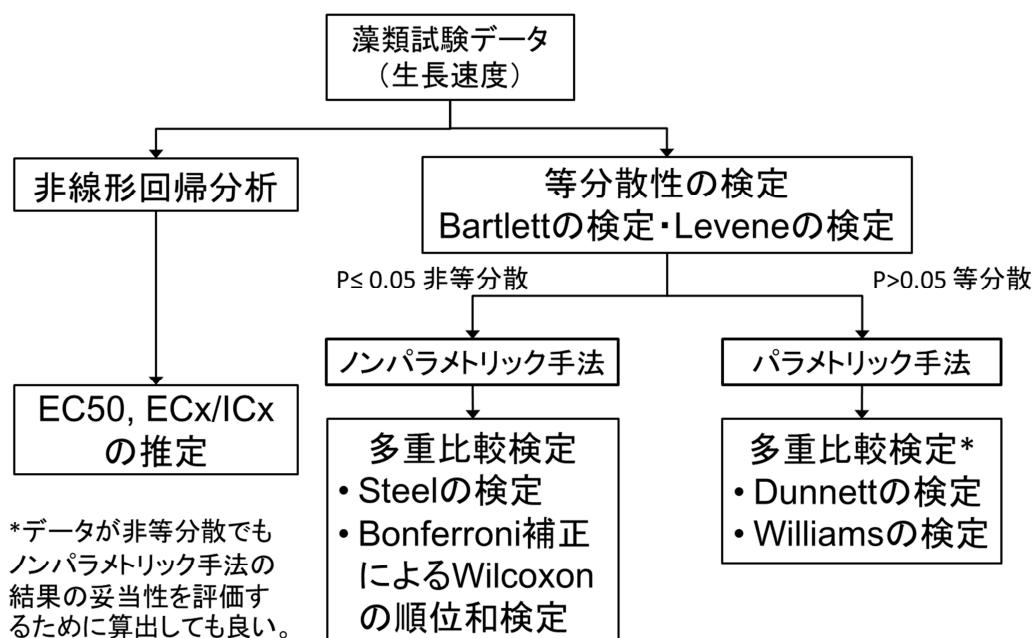


図3 藻類試験データの解析手順

1.4 ECx/ICx の算出

統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合（ノンパラメトリック検定において、設定濃度区数や繰り返し数などの制約から、対照区と試験濃度間の有意差を検出できない場合、統計学的な有意差より生物学的な影響値の差が重要だと考えられる場合など）、別途、非線形回帰モデルなどを用いて推定した ECx/ICx（x%影響/阻害濃度）を算出してもよい。

特に魚類試験の影響値は、データの質として正規性および等分散性が仮定できる場合が少なく、濃度に対する影響指標値の関係を表した濃度反応曲線を、非線形回帰モデル（Probit 法または Logit 法など）によって作成する方が適している。得られた濃度反応曲線より、対照区と比較して x%の影響または阻害を引き起こすと推定される濃度 ECx/ICx を推定するが、NOEC に相当する x%の適正值については、国際的な共通見解は得られていない。

1.5 参考文献

- (1) 永田靖・吉田道弘 (1997), 多重比較法の基礎、サイエンティスト社.
- (2) 小林克己 (2010), 毒性試験に用いる統計解析法の動向 2010、薬事日報社.
- (3) 日本毒性環境学会編 (2003) 生態影響試験ハンドブック; 吉岡義正, 6.2 LC50, EC50, LOEC, NOEC の算出, 有意差検定法, P.301-313.
- (4) U.S. EPA (2002) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and

- 1 receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition.
- 2 (5) Environment Canada (2005, 2007) Guidance Document on Statistical Methods for
- 3 Environment Toxicity Tests, EPS 1/RM/46.
- 4

2. 試験結果のとりまとめ

2.1 基本的な事項

試験結果をとりまとめ、基本的に以下に示す事項を記載した報告書を作成すること。

(1) 一般的な情報

- ・ 試験名
- ・ 試験目的
- ・ 試験内容（選択した試験法など）
- ・ 試験実施機関
- ・ 試験責任者および担当者
- ・ 試験期間

(2) 排水試料に関する情報

- ・ 採取地点
- ・ 採取日時
- ・ 採取に使用した器具・装置
- ・ 採取方法
- ・ 試料容器
- ・ 採取量
- ・ 採取時の記録（試料の性状、採取担当者など）
- ・ 試料の輸送方法
- ・ 試料の前処理（ろ過方法、pH 調整・エアレーションの有無など）
- ・ 試料の水質測定結果
- ・ 試料の保存方法

(3) 生物応答試験に関する情報

- 1) 試験生物（履歴、飼育・前培養方法、標準物質への感受性など）
- 2) 試験用水/培地（調整方法、水質など）
- 3) 試験方法および条件
 - ・ 試験機関が設定した試験条件（試験濃度、供試生物数、換水頻度、給餌方法など）
 - ・ 試験機関が設定した観察・水質測定項目
 - ・ 統計解析手法
- 4) 試験結果および考察※
- 5) 試験の有効性

※4) の試験結果および考察については、各試験において以下の項目をまとめる。

① 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

- ・ 各容器におけるふ化率
- ・ 試験終了時・各容器における生存率・ふ化後生存率・生存指標
- ・ 各濃度区における平均生存率、ふ化率、ふ化後生存率、生存指標および各標準偏差（SD）（およびそのグラフ）

- ・ NOEC/LOEC または ECx/ICx（各検定の判定結果、最小有意差など）
 - ・ 水質測定結果の概要（各濃度区における平均値あるいは最低～最高値など）
 - ・ 試験の結果に影響したと考えられる事項
 - ・ 結果の考察
- ②ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法
- ・ 試験終了時・各濃度区における平均死亡率
 - ・ 試験終了時・各濃度区における平均産仔数（および繁殖阻害率）±SD（およびそのグラフ）
 - ・ NOEC/LOEC または ECx/ICx（各検定の判定結果、最小有意差など）
 - ・ 水質測定結果の概要（各濃度区における平均値あるいは最低～最高値など）
 - ・ 試験の結果に影響したと考えられる事項
 - ・ 結果の考察
- ③淡水藻類を用いる生長阻害試験法
- ・ 各容器における生長速度および生長阻害率
 - ・ 各濃度区における平均細胞濃度、生長速度および生長阻害率±SD
 - ・ 各濃度区での生長曲線グラフ
 - ・ 濃度—生長阻害率曲線グラフ
 - ・ NOEC/LOEC または ECx/ICx（各検定の判定結果、有意差検出力など）
 - ・ EC₅₀（用いられた回帰モデル、算出方法）
 - ・ 試験開始時および終了時・各試験区における pH
 - ・ 試験の結果に影響したと考えられる事項
 - ・ 結果の考察

2.2 補足的な事項

必要に応じて以下の補足的な事項も報告書に記載する。

(1) 排水試料に関する情報

- ・ 事業場の概要（業種・主な使用化学物質）
- ・ 排水処理設備の概要（処理方法、一日排水量など）
- ・ 排水基準項目の自主測定結果
- ・ 排水口の位置（公共用水域との接続など）

(2) 生物応答試験に関する項目

①胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

- ・ 各観察時・各容器における累積死亡数（胚・仔魚別）
- ・ 各観察時・各容器における累積ふ化仔魚数（胚・仔魚別）
- ・ 各観察時・各容器における試験個体の観察結果
- ・ 各試験区における平均ふ化日数
- ・ ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- ・ QA/QC（Quality Assurance/Quality Control）およびそれに対する考察

②ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法

- ・ 試験個体の親世代の個別飼育状況

- 1 ・ 各観察時における各試験個体の累積死亡率
- 2 ・ 各観察時における各試験個体の産仔数
- 3 ・ 濃度-繁殖阻害率グラフ
- 4 ・ ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- 5 ・ 各観察時・各試験区における水質測定結果
- 6 ・ QA/QC およびそれに対する考察
- 7
- 8 ③淡水藻類を用いる生長阻害試験法
- 9 ・ 前培養状況
- 10 ・ 各観察時・各容器における細胞濃度
- 11 ・ 細胞観察結果
- 12 ・ 各観察時・各容器における水質測定結果（pH、温度など）
- 13 ・ ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- 14 ・ QA/QC およびそれに対する考察
- 15

第5部 試験結果の信頼性評価

1. 基本的な事項

試験を実施するに際し、試験結果の精度および信頼性の確保が必要である。試験結果の信頼性を確保するために、試験計画書（試験計画書とは、本検討案に沿った試験実施の目的及び採取計画、試験設計を明記した文書）等に規定された手順に従い試験を行い、その手順が遵守されているかを確認し、記録することが望ましい。また、排水の採取および試験実施時、生データを迅速かつ正確に記録し、確認することが望ましい。必要に応じ、試験施設が遵守すべき基本事項（試料の受け入れ体制、信頼性保証部門の設置等）を定めることにより試験結果の信頼性の向上を図るとよい。

2. 試験結果の信頼性にかかわる事項

試験結果に影響すると考えられる以下の事項に留意し、適切に管理すること。

- ① 試験容器、装置および器具
- ② 試験生物
- ③ 試験用水（対照区および希釈用）
- ④ 排水の採取と前処理方法
- ⑤ 試験条件
- ⑥ 供試生物の状態
- ⑦ 餌の質
- ⑧ 試験成立要件
- ⑨ 水質測定装置・器具
- ⑩ 繰り返し数と濃度区数の設定
- ⑪ 標準物質に対する感受性

3. 試験成立要件

胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験においては、対照区において、(1)ふ化率が80%以上であること、(2)ばく露終了時の生存率が70%以上であること、(3)溶存酸素がばく露期間を通して飽和酸素濃度の60%以上であること、の3条件が達成されたとき、試験結果は有効であるとみなせる。

ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験においては、対照区において、(1)親個体の死亡率が20%以下であること、(2)親個体の60%以上が最大8日間で3腹分の産仔をすること、(3)3腹分の合計産仔数が平均して15個体以上であること、(4)休眠卵の生産が確認されないこと、の4条件が達成されたとき、試験結果は有効であるとみなせる。

藻類を用いる生長阻害試験においては、対照区において、(1)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)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)繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えないこと、の3条件が達成されたとき、試験結果は有効であるとみなせる。

4. 標準物質を用いた感受性試験

以下に示す標準物質を用いて、定期的（1年に1～2回程度が推奨される）に試験生物の感

- 1 受性を確認することが推奨される。試験は常に同じ条件（試験物質、設定濃度、ばく露条件
2 など）で実施する。特に飼育系統を新しく立ち上げる場合には、試験前に感受性が以前と大
3 きく変動していないことを確認するべきである。許容変動範囲の目安として、各試験機関に
4 おいて NOEC または IC_x の記録を取り、NOEC の場合は平均値±1 濃度区、IC_x の場合は平均
5 値±2SD の範囲内に各データが収まっていることを確認する。
- 6 ・有機化合物：3,5-ジクロロフェノール（C₆H₄Cl₂O）、3,4-ジクロロアニリン（C₆H₅Cl₂N）
7 ・無機化合物：塩化ナトリウム（NaCl）、硫酸銅（CuSO₄）、重クロム酸カリウム（K₂Cr₂O₇）

(参考 3) 事業場排水実態調査結果

1. 調査対象

平成 21～26 年度にかけて、公募方式で選定した国内の事業場について、排水の生物応答試験を実施した。実施数は平成 23 年度を除く 5 年間で合計 39 事業場、59 排水サンプルであった。業種別内訳は表 1 に示すとおり。

表 1 調査対象事業場の業種内訳

業種名	産業分類 中分類番号 ^a	事業場数	サンプル数
食料品製造業	9	1	1
パルプ・紙・紙加工品製造業	14	1	1
化学工業	16	13	24
ゴム製品製造業	19	2	4
窯業・土石製品製造業	21	1	1
金属製品製造業	24	1	1
はん用機械器具製造業	25	3	4
電子部品・デバイス・電子回路製造業	28	2	3
電気機械器具製造業	29	6	6
輸送用機械器具製造業	31	2	2
電気業	33	1	4
下水道業	36	3	3
廃棄物処分業	88	3	5
合計	—	39	59

a 日本標準産業分類コード（第 12 回改定版）

2. 調査方法

調査は、基本的に「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（参考資料 2 参照）に記載された方法で行った。試験条件等の概要は表 2 に示すとおり。

表 2 事業場排水実態調査における試験条件等の概要

	胚・仔魚期の魚類を用いる 短期毒性試験	ニセネコゼミジンコを用いる ミジンコ繁殖試験	淡水藻類を用いる生長 阻害試験
供試生物	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) 受精後 4 時間未満の受精卵	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 24 時間齢未満の仔虫	ムレミカヅキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) 対数増殖期の細胞
試験期間	9 日間	最大 8 日間 ^b	72 時間
エンドポイント	ふ化率・ふ化後生存率・ 生存率・生存指標 ^a	生存率・産仔数	生長速度
対照区・希釈水	活性炭ろ過水道水等		OECD 藻類培地
試験濃度区	排水含有率 80, 40, 20, 10, 5%に希釈した 5 濃度区		
換水	最低週 3 回、 隔日又は中 2 日	週 3 回又は隔日	なし
試料量/容器	50 mL	15 mL	100 mL
生物数/容器	最低 10 個体、推奨 15 個体	1 個体	5,000 cells/mL
繰り返し数/濃度区	4 連	10 連	6 連（対照区） 4 連（濃度区）

a ばく露 5 日目の仔魚数/総胚体数×ばく露終了時の生存仔魚数/(胚体数－死亡・未ふ化数)：平成 24 年度より実施

b 対照区の 6 割以上が 3 回産仔した時点で終了

3. 試験結果

排水の最大無影響濃度 NOEC(%)を各排水サンプルの 3 種類の試験について測定した。NOEC(%)は排水の希釈濃度(%)で表し（無希釈の排水サンプルの希釈濃度は 100%）、その測定値から $TU=100/NOEC$ で求める指標 TU(Toxic Unit)を算出して、TU 値を「1.25 以下（無影響濃度が 80%以上）」から「40 より大（同 2.5%未満）」までの 7 つのランクに分けて試験結果を整理した。

試験の種類別に各ランクの比率を図 1 に、試験の種類と業種別に各ランクに該当する排水サンプル数を表 3 に示した。TU 値が 10 より大きい※（最大無影響濃度が 10%未満）ランク 5～7 に属する排水サンプルは、魚類と藻類の試験では全 59 サンプルの 10%、ミジンコの試験では同 37%であり、魚類と藻類に比べてミジンコへの影響が大きい結果となった。

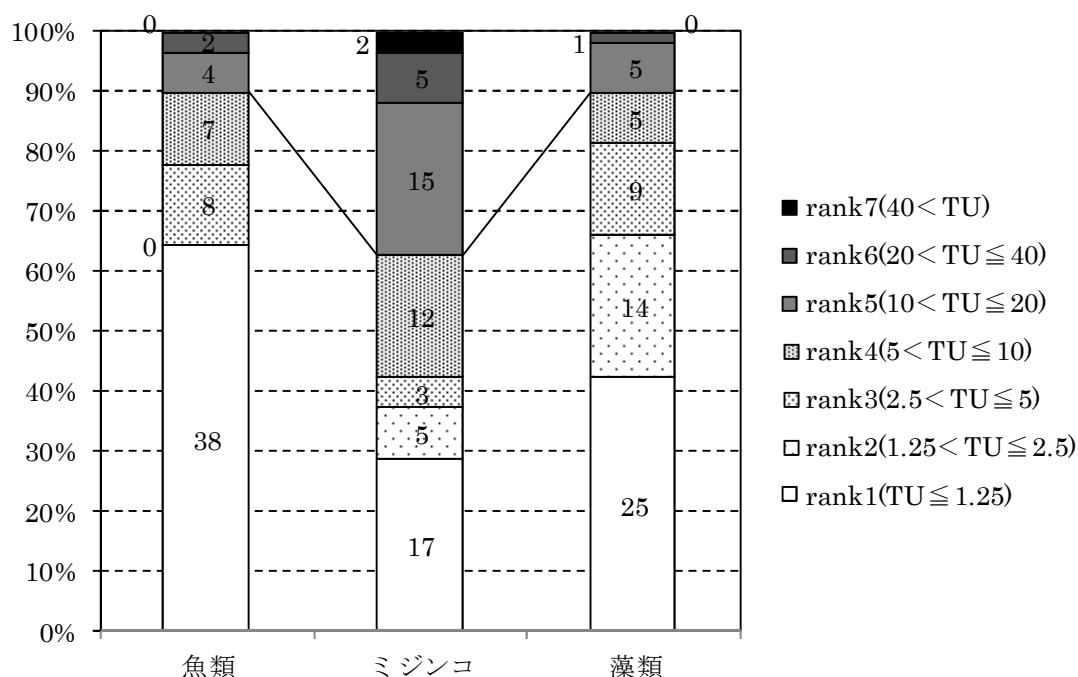


図 1 魚類・ミジンコ・藻類試験における TU 値のランクの比率
(図中の数字は各ランクに該当する排水サンプル数を示す。)

※現行の排水規制では、排水の水質は、公共用水域に排出されると、そこを流れる河川水等により、排水口から合理的な距離を経た公共用水域において、通常少なくとも 10 倍程度に希釈されると想定されることに基づき、排水基準は環境基準の 10 倍値に設定されている。この排水基準の設定の考え方を踏まえ、排水に対する 3 種類の生物応答試験結果のいずれかにおいて、排水の毒性を無影響にするために必要な希釈倍率が 10 倍を超過する場合（最大無影響濃度が 10%未満の場合）、すなわち、TU が 10 を超過する場合（ランク 5～7 の場合）、その排水について、改善の必要があると評価することが想定される。

表3 各ランクに該当する排水サンプル数の分布

試験の種類	魚類							ミジンコ							藻類						
TU 値のランク ^a	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
食料品製造業	1							1							1						
パルプ・紙・紙 加工品製造業	1											1			1						
化学工業	10		5	3	4	2		7	2	3	4	6	1	1	12	5	5		2		
ゴム製品製造業	4							2	1				1		1	2	1				
窯業・土石製品 製造業	1							1							1						
金属製品製造業	1												1					1			
はん用機械器具 製造業	4							3					1		1	3					
電子部品・デバ イス・電子回路 製造業	2		1							1	2				1	2					
電気機械器具製 造業	5			1				1		3	2				3	1		1		1	
輸送用機械器具 製造業	2											1	1				1	1			
電気業			1	3						2	2					2	1	1			
下水道業	2		1					1	1			1			3						
廃棄物処分業	5							3		1			1		3	1	1				
合計	38	0	8	7	4	2	0	17	5	3	12	15	5	2	25	14	9	5	5	1	0

- a ランク1 $TU \leq 1.25$
2 $1.25 < TU \leq 2.5$
3 $2.5 < TU \leq 5$
4 $5 < TU \leq 10$
5 $10 < TU \leq 20$
6 $20 < TU \leq 40$
7 $40 < TU$

(参考4)化学物質排出把握管理促進法による第1種指定化学物質の公共用水域への排出状況

事業者による化学物質の自主的な管理の改善を促進し、環境の保全上の支障を未然に防止することを目的とした化学物質排出把握管理促進法が制定されており、この法律により、事業者が対象化学物質を排出・移動した際にその量を把握し、国に届け出る PRTR 制度が設けられている。対象となる第1種指定化学物質は、平成20年11月21日の政令改正により、354物質から462物質に拡充されている。本制度による排出量・移動量の届出結果を用いて、生態毒性を有する化学物質の公共用水域への排出状況を整理した。なお、集計対象は以下の通りである。

(ア) 対象とした届出結果

平成24年度排出量・移動量の届出結果

(イ) 対象とした化学物質

第1種指定化学物質462物質

下記の資料^{*1}により、462物質に対して以下のとおり生態毒性クラスを付与

クラス1：214物質、クラス2：117物質、クラス外：131物質

(ウ) 対象とした事業場

公共用水域に第1種指定化学物質を排出している1,694事業場^{*2}

^{*1} 薬事・食品衛生審議会薬事分科会化学物質安全対策部会 PRTR 対象物質調査会、化学物質審議会管理部会、中央環境審議会環境保健部会 PRTR 対象物質等専門委員会合同会合（第4回）（平成20年6月18日）

・参考資料1 現行化管法対象物質の有害性・暴露情報

・参考資料2 追加候補物質の有害性・暴露情報

^{*2} 下水道業、一般廃棄物処理業、産業廃棄物処分業（特別管理産業廃棄物処分業を含む。）（以下「下水道業等」という。）の事業場は、処理する廃液又は廃棄物中の物質が事前に特定できないことから、PRTR 制度上、「特別要件施設」として、排水規制の対象物質について濃度の実測値から算出した排出量を届け出ることになっている。しかし、排水中の対象物質濃度が検出下限値以上、定量下限値未満の場合、定量下限値の2分の1の値に排水量を乗じて排出量を算定することとされているため、排出量が過大に算定されている可能性がある。このため、下水道業等の事業場は本集計対象から除外した。

(1) 事業場が排出している物質数

平成24年度排出量・移動量の届出結果において、公共用水域に第1種指定化学物質を排出している1,694事業場のうち、生態毒性クラス1又はクラス2に該当する化学物質を排出している事業場は1,290事業場（約76%）であった（表1）。このうちクラス1に該当する化学物質を排出している事業場は1,098事業場であった。実際に排出されているのは、クラス1の214物質中76物質、クラス2の117物質中71物質、クラス1、2をあわせると331物質中44%の147物質であった。排出量はクラス1で709トン/年、クラス2で576トン/年、合計1,285トン/年であり、第1種指定化学物質全体の排出量（3,395トン/年）の約38%を占めた。排出されている具体的な化学物質名と排出量、主な用途等を表2a,b,cに示した。

また、1つの事業場から排出される第1種指定化学物質の数に関する事業場数の分布を図1aに示した。1物質のみ排出している事業場数が852事業場で全体の約50%を占め、複数物

質の排出については、最高で 33 物質排出している事業場が 1 事業場あった。

生態毒性クラス 1 又は 2 に該当する化学物質を排出する 1,290 事業場について、同様に 1 つの事業場から排出される生態毒性クラス 1 又は 2 の物質数に関する事業場数の分布を図 1b に示した。1 物質のみ排出している事業場数が 657 事業場で全体の約 51%を占め、複数物質の排出については、最高で 23 物質排出している事業場が 1 事業場あった。

(2) 複数物質を排出している業種

平成 24 年度排出量・移動量の届出結果をもとに、1 つの事業場から排出される物質数ごとの事業場数を業種別に集計して表 3a,b に示した。また、公共用水域への排出量を 6 つのランクに分類し、それぞれの排出ランクに該当する事業場数を集計して表 4a,b に示した。集計は排出先の水域別（海域以外の水域・海域）に行った。

生態毒性クラス 1 又は 2 に該当する化学物質を排出している 1,290 事業場の内訳（表 3b）は、海域以外への排出事業場については、金属製品製造業が 201 事業場（排出される化学物質の種類は 1～7 物質）、化学工業が 173 事業場（同 1～22 物質）、電気機械器具製造業が 116 事業場（同 1～7 物質）の順となっている。海域については、化学工業 167 事業場（同 1～19 物質）、金属製品製造業 46 事業場（同 1～8 物質）、鉄鋼業 37 事業場（同 1～7 物質）の順となっている。また、公共用水域に 1 トン以上排出している事業場の内訳（表 4b）は、海域以外については、化学工業が 19 事業場、繊維工業とパルプ・紙・紙加工品製造業が 12 事業場、海域については、化学工業が 44 事業場、鉄鋼業が 16 事業場、石油製品・石炭製品製造業が 10 事業場の順となっている。

表 1 第 1 種指定化学物質の公共用水域への排出状況（平成 24 年度）

化学物質	排出 事業場数	排出 物質数	排出量 (トン/年)	排出量比率 (%)
生態毒性クラス 1 (214 物質)	1,098*	76	709	21
生態毒性クラス 2 (117 物質)	488*	71	576	17
クラス外 (131 物質)	900*	65	2,110	62
合計 (462 物質)	1,694	212	3,395	100

* 延べ数のため合計値は 1,694 にならない。生態毒性クラス 1 又は 2 のいずれかを使用している事業場数は 1,290、クラス外の物質だけを使用している事業場数は 404 である。

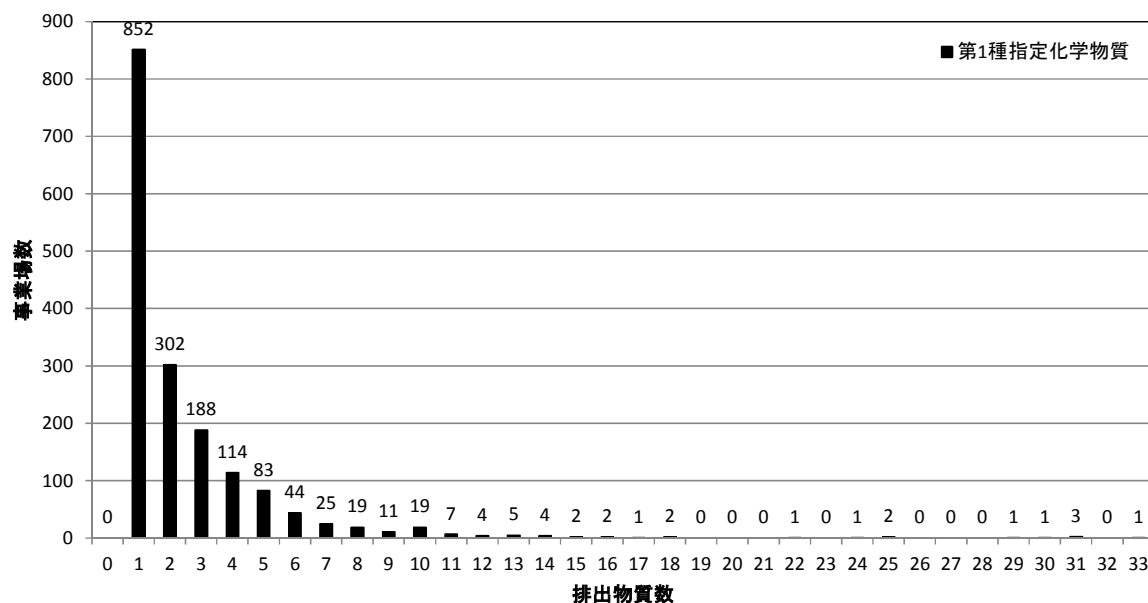


図 1a 公共用水域への排出物質数別事業場数
(第 1 種指定化学物質、平成 24 年度、下水道業等を除く)

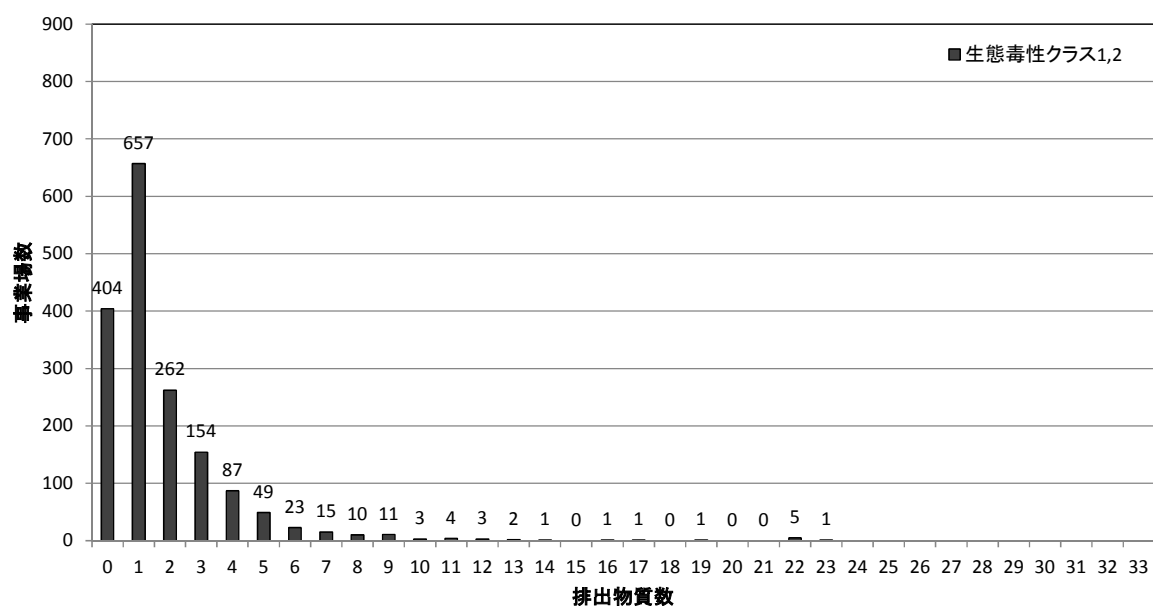


図 1b 公共用水域への排出物質数別事業場数
(生態毒性クラス 1 又は 2 該当物質、平成 24 年度、下水道業等を除く)

表 2a 第 1 種指定化学物質の公共用水域への排出量（生態毒性クラス 1）
（平成 24 年度、下水道業等を除く）

物質番号	物質名	公共用水域への排出量（kg/年）	主な使用用途
412	マンガン及びその化合物	217,168	特殊鋼、電池、磁性材料、脱酸素剤、酸化剤
1	亜鉛の水溶性化合物	130,117	金属表面処理、乾電池、殺菌剤
407	ポリ(オキシエチレン)＝アルキルエーテル(アルキル基の炭素数が12から15までのもの及びその混合物に限る。)	99,899	界面活性剤(乳化剤、可溶化剤、分散剤(洗浄剤、農業、切削油、工業用エマルジョン、インキ、化粧品、医薬品))
309	ニッケル化合物	65,232	顔料、メッキ、電池
272	銅水溶性塩(錯塩を除く。)	40,920	メッキ、電池、顔料、触媒、皮なめし、農業、殺菌剤
210	2,2－ジブromo－2－シアノアセトアミド(別 名DBNPA)	22,975	殺菌剤、防菌剤、防かび剤、防藻剤
410	ポリ(オキシエチレン)＝ノニルフェニルエーテル	19,891	界面活性剤(乳化剤、可溶化剤、分散剤(洗浄剤、農業、切削油、工業用エマルジョン、インキ、化粧品、医薬品))
389	ヘキサデシルトリメチルアンモニウム＝ク ロリド	19,620	帯電防止剤(繊維用)、柔軟剤(繊維用)、化粧品、消毒剤、試薬
4	アクリル酸及びその水溶性塩	12,449	合成樹脂原料(高吸水性樹脂、増粘剤、凝集剤)、加工剤(繊維改質)
342	ピリジン	9,555	合成原料(医薬品(スルホンアミド剤、抗ヒスタミン剤)、界面活性剤、加硫促進剤、農業)、アルコールの変性剤
87	クロム及び3価クロム化合物	8,511	ステンレス鋼、メッキ、スーパーアロイ(超硬合金)、顔料、皮なめし剤
333	ヒドラジン	8,077	清缶剤、合成原料(農業)、水処理剤、ロケット燃料、還元剤
18	アニリン	6,560	合成原料(染料、媒染料、ゴム薬品、火薬、ハイドロキノ、医薬品、ウレタン樹脂原料)
80	キシレン	6,160	合成原料(テレフタル酸、染料、有機顔料、香料、可塑剤、医薬品)、ガソリン・灯油成分、溶剤(塗料、農業)
144	無機シアン化合物(錯塩及びシアン酸塩を除く。)	3,843	メッキ助剤、写真材料
336	ヒドロキノ	3,158	写真用材料(現像薬)、安定剤(重合防止剤)、合成原料(メー、染料)
348	フェニレンジアミン	3,149	合成原料(農業、医薬、ゴム薬、顔料)
305	鉛化合物	3,035	バッテリー、光学ガラス、顔料、塩化ビニル樹脂安定剤
242	セレン及びその化合物	2,972	ガラス着色剤、整流器、光電セル
188	N,N－ジシクロヘキシルアミン	2,929	合成原料（防錆剤、ゴム薬品、界面活性剤、染料）
48	O－エチル＝O－4－ニトロフェニル＝フェニルホスホノチオアート(別名EPN)	2,470	農業(殺虫剤)
28	アリールアルコール	2,430	合成原料(エポキシロドリン、香料、難燃剤、医薬品、ジアリルフタレート樹脂)
125	クロロベンゼン	2,366	合成原料(染料、香料、医薬品、農業)
10	アクロレイン	2,121	合成原料(医薬品、アリールアルコール、グリセリン、架橋剤)、合成樹脂原料(アクリルフォーム)
276	3,6,9－トリアザウンデカン－1,11－ジアミン(別名テトラエチレンペンタミン)	1,854	硬化剤(エポキシ樹脂)、紙力増強剤、キレート剤、潤滑油添加剤、アスファルト添加剤、界面活性剤
88	6価クロム化合物	1,745	メッキ、顔料、触媒、金属表面処理剤
224	N,N－ジメチルドデシルアミン＝N－オキシド	1,340	洗浄剤(シャンプー、台所用洗剤)
75	ガドミウム及びその化合物	906	顔料、電池、合金
181	ジクロロベンゼン	896	合成原料(染料、顔料、農業、医薬品)、溶剤、洗浄剤(グリース用)、その他(消毒剤、伝導熱媒体)
7	アクリル酸ノルマル－ブチル	769	合成樹脂原料(アクリル樹脂)、合成原料（接着剤、乳化剤、合成樹脂改質剤）
82	銀及びその水溶性化合物	632	写真材料、電池、電気接点、銀ロウ
352	フタル酸ジアリル	560	架橋剤(不飽和ポリエステル樹脂)、可塑剤(塩化ビニル樹脂用)、合成樹脂原料(ジアリルフタレート樹脂)
147	N,N－ジエチルチオカルバミン酸S－4－クロロベンジル(別名チオベンカルブ又はベンチオカーブ)	511	農業(除草剤)
375	2－ブテナール	474	合成原料（ブタノール、医薬品）
200	ジニトロトルエン	420	合成原料(2,4-トルエンジアミン、染料、火薬)
386	プロモetan(別名臭化メチル)	370	合成原料、その他(食品・土壌くん蒸剤)
302	ナフタレン	349	合成原料（染料、顔料、燐素、滅菌剤、燃料） 、合成樹脂原料
325	ビス(8－キノリノラト)銅(別名オキシシン銅又は有機銅)	290	農業(殺菌剤)
207	2,6－ジ－ターシャリー－ブチル－4－クレゾール(別名BHT)	241	酸化防止剤(樹脂、食品)、老化防止剤(ゴム用)
355	フタル酸ビス(2－エチルヘキシル)	182	可塑剤
11	アジ化ナトリウム	180	試薬(SCN、S2O3等の検出用)
24	メターアミノフェノール	180	合成原料(染料、医薬品、農業、アラミド繊維原料)、染毛剤
461	りん酸トリフェニル	178	可塑剤・難燃剤・安定剤(合成樹脂、合成ゴム)
268	テトラメチルチウラムジスルフィド(別名チウラム又はチラム)	155	農業(殺虫剤)、加硫促進剤(チウラム系)
354	フタル酸ジ－ノルマル－ブチル	132	可塑剤
85	グルタルアルデヒド	127	架橋剤、試薬、殺ウイルス剤
262	テトラクロロエチレン	100	溶剤(ドライクリーニング、医薬品、香料、塗料)、洗浄剤(原毛用)、合成原料(代替フロン)
109	オルト－クロトルエン	85	合成原料(染料、農業、医薬品)
5	アクリル酸2－(ジメチルアミノ)エチル	84	合成樹脂原料(凝集剤、エマルジョン改質剤、繊維処理剤、粘着剤、接着剤)
113	2－クロロ－4,6－ビス(エチルアミノ)－1,3,5－トリアジン(別名シマジン又はCAT)	77	農業(除草剤)
457	りん酸ジメチル＝2,2－ジクロロビニル(別名ジクロロボス又はDDVP)	74	農業(殺虫剤)
330	ビス(1－メチル－1－フェニルエチル)＝ペルオキシド	57	重合開始剤（合成樹脂）、架橋剤(合成ゴム)
89	クロロアニリン	52	合成原料(医薬・農業中間体)、架橋剤(樹脂用)
239	有機スズ化合物	52	殺菌剤
179	1,3－ジクロロプロペン(別名D－D)	42	農業(殺虫剤)
149	四塩化炭素	38	合成原料(ホスゲン、農業(殺虫剤))、溶剤
237	水銀及びその化合物	31	蛍光灯、温度計、アマルガム、触媒
201	2,4－ジニトロフェノール	29	合成原料(黒色硫化染料)、試薬、防菌剤
257	デシルアルコール(別名デカノール)	23	農業（除草剤）、可塑剤(塩化ビニル樹脂)、潤滑剤、合成原料（界面活性剤、香料）
406	ポリ塩化ビフェニル(別名PCB)	17	熱媒体、コンデンサー油
219	ジメチルジスルフィド	15	香料、合成原料、硫化剤
98	クロロ酢酸	13	合成原料(マロン酸、アミノ酸、香料、医薬品、除草剤、可塑剤)
169	3－(3,4－ジクロロフェニル)－1,1－ジメチル尿素(別名ジウロン又はDCMU)	11	農業(除草剤)
294	2,4,6－トリブromフェノール	6	難燃剤(プラスチック、繊維)
452	2－メルカプトベンゾチアゾール	6	加硫促進剤（ゴム薬品）
6	アクリル酸2－ヒドロキシエチル	4	合成樹脂原料（アクリル樹脂）、合成原料（接着剤、乳化剤、合成樹脂改質剤）
148	N,N－ジエチル－3－(2,4,6－トリメチルフェニルスルホニル)－1H－1,2,4－トリアゾール－1－カルボキサミド(別名カフェンストール)	4	農業(除草剤)
299	トリイジン	3	合成原料(エポキシ樹脂硬化剤、染料等)、溶剤
298	トリレンジイソシアネート	2	合成樹脂原料(ポリウレタン樹脂)
378	N,N'－プロピレンビス(ジチオカルバミン酸)と亜鉛の重合体(別名プロビネブ)	2	農業(殺菌剤)
427	N－メチルカルバミン酸1－ナフチル(別名カルバリル又はNAC)	2	農業(殺虫剤)
23	パラ－アミノフェノール	1	合成原料（医薬品、染料）、老化防止剤(ゴム用)、染料、写真現像薬
3,7,9,13－テトラメチル－5,11－ジオキサー－2,8,14－トリチア			
267	4,7,9,12－テトラアザウンタデカ－3,12－ジエン－6,10－ジオン(別名チオジカルブ)	1	農業（殺虫剤）
320	ノニルフェノール	1	合成原料(界面活性剤)、安定剤(エチルセルロース)、加硫促進剤、ゴム助剤
345	フェニルヒドラジン	1	合成原料（医薬品、農業、染料）
394	ベリウム及びその化合物	1	電子機器用バネ材、X線管、安全工具
合計	生態毒性クラス1の物質の排出量	708,932	
	第1種指定化学物質の公共用水域への総排出量に占める生態毒性ラ	21%	
	ンク1の物質の割合		

表 2b 第 1 種指定化学物質の公共用水域への排出量（生態毒性クラス 2）
（平成 24 年度、下水道業等を除く）

物質番号	物質名	公共用水域への排出量 (kg/年)	主な使用用途
245	チオ尿素	151,479	医薬品原料(チオウラシル、メチオニン等)、農薬(発芽ホルモン)、加工剤(繊維・紙・樹脂用)
318	二硫化炭素	113,450	溶剤(ビスコース人絹、セロハン)、合成原料(農薬、医薬品)、加硫促進剤、その他(浮遊選鉱剤、ゴム製造用添加剤)
12	アセトアルデヒド	51,200	合成原料(酢酸、過酢酸、無水酢酸、酢酸エチル)、農薬(防かび剤)、香料、還元剤、防腐剤
300	トルエン	37,290	合成原料(合成繊維、染料、火薬(TNT)、香料、有機顔料、可塑剤、ガソリン成分、溶剤(塗料、インキ))
411	ホルムアルデヒド	33,334	合成樹脂原料(フェノール系、尿素系、メラミン系合成樹脂、ポリアセタール樹脂)、バラホルムアルデヒド、繊維処理剤、その他(消毒剤、一般防腐剤)
20	2-アミノエタノール	31,410	添加剤(洗剤、界面活性剤、化粧品、潤滑油)、溶剤、洗浄剤(半導体用)、繊維柔軟剤
127	クロロホルム	30,123	合成原料(代替フロ、フッ素樹脂)、医薬品(麻酔剤、消毒剤、血液防腐剤)、溶剤(ゴム・メチルセルロース用)
277	トリエチルアミン	22,330	合成原料(医薬品、染料、ゴム薬品、界面活性剤、硬化剤)
275	ドデシル硫酸ナトリウム	14,359	界面活性剤(洗浄剤、乳化剤、合成洗剤基剤)
321	バナジウム化合物	12,981	触媒、特殊鋼、合成原料(バナジウム化合物)
59	エチレンジアミン	12,873	加工剤(繊維防しむ剤、紙の湿潤強化剤)、界面活性剤、キレート剤、合成樹脂原料(エポキシ樹脂硬化剤)
349	フェノール	7,698	合成樹脂原料(フェノール樹脂)、合成原料(ピクリン酸、アニリン、ビスフェノール-A、農薬、可塑剤、染料)、消毒剤、歯科用局所麻酔
409	ポリ(オキシエチレン) = ドデシルエーテル 硫酸エステルナトリウム	7,549	洗剤の基剤
9	アクリロニトリル	6,621	合成樹脂原料(アクリル系合成繊維、合成ゴム、ABS樹脂、AS樹脂)
332	砒素及びその無機化合物	4,822	殺虫剤、半導体、木材防腐・防蟻剤
439	3-メチルピリジン	4,326	合成原料(医薬品、農薬、ゴム薬品、界面活性剤)、溶剤
86	クレゾール	4,221	合成樹脂原料(半導体封止材料、ワニス)、合成原料(染料、農薬、可塑剤)、消毒剤
278	トリエチレンジアミン	4,213	合成原料(潤滑強化剤、潤滑油添加剤、キレート剤、界面活性剤)
134	酢酸ビニル	3,692	合成樹脂原料(ポリ酢酸ビニル、酢酸ビニル共重合樹脂、ポリビニルアルコール)
408	ポリ(オキシエチレン)=オクチルフェニルエーテル	3,452	界面活性剤(乳化剤、可溶化剤、分散剤(洗浄剤、農薬、切削油、工業用エマルジョン、インキ、化粧品、医薬品))
400	ベンゼン	3,188	合成原料(スチレン、フェノール、無水マレイン酸、染料、有機顔料、合成洗剤、医薬品、香料、合成繊維、農薬、可塑剤、防腐剤(PCP)、防虫剤)、溶剤、ガソリン成分
240	スチレン	3,146	合成樹脂原料(ポリスチレン樹脂、合成ゴム、AS樹脂、ABS樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、イオン交換樹脂)
419	メタクリル酸ノルマル-ブチル	1,605	合成樹脂原料(樹脂)、金属表面処理剤、加工剤(繊維処理剤、紙加工剤)、可塑剤(塗料内部可塑剤)、潤滑油添加剤
53	エチルベンゼン	1,594	合成原料(スチレン)、溶剤
338	2-ビニルピリジン	1,000	合成原料(タイヤコード接着剤、殺虫剤、殺菌剤)
60	エチレンジアミン四酢酸	931	加工剤(染色助剤、繊維処理助剤、金属表面処理剤)、安定剤(塩化ビニル樹脂用)、重合開始剤(合成ゴム)、食品添加剤、化粧品添加剤
343	ピロカテコール(別名カテコール)	660	合成原料(医薬品、香料)、加硫剤、重合防止剤、その他(酸化抑制剤)
186	ジクロロメタン(別名塩化メチレン)	623	洗浄剤(金属脱脂)、溶剤(重合用)、エアゾール噴射剤、インキ成分、ペイント剥離剤
296	1,2,4-トリメチルベンゼン	579	溶剤、合成原料(染料、顔料、医薬品、工業薬品)
71	塩化第二鉄	532	金属板腐食液、汚水浄化沈殿剤、写真製版、触媒
8	アクリル酸メチル	510	合成樹脂原料(アクリル繊維、塗料、接着剤、アクリルゴム、合成皮革)
205	1,3-ジフェニルグアニジン	430	加硫促進剤(ゴム用)
281	トリクロロエチレン	392	溶剤(染料、生ゴム、硫黄、ピッチ、塗料)、洗浄剤(脱脂、原毛用)、合成原料(代替フロ)、農薬(殺虫剤)
123	3-クロロプロペン(別名塩化アリル)	374	合成原料(アリル誘導体化合物、香料、農薬、医薬品)
99	クロロ酢酸エチル	340	合成原料(医薬品、香料、農薬、接着剤、界面活性剤)
393	ベタナフトール	340	合成原料(医薬品、α-ナフトールスルホン酸、選鉱剤)
79	2,6-キシレノール	240	合成樹脂原料(エンジニアリングプラスチック)、合成原料(防かび剤、抗酸化剤)
3	アクリル酸エチル	212	合成樹脂原料(アクリル繊維、塗料、接着剤、アクリルゴム、合成皮革)
37	4,4'-イソプロピリデンジフェノール(別名ビスフェノールA)	209	合成樹脂原料(エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリスルホン)、安定剤(塩化ビニル用)、酸化防止剤
297	1,3,5-トリメチルベンゼン	158	合成原料(染料、紫外線安定剤、医薬品)、ガソリン成分、溶剤
178	1,2-ジクロロプロパン	147	農薬(殺虫剤)、溶剤(合成樹脂用)、くん蒸剤
110	パラ-クロロトルエン	90	合成原料(染料、農薬、医薬品)
202	ジビニルベンゼン	83	架橋剤(不飽和ポリエステル樹脂、スチレン系樹脂)
418	メタクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチル	82	合成樹脂原料(塗料、イオン交換樹脂)、繊維処理剤、加工剤(紙)、安定剤(ゴム)、潤滑油添加剤
26	3-アミノ-1-プロペン	79	合成原料(農薬)、高分子化合物の改良剤、触媒、染料固着剤
313	ニトログリセリン	71	タイナミットの基材、無煙火薬の主剤、医薬品
310	ニトロ三酢酸	70	キレート化剤
440	1-メチル-1-フェニルエチル=ヒドロペルオキシド	58	連鎖移動剤
256	デカン酸	46	合成原料
403	ベンゾフェノン	43	合成原料(医薬品、殺虫剤)、紫外線吸収剤
83	クメン	37	合成原料(フェノール、アセトン、酸化剤)、ガソリン添加剤
73	1-オクタノール	35	溶剤(香料、化粧品、有機合成反応)、合成原料(可塑剤、安定剤、界面活性剤、合成樹脂)
273	1-ドデカノール(別名ノルマルドデシルアルコール)	34	合成原料
315	オルト-ニトロトルエン	33	合成原料(染料)
416	メタクリル酸2-エチルヘキシル	33	合成樹脂原料(塗料、被覆材料)、加工剤(繊維処理剤)、接着剤、その他(潤滑油添加剤、歯科材料、分散剤、内部可塑剤)
399	ベンズアルデヒド	28	合成原料(安息香酸、香料、医薬品、染料)、加工剤(合成繊維助剤)
398	ベンジル=クロリド(別名塩化ベンジル)	16	合成原料(キノリンレッド、アリザリンエロ-A:染料、合成樹脂、香料、ピロガロール、イソキノリン、ガソリン重合物生成防止剤)
16	2,2'-アジビスイソブチロニトリル	11	重合開始剤、加工剤(ゴム、合成樹脂の発泡剤)
421	4-メチリデンオキセタン-2-オン(別名ジクテン)	10	合成原料(医薬品、染料、殺菌剤、防腐剤、樹脂安定剤)、農薬
319	1-ノナノール(別名ノルマル-ノニルアルコール)	8	合成原料(可塑剤、香料、界面活性剤)
334	4-ヒドロキシ安息香酸メチル	7	防腐剤(化粧品、医薬品)
81	キノリン	6	農薬、医薬品、界面活性剤、防錆剤(消錆剤用)
462	りん酸トリ-ノルマル-ブチル	6	触媒、安定剤(樹脂、繊維)、可塑剤、潤滑油添加剤、レザー用消泡剤
458	りん酸トリス(2-エチルヘキシル)	5	可塑剤(合成ゴム、塩化ビニル樹脂)、溶剤
292	トリブチルアミン	4	合成原料(界面活性剤、ゴム薬品、染料、医薬品、農薬)、触媒、高分子化合物改質剤
438	メチルナフタレン	4	合成原料(染料、熱媒油)、溶剤(農薬分散用)
366	ターシャリーブチル=ヒドロペルオキシド	2	重合開始剤、硬化剤(不飽和ポリエステル、メラミン)、乾燥剤(ワニス、ペイント)
368	4-ターシャリーブチルフェノール	2	合成樹脂原料(油溶性フェノール樹脂)、合成樹脂改質剤、合成原料(香料、界面活性剤)
373	2-ターシャリーブチル-5-メチルフェノール	2	合成原料(酸化防止剤、香料)
117	(RS)-1-パラ-クロロフェニル-4,4-ジメチル-3-(1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)メチルベンタン-3-オール(別名デブコナゾール)	1	農薬(殺菌剤)
301	トルエンジアミン	1	合成樹脂原料(ポリウレタン樹脂)、合成原料(染料)
合計	生態毒性クラス 2 の物質の排出量	575,537	
	第 1 種指定化学物質の公共用水域への総排出量に占める生態毒性ランク 2 の物質の割合	17%	

表 2c 第 1 種指定化学物質の公共用水域への排出量（生態毒性クラス 1 又は 2 以外）
（平成 24 年度、下水道業等を除く）

物質番号	物質名	公共用水域への排出量 (kg/年)	主な使用用途
405	ほう素化合物	773,301	電機・電子工業(液晶パネル、ドレーピング剤)、脱酸剤、ガラス繊維用添加剤、消毒剤
374	ふっ化水素及びその水溶性塩	627,828	合成原料(フロン)、金属・ガラスの表面処理剤(エッチング剤)、半導体製造用エッチング剤
76	イブシロンーカプロラクタム	143,965	合成樹脂原料(衣料用繊維、タイヤコード、各種成型加工部品、食品包装用フィルム)
213	N,N-ジメチルアセトアミド	124,427	反応溶媒、溶剤、塗料は(離剤)
453	モリブデン及びその化合物	97,469	特殊鋼、顔料、触媒
232	N,N-ジメチルホルムアミド	79,885	溶剤(合成繊維、合成皮革、医薬品、色素用)、試薬(ホルミル化剤)、ガス吸収剤
218	ジメチルアミン	43,520	合成原料(加硫促進剤、殺虫・殺菌剤、医薬品、界面活性剤、溶剤)
150	1,4-ジオキサン	32,507	溶剤(合成皮革、塗料、合成反応用)、分散剤
395	ベルオキシ二硫酸の水溶性塩	30,476	重合開始剤、酸化漂白剤、試薬
56	エチレンオキシド	24,811	合成原料(エチレングリコール、エタノールアミン、1,4-ジオキサン、界面活性剤)、殺菌剤
455	モルホリン	19,079	溶剤、合成原料(乳化剤、切削油、潤滑油)、防錆剤、重合触媒、ガス吸収材、pH調整剤
30	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(アルキル基の炭素数が10から14までのもの及びその混合物に限る。)	16,199	界面活性剤
420	メタクリル酸メチル	14,089	合成樹脂原料(メタクリル樹脂、接着剤)
68	1,2-エポキシプロパン(別名酸化プロピレン)	12,121	合成原料(プロピレングリコール、プロピレノカーボネート、ウレタン樹脂、界面活性剤、医薬品、農業)
132	コバルト及びその化合物	7,945	特殊鋼、磁性材料、触媒
67	2,3-エポキシ-1-プロパノール	6,600	安定剤(樹脂、農薬)、加工剤(繊維改質)、エポキシ樹脂アルキド樹脂の反応性希釈剤
154	シクロヘキシルアミン	5,618	防錆剤、ゴム用薬品、清缶剤、染色助剤、酸素吸収剤、不凍液
31	アンチモン及びその化合物	5,032	樹脂難燃助剤、顔料、蓄電池、半導体、ガラス材料
415	メタクリル酸	4,748	合成樹脂原料(熱硬化性樹脂、接着剤、塗料)、加工剤(ラテックス改質剤、プラスチック改質剤、紙・繊維加工剤、皮革処理剤)
13	アセトニトリル	4,523	合成原料(ビタミンB1、サルファ剤、香料、染料)溶剤、電池の電解液
270	テレフタル酸	4,392	合成樹脂原料(ポリエステル系繊維・樹脂)
94	クロロエチレン(別名塩化ビニル)	3,793	合成樹脂原料(ポリ塩化ビニル樹脂、塩化ビニル-酢酸ビニル共重合樹脂、塩化ビニル-塩化ビニリデン共重合樹脂)
128	クロロメタン(別名塩化メチル)	3,000	合成原料(シリコン樹脂、ブチルゴム)、溶剤(医薬品製造用、農業製造用)、発泡剤(発泡ポリスチレン用)
392	ノルマルーヘキサン	2,867	溶剤(重合用、接着剤、塗料、インキ)
384	1-プロモプロパン	2,587	合成原料(医薬・農業中間体)
279	1,1,1-トリクロロエタン	2,069	合成原料(代替フロン用)、試薬、溶剤、洗浄剤
351	1,3-ブタジエン	1,762	合成樹脂原料(合成ゴム(SBR、NBR)、ABS樹脂)、合成原料(ブタンジオール)
58	エチレングリコールモノメチルエーテル	1,630	溶媒(各種樹脂用、印刷インキ、ポリサルファイトゴム製造用)、電解コンデンサー、ガソリン添加剤
390	ヘキサメチレンジアミン	1,600	合成樹脂原料(ポリアミド(ナイロン66)樹脂・染料、ポリウレタン)
65	エピクロヒドリン	1,424	合成樹脂原料(エポキシ樹脂)、合成原料(グリセリン、界面活性剤、イオン交換樹脂、医薬品)、加工剤(繊維処理)、可塑剤、農薬(殺虫・殺菌剤)
255	デカブロモジフェニルエーテル	1,405	難燃剤(ポリエチレン・ABS樹脂・ポリスチレン・ポリエステル樹脂用)
35	イソブチルアルデヒド	1,400	合成原料(ネオペンチルグリコール、有機合成)
157	1,2-ジクロロエタン	1,386	合成原料(塩化ビニル原料、エチレンジアミン、医薬品、農業(殺虫剤))、合成樹脂原料(ポリアミド/酸樹脂)、洗浄剤(フィルム用)、溶剤、くん蒸剤
243	ダイオキシシン類	981	非意図的生成物
423	メチルアミン	740	合成原料(農業、医薬品、染料、スチリー燐業)
308	ニッケル	682	メッキ、磁性材料、ステンレス鋼、ニッケル鋼
280	1,1,2-トリクロロエタン	549	洗浄剤
316	ニトロベンゼン	545	合成原料(アニリン、ベンジジン、キリリン、アリルベンゼン(染料、香料中間体))、溶剤(硝酸セルロース、塵埃防止剤、酸化剤)
44	インジウム及びその化合物	437	銀口、銀合金接点、ハンダ、低融点合金、液晶セル電極用、歯科用合金、防食アルミニウム
341	ビヘラジン	434	触媒(ウレタン用)、合成原料、試薬(アンチモン・ビスマス・金の検出試薬)
159	シス-1,2-ジクロロエチレン	393	1,1-ジクロロエチレン製造の副生成物
158	1,1-ジクロロエチレン(別名塩化ビニリデン)	384	合成樹脂原料(ポリ塩化ビニリデン(食品包装用フィルム))
36	イソブレン	298	合成樹脂原料(ポリイソブレン(イソブレンゴム、ブチルゴム))
322	5'-[N,N-ビス(2-アセチルオキシエチル)アミノ]-2'- (2-プロモ-4,6-ジニトロフェニルアゾ)-4'-メトキアセトアリド	233	染料
258	1,3,5,7-テトラアザトリシク[3.3.1.1(3,7)]デカン(別名ヘキサメチレンテトラミン)	226	硬化剤(熱硬化性樹脂)、加硫促進剤、その他(発泡剤、ホスゲンの吸収剤)
84	グリオキサル	194	加工剤(繊維処理、土壌硬化、紙仕上げ)、合成原料(香料、医薬品)
57	エチレングリコールモノエチルエーテル	160	溶媒(各種樹脂用、印刷インキ)、医薬品抽出剤
51	2-エチルヘキサン酸	110	ベンキのドライヤー、合成原料(グリース)、安定剤(塩化ビニル樹脂用)
137	シアナミド	100	農薬
135	酢酸2-メトキシエチル(別名エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート)	75	溶剤(塗料、接着剤)
304	鉛	58	バッテリー
337	4-ビニル-1-シクロヘキセン	44	合成原料(難燃剤、塗料)
283	2,4,6-トリクロロ-1,3,5-トリアジン	26	合成原料(アゾ染料、アンスラキノン染料、蛍光染料、合成樹脂、農薬)、加硫促進剤
235	臭素酸の水溶性塩	22	食品添加物、バーマ用薬剤、試薬
133	酢酸2-エトキシエチル(別名エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート)	20	溶剤(塗料、インキ)
291	1,3,5-トリス(2,3-エポキシプロピル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6(1H,3H,5H)-トリオン	13	硬化剤(ポリエステル系)、エポキシ樹脂改質剤、安定剤(難燃プラスチック)、その他(エポキシ系樹脂の主剤)
414	無水マレイン酸	11	合成樹脂原料(不飽和ポリエステル樹脂)、合成原料(テトラヒドロフラン、フマル酸、コハク酸、可塑剤(DOM))、その他(皮なめし剤)
2	アクリルアミド	8	合成樹脂原料(凝集剤、土壌改良剤、接着剤、紙力増強剤)、加工剤(繊維改質)
151	1,3-ジオキソラン	5	セルロース誘導体、溶剤、安定剤(塩素系溶剤用)、電解質溶媒、エンジニアリングプラスチック
215	2,6-ジメチルアニリン	5	合成原料(染料、顔料)
183	4-(2,4-ジクロロベンゾイル)-1,3-ジメチル-5-ピラゾリル=4-トールエンシルホナート(別名ピラゾント)	3	農薬(除草剤)
282	トリクロロ酢酸	3	合成原料(医薬品)、腐食剤、角質溶解剤、塗料は(離剤)
145	2-(ジエチルアミノ)エタノール	2	医薬品原料(抗ヒスタミン剤、抗マリア剤、鎮痛剤)、防錆剤、合成原料(凝集剤)、溶剤(印刷インキ・アゾ染料の緩性揮発剤)
448	メチレンビス(4,1-フェニレン)=ジイソシ アネート(別名 MDI)	2	合成樹脂原料(ウレタンエストラマー)
413	無水フタル酸	1	合成樹脂原料(不飽和ポリエステル樹脂)、合成原料(フタル酸系可塑剤(DOP、DBP)、フタルイミド、安息香酸)、ゴム薬品(スコーチ防止剤)
合計	生態毒性クラスなしの物質の排出量 第 1 種指定化学物質の公共用水域への総排出量に占める生態毒性ランクなしの物質の割合	2,110,222 62%	

表 3a 各業種における排出物質数別事業場数
(第 1 種指定化学物質、平成 24 年度、下水道業等を除く)

水 域	業種 code	業種名	排出している物質数																				合計
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20≦	
海 域 以 外	0500	金属鉱業		2	1	3	4															1	11
	0700	原油・天然ガス鉱業	3																				3
	1200	食料品製造業	6	1																			7
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業	1		1	1																	3
	1320	酒類製造業	1																				1
	1400	繊維工業	21	13	5	2	1	1															43
	1500	衣服・その他の繊維製品製造業	2	2																			4
	1600	木材・木製品製造業	1	1																			2
	1700	家具・装備品製造業	2																				2
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業	69	11	10	1	1	1	1				1								2		97
	1900	出版・印刷・同関連産業	3	1		1																	5
	2000	化学工業	72	34	26	16	17	9	9	5	2	4	2	2	2	3		1		1		1	206
	2060	医薬品製造業	19	2	6	1			1				1	1									31
	2092	農業製造業		2					1														3
	2100	石油製品・石炭製品製造業					1					2											3
	2200	プラスチック製品製造業	14	5	3	1	1	2															26
	2300	ゴム製品製造業	9	1	1																		11
	2400	なめし革・同製品・毛皮製造業	2	1																			3
	2500	窯業・土石製品製造業	41	12	2	2	1	1	2														61
	2600	鉄鋼業	19	7	2	4	2	2															36
	2700	非鉄金属製造業	28	9	6	7	3	1	1	2	1	1	1	1									64
	2800	金属製品製造業	107	53	31	12	9	2	2														216
	2900	一般機械器具製造業	12	8		1		1															22
	3000	電気機械器具製造業	116	31	16	7	6	1		2		1											180
	3060	電子応用装置製造業		2	1																		3
	3100	輸送用機械器具製造業	61	24	13	13	8	2	1														122
	3120	鉄道車両・同部分品製造業	1																				1
	3200	精密機械器具製造業	5	1																			6
	3230	医療用機械器具・医療用品製造業	6																				6
	3400	その他の製造業	4	1		1																	6
	3500	電気業		1																			1
	5142	鉄スクラップ卸売業	1																				1
	7210	洗濯業	1																				1
	7810	機械修理業	1																				1
	8630	計量証明業	1																				1
	8800	医療業	1																				1
	9140	高等教育機関	2																				2
	9210	自然科学研究所		1	1																		2
海 域	0500	金属鉱業			1																		1
	0700	原油・天然ガス鉱業		1																			1
	1200	食料品製造業	3																				3
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業		1																			1
	1320	酒類製造業	1																				1
	1400	繊維工業	5	1	2					1													9
	1600	木材・木製品製造業	1																				1
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業	11	6	2	2	2	1	1			1											26
	2000	化学工業	81	27	26	20	14	11	3	5	5	4	2		2	1	2	1	1	1		3	209
	2060	医薬品製造業	3	3		1		2		1		2											12
	2092	農業製造業	1				1																2
	2100	石油製品・石炭製品製造業	12	3	4			1	1														21
	2200	プラスチック製品製造業	5	1																			6
	2300	ゴム製品製造業	1																				1
	2500	窯業・土石製品製造業	11	3	2	2																	18
	2600	鉄鋼業	16	5	8	2	4	3		2		2											42
	2700	非鉄金属製造業	7	9	2	3	5	2	2		2	2			1								35
	2800	金属製品製造業	26	9	8	6				1													50
	2900	一般機械器具製造業	1																				1
	3000	電気機械器具製造業	11	5	1	2		1			1												21
	3100	輸送用機械器具製造業	4	1	5	3	3																16
	3300	武器製造業	1																				1
	3400	その他の製造業	1																				1
	3500	電気業	14																				14
	3700	熱供給業	1																				1
	4400	倉庫業	2	1	1																		4
	7210	洗濯業	1																				1
	7810	機械修理業			1																		1
合計			852	302	188	114	83	44	25	19	11	19	7	4	5	4	2	2	1	2	0	10	1,694

[illegible]

表 4a 業種別・排出量ランク別の公共用水域への排出事業場数
(第 1 種指定化学物質、平成 24 年度、下水道業等を除く)

水域	業種 code	業種名	公共用水域への排出量 (t/年)						
			≦0.001	0.001～0.01	0.01～0.1	0.1～1	1～10	10<	合計
海 域 以 外	0500	金属鉱業	1		2	4	2	2	11
	0700	原油・天然ガス鉱業			2		1		3
	1200	食料品製造業	5				2		7
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業		2	1				3
	1320	酒類製造業	1						1
	1400	繊維工業	3	3	7	16	14		43
	1500	衣服・その他の繊維製品製造業		1		1	2		4
	1600	木材・木製品製造業		1		1			2
	1700	家具・装備品製造業		2					2
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業	23	22	21	17	9	5	97
	1900	出版・印刷・関連産業	1	3	1				5
	2000	化学工業	24	34	52	62	29	5	206
	2060	医薬品製造業	6	5	10	5	5		31
	2092	農薬製造業			3				3
	2100	石油製品・石炭製品製造業		2		1			3
	2200	プラスチック製品製造業	3	8	4	5	6		26
	2300	ゴム製品製造業	4	1	2	2	2		11
	2400	なめし革・同製品・毛皮製造業		1	2				3
	2500	窯業・土石製品製造業	11	7	29	5	9		61
	2600	鉄鋼業	1	7	11	8	7	2	36
	2700	非鉄金属製造業	3	14	17	12	15	3	64
	2800	金属製品製造業	20	42	84	55	15		216
	2900	一般機械器具製造業	7	5	4	6			22
	3000	電気機械器具製造業	11	31	52	50	33	3	180
	3060	電子応用装置製造業			3				3
	3100	輸送用機械器具製造業	9	11	48	37	17		122
	3120	鉄道車両・同部分品製造業			1				1
	3200	精密機械器具製造業	2	2	1	1			6
	3230	医療用機械器具・医療用品製造業	1			1	1	3	6
	3400	その他の製造業		1	5				6
	3500	電気業					1		1
	5142	鉄スクラップ卸売業	1						1
	7210	洗濯業			1				1
	7810	機械修理業		1					1
	8630	計量証明業		1					1
	8800	医療業				1			1
	9140	高等教育機関		1		1			2
	9210	自然科学研究所			2				2
海 域	0500	金属鉱業				1			1
	0700	原油・天然ガス鉱業						1	1
	1200	食料品製造業	1	1	1				3
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業			1				1
	1320	酒類製造業	1						1
	1400	繊維工業		1	3	2	2	1	9
	1600	木材・木製品製造業	1						1
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業	5	4	3	3	9	2	26
	2000	化学工業	32	26	35	47	48	21	209
	2060	医薬品製造業	1	1	4	5	1		12
	2092	農薬製造業		1	1				2
	2100	石油製品・石炭製品製造業	3	1	4	3	9	1	21
	2200	プラスチック製品製造業	3	1	1	1			6
	2300	ゴム製品製造業			1				1
	2500	窯業・土石製品製造業	3	3	3	8		1	18
	2600	鉄鋼業		2	8	8	17	7	42
	2700	非鉄金属製造業	5	2	6	8	9	5	35
	2800	金属製品製造業	5	15	14	11	5		50
	2900	一般機械器具製造業			1				1
	3000	電気機械器具製造業	1	3	5	8	4		21
	3100	輸送用機械器具製造業		3	4	6	3		16
	3300	武器製造業	1						1
	3400	その他の製造業	1						1
	3500	電気業	5	1	3	5			14
	3700	熱供給業					1		1
	4400	倉庫業	1	2				1	4
	7210	洗濯業		1					1
	7810	機械修理業				1			1
合計			206	276	463	408	278	63	1,694

表 4b 業種別・排出量ランク別の公共用水域への排出事業場数
(生態毒性クラス 1 又は 2 該当物質、平成 24 年度、下水道業等を除く)

水域	業種 code	業種名	公共用水域への排出量 (t/年)						
			≦0.001	0.001～0.01	0.01～0.1	0.1～1	1～10	10<	合計
海 域 以 外	0500	金属鉱業	1		2	5	3		11
	1200	食料品製造業					2		2
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業		2	1				3
	1400	繊維工業		2	6	13	12		33
	1500	衣服・その他の繊維製品製造業		1	1		2		4
	1600	木材・木製品製造業		1		1			2
	1700	家具・装備品製造業		2					2
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業	2	4	4	14	10	2	36
	1900	出版・印刷・同関連産業	1	3	1				5
	2000	化学工業	22	27	49	56	17	2	173
	2060	医薬品製造業	2	4	8	2	2		18
	2092	農薬製造業			1				1
	2100	石油製品・石炭製品製造業		2	1				3
	2200	プラスチック製品製造業	2	6	7	3	2		20
	2300	ゴム製品製造業	1	2	1	2	1		7
	2400	なめし革・同製品・毛皮製造業		1	2				3
	2500	窯業・土石製品製造業	8	6	9	4	2		29
	2600	鉄鋼業	1	12	11	2	5	1	32
	2700	非鉄金属製造業	4	9	17	11	8		49
	2800	金属製品製造業	18	46	84	48	5		201
	2900	一般機械器具製造業	6	5	3	5			19
	3000	電気機械器具製造業	9	35	35	34	3		116
	3060	電子応用装置製造業			3				3
	3100	輸送用機械器具製造業	7	12	49	31	10		109
	3120	鉄道車両・同部分品製造業			1				1
	3200	精密機械器具製造業	2			1			3
	3230	医療用機械器具・医療用品製造業	1						1
	3400	その他の製造業		1	3				4
	3500	電気業					1		1
	7210	洗濯業			1				1
	9140	高等教育機関		1					1
	9210	自然科学研究所	1		1				2
海 域	0500	金属鉱業				1			1
	1200	食料品製造業			1				1
	1300	飲料・たばこ・飼料製造業			1				1
	1400	繊維工業		1	3	2	3		9
	1800	パルプ・紙・紙加工品製造業		2	1	3	7	1	14
	2000	化学工業	16	30	33	44	34	10	167
	2060	医薬品製造業		2	4	4			10
	2092	農薬製造業		1					1
	2100	石油製品・石炭製品製造業			4	3	10		17
	2200	プラスチック製品製造業	2	1	1				4
	2300	ゴム製品製造業			1				1
	2500	窯業・土石製品製造業	3	1	1	2			7
	2600	鉄鋼業		3	8	10	13	3	37
	2700	非鉄金属製造業	4	2	5	13	5	1	30
	2800	金属製品製造業	5	15	14	11	1		46
	2900	一般機械器具製造業			1				1
	3000	電気機械器具製造業	1	2	4	7	2		16
	3100	輸送用機械器具製造業		4	4	6	2		16
	3400	その他の製造業	1						1
	3500	電気業	1	1	3	5			10
	4400	倉庫業	1	2					3
	7210	洗濯業		1					1
	7810	機械修理業	1						1
	合計		123	252	390	343	162	20	1,290

（参考 5）米国 WET 試験における排水改善手法について

1 排水改善手法の概要

生物応答手法を用いた排水管理の運用においては、生物応答手法を用いて排水を評価した後、影響があると判定された排水に対し、適切な改善措置を実施することも重要な管理の一環となる。米国や韓国では、排水改善が義務づけられており、改善手法に関するガイダンス文書が作成されている。この手法は米国で毒性削減評価（TRE：Toxicity Reduction Evaluation）と呼ばれる手法で、米国環境保護庁（US EPA）によって、手法の概要や標準的な手順を解説し、適用事例を紹介したマニュアルが公表されている^{*1～3}。

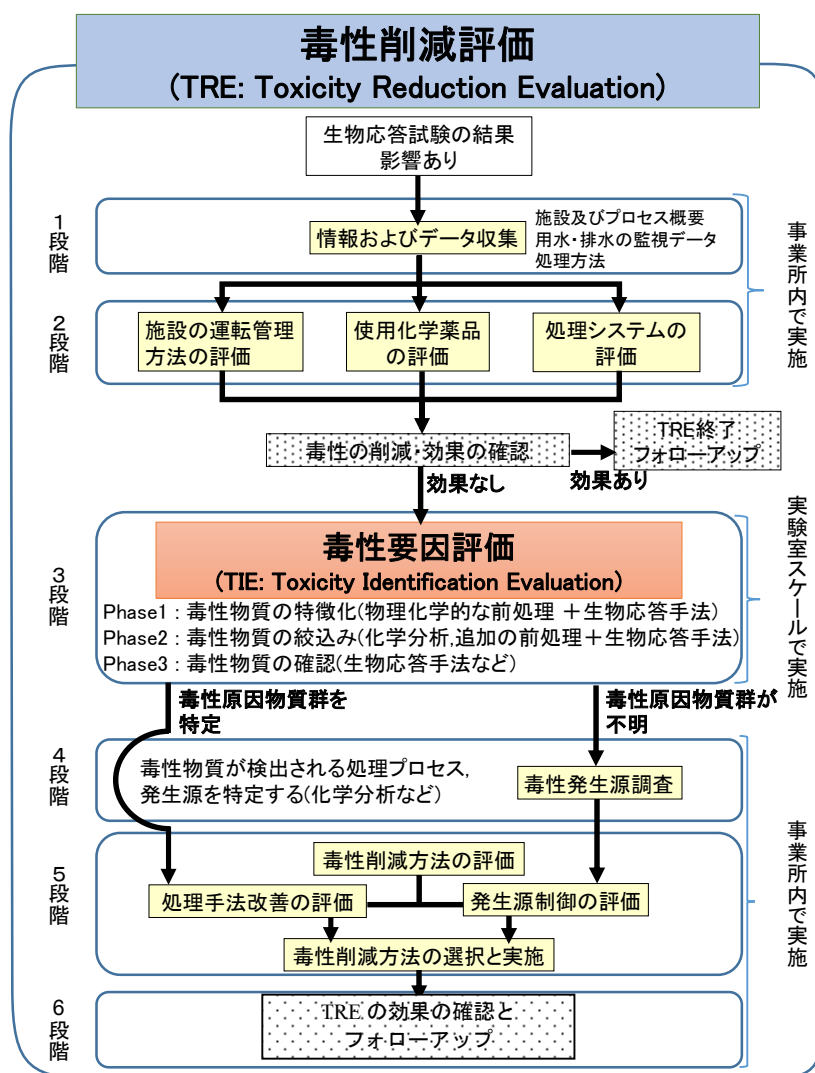


図 1 毒性削減評価（TRE）の概要と手順

米国の TRE マニュアルに基づいた TRE の実施手順について図 1 に示す。主に 6 段階から構成され、第 1 段階では、使用化学物質や処理方法等の情報収集を行い、第 2 段階では、収集した情報を基に施設の運転管理方法、使用化学薬品及び処理システムの評価・見直しを行い、適切な低減対策を実施し、その効果を確認する。影響が低減さ

れた場合、TRE は終了するが、影響低減が図れなかった場合、毒性原因を特定するため、第 3 段階の毒性同定評価（TIE: Toxicity Identification Evaluation）へと進む。ここでは、生物応答手法と化学分析を併用するなどして、排水影響の原因となる化学物質（群）を実験室レベルで明らかにし、あるいは削減手法を特定する。第 4 段階では、第 3 段階で原因化学物質（群）が特定されている場合、その物質を使用している工程の洗い出しや処理方法の検討を行うが、特定できなかった場合には、生物応答試験を用いて生物への影響が最も大きい排水路（工程）の特定を行う等して、原因物質が使用されている発生源を特定すべく努力する。第 5 段階では、特定された原因物質や発生源に対して適切な改善方法の検討を行い、削減を実行する。最後に、第 6 段階で削減の確認を行う流れとなっている。

2 排水改善手法の標準的な手順

〔第 1 段階〕 情報及びデータ収集

第 1 段階では生物影響が検出された排水について、用水・排水の水質モニタリングデータ、生産品目やその製造方法および使用化学物質についての情報、排水処理施設に関するデータ、排水規制に関する情報などを収集する。

〔第 2 段階〕 処理工程の最適化

第 2 段階では第 1 段階で得られた情報を基に、使用化学物質と現行の排水処理について評価し、以下の 3 つの負荷削減対策のいずれか（またはすべて）を実施する。

- ・ 使用化学物質の見直し

代替品への変更や使用量の削減

- ・ 処理手法の見直し

既存の処理システムの処理性能が最大になるよう改善する。例えば、粉末活性炭投入量の変更、活性汚泥法の汚泥滞留時間の延長などが挙げられる。

- ・ 処理施設の運転管理方法の改善

施設清掃や廃棄物管理の方法、化学物質を取り扱う機具やエリアの管理方法、排水経路の見直しや、漏水の確認などを行う。

この段階で問題となった排水の影響を削減できた場合 TRE は終了となる。しかし、削減できない場合は第 3 段階の毒性同定評価（TIE）を実施する。

〔第 3 段階〕 毒性同定評価（TIE）

第 3 段階では、排水影響の原因となる化学物質（群）やそれらを削減することができ処理手法を特定する。原因推定の基本的な考え方は、排水に実験室レベルで物理化学的な前処理を行った後に生物応答試験に供し、未処理の排水に対して影響が低減した場合、処理によって除去・分画された物質（群）を原因と推定するというものである。例えば金属のキレート処理後の排水の生物影響が低減した場合は、金属類が主要な原因物質群として推定される。具体的には以下の 3 つの手順 Phase 1～3 により構成される。

Phase 1 では、どのような物理的・化学的特性の化学物質群が生物影響に寄与して

いるのか、排水影響や原因物質の特徴を整理する。排水処理を模した物理化学的な処理や特定の物質群を除去できる前処理（pH 調整、エアレーション、活性炭・吸着剤・イオン交換樹脂処理、チオ硫酸ナトリウム添加等）を実験室レベルで行い、未処理排水とともに生物応答試験に供して、生物影響が低減されるかを評価する。生物影響が低減された場合、処理によって除去・分画された化学物質群を主要原因と推定する。

Phase 2 では、Phase 1 において主要原因と推定された化学物質群が広範囲にわたる場合に、さらに絞り込みを行う。Phase 1 と同様に排水の物理化学的な前処理と生物応答試験により、排水中の特定の物質群の生物影響を確認するとともに、化学分析を併用して物質の同定を試みる。このとき、検出された化学物質について、各試験生物に対する感受性データが入手可能な場合は、最大無影響濃度等と排水中濃度を比較し、排水中濃度の方が高い場合は原因物質候補とする。ただし、個別物質では毒性レベルに達していなくても、複数の物質と合わさることで相乗的な影響を引き起こしている場合や、反対に毒性が相殺されている場合があるため、Phase 3 における確認が必要不可欠である。

Phase 3 では、Phase 2 で推定された原因物質（群）候補が、排水の生物影響に寄与しているかどうか確認試験を行う。確認方法は物質により様々であるが、主に、生物影響のない処理排水や試験用水等に原因物質（群）候補を添加して生物応答試験に供し、元の排水と同程度の生物影響を示すか否かで判断する。

TIE で大切なことは、排水が有する毒性の原因物質（群）の名前を明らかにすることではなく、原因物質（群）の特性すなわち生物への影響の度合い（毒性負荷）を把握することである。具体的には、TRE/TIE 手法では、排水に対してまず何らかの処理を行い、その処理後に生物影響が削減された場合、その処理によって削減された物質の中に原因物質が含まれていたと考える。この時に把握した削減方法は、第 5 段階で実施する効果的な排水改善方法のヒントになる。

例えば、キレート処理によって金属を除去して毒性が削減された場合、原因物質（群）は金属の可能性が高く、金属を除去するような排水処理方法を導入すれば毒性が低減されることが期待できる。また、排水の pH を一度アルカリ側にして沈殿処理を行い、もう一度中性に戻して試験した結果毒性が削減された場合、アルカリ側で分解または沈殿する物質群が原因物質の可能性もある。ただし、この場合はアルカリで分解する物質としては様々な有機化合物が、沈殿する物質としては様々な重金属類が考えられるため、これだけで原因物質を推定できるわけではない。しかし、処理工程に pH 調整の工程を加えることで、特定の原因物質は分からなくても、影響を低減することは可能となる。

〔第 4 段階〕発生源評価

第 4 段階では、第 3 段階で原因物質（群）が特定された場合、ピンポイントでその最適な処理を行うため、その物質（群）がどの工程で発生しているか特定を試みる。発生源であると疑われる工程の排水を用いて、原因物質（群）の化学分析または生物応答試験を実施し、影響を及ぼしている工程を特定する。第 3 段階で原因物質（群）が特定されていない場合は、生物応答試験のみを用いて、最も生物影響が大きい排水

経路の特定を試みる。発生源の見当がつかない場合は、最終放流口から排水経路をさかのぼり、生物応答試験または化学分析の結果から発生源を特定する。

〔第5段階〕排水改善方法の選択と実施

第5段階では、第3段階、第4段階で特定された原因物質や発生源に対して、排水改善方法を検討・実行する。原因物質の発生源の処理プロセスを見直し、原因物質が生成されないようにする方法と、発生した原因物質を適切な処理により除去する方法の2通りのアプローチがある。現実に関因物質を除去するためにどのような手法を選択するかはTIEの結果を参考にした上で利用可能な最善の手法（BAT: Best Available Technology/Technique）を事業者が判断する。

〔第6段階〕確認とフォローアップ

第6段階では、生物応答試験による定期的なモニタリングを実施して、排水の生物影響が規制基準等を達成するレベルまで改善したかを確認する。特定した原因物質のモニタリングを行うこともある。削減効果が確認されればTREは終了となる。

- *1)US EPA, Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070(1989)
- *2)US EPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002(1999)
- *3)US EPA, Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program(2001)

(参考6) 生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会委員名簿

【平成22～24年度】

○生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会（敬称略、五十音順）

大久保規子 大阪大学大学院法学研究科教授
岡田 光正 放送大学教授
楠井 隆史 富山県立大学工学部環境工学科教授
(座長) 須藤 隆一 東北大学大学院工学研究科客員教授
細見 正明 東京農工大学大学院工学研究院教授
森田 昌敏 愛媛大学農学部客員教授

○生物応答を利用した水環境管理手法の制度・運用分科会（敬称略、五十音順）

青木 康展 (独)国立環境研究所環境リスク研究C環境リスク研究推進室副センター長・室長
浅枝 隆 埼玉大学大学院理工学研究科教授
大木 貞幸 埼玉県環境部水環境課副課長
大久保規子 大阪大学大学院法学研究科教授
小山 次朗 鹿児島大学水産学部海洋資源環境教育研究センター教授
茂岡 忠義 元横浜国立大学大学院環境情報研究院教授
白石 寛明 (独)国立環境研究所環境リスク研究センター長
須藤 隆一 東北大学大学院工学研究科客員教授
田中 宏明 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター教授
谷田 一三 大阪府立大学大学院理学系研究科教授
中杉 修身 元上智大学大学院地球環境学研究科教授
(座長) 森田 昌敏 愛媛大学農学部客員教授
山室 真澄 東京大学大学院新領域創成科学研究科教授

○排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会（敬称略、五十音順）

一瀬 諭 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター環境監視部門
大西 悠太 いであ株式会社環境創造研究所環境リスク研究センター
(座長) 楠井 隆史 富山県立大学工学部環境工学科教授
滝上 英孝 (独)国立環境研究所資源循環・廃棄物研究センターライフサイクル物質管理研究室
田中 仁志 埼玉県環境科学国際センター水環境担当
新野 竜大 三菱化学メディエンス(株)環境リスク評価センター環境影響評価グループ生態影響チーム兼創薬支援事業本部開発グループ
松浦 武 (財)化学物質評価研究機構久留米事業所試験第4課
山本 裕史 徳島大学大学院ソシオ・アート・アンド・サイエンス研究部
山守 英朋 名古屋市環境科学研究所水質部

【平成 25～27 年度】

○生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会（敬称略、五十音順）

- 大久保規子 大阪大学大学院法学研究科教授
岡田 光正 放送大学教授
楠井 隆史 富山県立大学工学部環境工学科教授
(座長) 須藤 隆一 東北大学大学院工学研究科客員教授
田中 宏明 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター教授
中杉 修身 元上智大学大学院地球環境学研究科教授
中島 典之 東京大学大学院工学系研究科准教授
細見 正明 東京農工大学大学院工学研究院教授
森田 昌敏 愛媛大学農学部客員教授

○排水管理のバイオアッセイ技術検討分科会（敬称略、五十音順）

- 一瀬 諭 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター環境監視部門専門員
(座長) 楠井 隆史 富山県立大学工学部環境工学科教授
茂岡 忠義 横浜国立大学大学院環境情報研究院教授
田中 仁志 埼玉県環境科学国際センター水環境担当主任研究員
山本 裕史 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部准教授
山守 英朋 名古屋市環境科学調査センター環境科学室主任研究員

【事務局幹事】

- 鑪迫 典久 (独)国立環境研究所環境リスク研究センター環境リスク研究推進室長
菅谷 芳雄 (独)国立環境研究所環境リスク研究センター化学物質審査オフィス環境科学専門員

(参考 3) 事業場排水実態調査結果 (※修正箇所を表示)

1. 調査対象

平成 21～26 年度にかけて、公募方式で選定した国内の事業場について、排水の生物応答試験を実施した。実施数は平成 23 年度を除く 5 年間で合計 ~~5039~~ 事業場、59 排水サンプルであった。業種別内訳は表 1 に示すとおり。

表 1 調査対象事業場の業種内訳

業種名	産業分類 中分類番号 ^a	事業場数	サンプル数
食料品製造業	9	1	1
パルプ・紙・紙加工品製造業	14	1	1
化学工業	16	1743	24
ゴム製品製造業	19	42	4
窯業・土石製品製造業	21	1	1
金属製品製造業	24	1	1
はん用機械器具製造業	25	3	4
電子部品・デバイス・電子回路製造業	28	2	3
電気機械器具製造業	29	6	6
輸送用機械器具製造業	31	2	2
電気業	33	44	4
下水道業	36	3	3
廃棄物処分量	88	53	5
合計	—	5039	59

a 日本標準産業分類コード (第 12 回改定版)

2. 調査方法

調査は、基本的に「生物応答を用いた排水試験法 (検討案)」（参考資料 2 参照）に記載された方法で行った。試験条件等の概要は表 2 に示すとおり。

表 2 事業場排水実態調査における試験条件等の概要

	胚・仔魚期の魚類を用いる 短期毒性試験	ニセネコゼミジンコを用いる ミジンコ繁殖試験	淡水藻類を用いる生長 阻害試験
供試生物	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) 受精後 4 時間未満の受精卵	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 24 時間齢未満の仔虫	ムレミカヅキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) 対数増殖期の細胞
試験期間	9 日間	最大 8 日間 ^b	72 時間
エンドポイント	ふ化率・ふ化後生存率・ 生存率・生存指標 ^a	生存率・産仔数	生長速度
対照区・希釈水	活性炭ろ過水道水等		OECD 藻類培地
試験濃度区	排水含有率 80, 40, 20, 10, 5%に希釈した 5 濃度区		
換水	最低週 3 回、 隔日又は中 2 日	週 3 回又は隔日	なし
試料量/容器	50 mL	15 mL	100 mL
生物数/容器	最低 10 個体、推奨 15 個体	1 個体	5,000 cells/mL
繰り返し数/濃度区	4 連	10 連	6 連 (対照区) 4 連 (濃度区)

a ばく露 5 日目の仔魚数/総胚体数×ばく露終了時の生存仔魚数/(胚体数－死亡・未ふ化数)：平成 24 年度より実施

b 対照区の 6 割以上が 3 回産仔した時点で終了

3. 試験結果

排水の最大無影響濃度 NOEC(%)を各排水サンプルの 3 種類の試験について測定した。NOEC(%)は排水の希釈濃度(%)で表し（無希釈の排水サンプルの希釈濃度は 100%）、その測定値から $TU=100/NOEC$ で求める指標 TU(Toxic Unit)を算出して、TU 値を「1.25 以下（無影響濃度が 80%以上）」から「40 より大（同 2.5%未満）」までの 7つのランクに分けて試験結果を整理した。

試験の種類別に各ランクの比率を図 1 に、試験の種類と業種別に各ランクに該当する排水サンプル数を表 3 に示した。TU 値が 10 より大きい※（最大無影響濃度が 10%未満）ランク 5～7 に属する排水サンプルは、魚類と藻類の試験では全 59 サンプルの 105%、ミジンコの試験では同 37%、藻類の試験では同 12%であり、魚類と藻類に比べてミジンコへの影響が大きい結果となった。

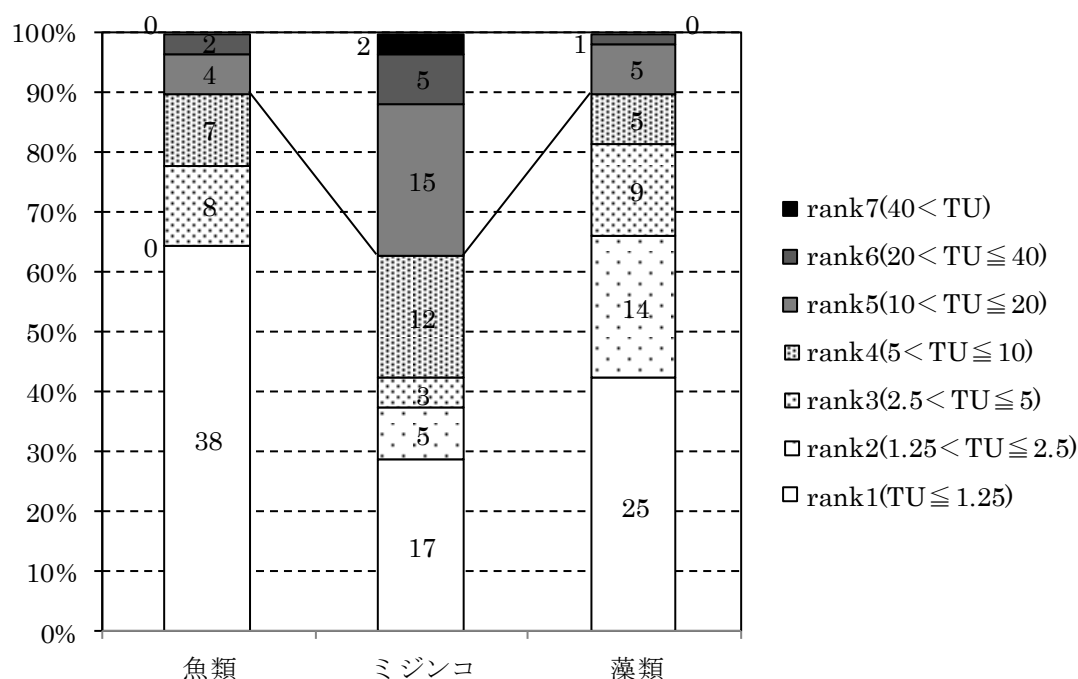


図 1 魚類・ミジンコ・藻類試験における TU 値のランクの比率 (※図は追って修正)
(図中の数字は各ランクに該当する排水サンプル数を示す。)

※現行の排水規制では、排水の水質は、公共用水域に排出されると、そこを流れる河川水等により、排水口から合理的な距離を経た公共用水域において、通常少なくとも 10 倍程度に希釈されると想定されることに基づき、排水基準は環境基準の 10 倍値に設定されている。この排水基準の設定の考え方を踏まえ、排水に対する 3 種類の生物応答試験結果のいずれかにおいて、排水の毒性を無影響にするために必要な希釈倍率が 10 倍を超過する場合（最大無影響濃度が 10%未満の場合）、すなわち、TU が 10 を超過する場合（ランク 5～7 の場合）、その排水について、改善の必要があると評価することが想定される。

表 3 各ランクに該当する排水サンプル数の分布

試験の種類	魚類							ミジンコ							藻類						
TU 値のランク ^a	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6 ^b	7	1	2	3	4	5	6 ^b	7
食料品製造業	1										1							1			
パルプ・紙・紙加工品製造業	1											4	1		1						
化学工業	10	5	53	3	43	2		7	2	3	4	62	51	1	12	5	5		2		
ゴム製品製造業	4							2	1				1		1	2	1				
窯業・土石製品製造業	1								1									4		1	
金属製品製造業	1												1	4					1		
はん用機械器具製造業	4							3					4	1	1	3					
電子部品・デバイス・電子回路製造業	2	1	4								1	12	1		1	2					
電気機械器具製造業	5		1	4				1			3	2			3	1		1		1	
輸送用機械器具製造業	2											4	24					1	1		
電気業		1	31	3							2	2					2	1	1		
下水道業	2	1	4					1	1			4	1		3						
廃棄物処分業	5							3			1		1		3	1	1				
合計	38	98	87	37	34	20	0	17	5	3	12	715	135	2	25	14	9	45	5	21	0

- a ランク 1 TU ≤ 1.25
 2 1.25 < TU ≤ 2.5
 3 2.5 < TU ≤ 5
 4 5 < TU ≤ 10
 5 10 < TU ≤ 20
 6 20 < TU ≤ 40
 7 40 < TU

b 20 < TU と判断されたが、40 < TU であるか未確認のものを含む

[検討会報告書の訂正について]

検討会報告書参考3「事業場実態調査結果」のデータについて、誤りがあったことが判明したため、下記のとおり訂正します(訂正箇所は下線部)。

1. 調査対象

《訂正前》

平成 21～26 年度にかけて、公募方式で選定した国内の事業場について、排水の生物応答試験を実施した。実施数は平成 23 年度を除く 5 年間で合計 39 事業場、59 排水サンプルであった。業種別内訳は表 1 に示すとおり。

表 1 調査対象事業場の業種内訳

業種名	産業分類 中分類番号 ^a	事業場数	サンプル数
食料品製造業	9	1	1
パルプ・紙・紙加工品製造業	14	1	1
化学工業	16	<u>13</u>	24
ゴム製品製造業	19	2	4
窯業・土石製品製造業	21	1	1
金属製品製造業	24	1	1
はん用機械器具製造業	25	3	4
電子部品・デバイス・電子回路製造業	28	2	3
電気機械器具製造業	29	6	6
輸送用機械器具製造業	31	2	2
電気業	33	<u>1</u>	4
下水道業	36	3	3
廃棄物処分業	88	<u>3</u>	5
合計	—	<u>39</u>	59

a 日本標準産業分類コード（第 12 回改定版）

3. 試験結果

《訂正前》

TU 値が10より大きい（最大無影響濃度が10%未満）ランク5～7に属する排水サンプルは、魚類と藻類の試験では全59サンプルの10%、ミジンコの試験では同37%であり、魚類と藻類に比べてミジンコへの影響が大きい結果となった。

表 3 各ランクに該当する排水サンプル数の分布

試験の種類	魚類							ミジンコ							藻類						
TU 値のランク ^a	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
食料品製造業	1										1							1			
パルプ・紙・紙加工品製造業	1											1			1						
化学工業	10		<u>5</u>	3	<u>4</u>	<u>2</u>		7	2	3	4	<u>6</u>	<u>1</u>	1	12	5	5		2		
ゴム製品製造業	4							2	1				1		1	2	1				
窯業・土石製品製造業	1							1										<u>1</u>			
金属製品製造業	1												1						1		
はん用機械器具製造業	4							3					<u>1</u>		1	3					
電子部品・デバイス・電子回路製造業	2		<u>1</u>								1	<u>2</u>			1	2					
電気機械器具製造業	5			<u>1</u>				1			3	2			3	1		1		1	
輸送用機械器具製造業	2											<u>1</u>	<u>1</u>					1	1		
電気業			<u>1</u>	3							2	2					2	1	1		
下水道業	2		<u>1</u>					1	1			<u>1</u>			3						
廃棄物処分業	5							3			1		1		3	1	1				
合計	38	0	8	7	4	<u>2</u>	0	17	5	3	12	<u>15</u>	<u>5</u>	2	25	14	9	<u>5</u>	5	<u>1</u>	0

- a ランク1 TU≤1.25
 2 1.25<TU≤2.5
 3 2.5<TU≤5
 4 5<TU≤10
 5 10<TU≤20
 6 20<TU≤40
 7 40<TU

《訂正後》

平成 21～26 年度にかけて、公募方式で選定した国内の事業場について、排水の生物応答試験を実施した。実施数は平成 23 年度を除く 5 年間で合計 50 事業場、59 排水サンプルであった。業種別内訳は表 1 に示すとおり。

表 1 調査対象事業場の業種内訳

業種名	産業分類 中分類番号 ^a	事業場数	サンプル数
食料品製造業	9	1	1
パルプ・紙・紙加工品製造業	14	1	1
化学工業	16	<u>17</u>	24
ゴム製品製造業	19	<u>4</u>	4
窯業・土石製品製造業	21	1	1
金属製品製造業	24	1	1
はん用機械器具製造業	25	3	4
電子部品・デバイス・電子回路製造業	28	2	3
電気機械器具製造業	29	6	6
輸送用機械器具製造業	31	2	2
電気業	33	<u>4</u>	4
下水道業	36	3	3
廃棄物処分業	88	<u>5</u>	5
合計	—	<u>50</u>	59

a 日本標準産業分類コード（第 12 回改定版）

《訂正後》

TU 値が10より大きい（最大無影響濃度が10%未満）ランク5～7に属する排水サンプルは、魚類の試験では全59サンプルの5%、ミジンコの試験では同37%、藻類の試験では同12%であり、魚類と藻類に比べてミジンコへの影響が大きい結果となった。

表 3 各ランクに該当する排水サンプル数の分布

試験の種類	魚類							ミジンコ							藻類						
TU 値のランク ^a	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6 ^b	7	1	2	3	4	5	6 ^b	7
食料品製造業	1										1							1			
パルプ・紙・紙加工品製造業	1												<u>1</u>		1						
化学工業	10	<u>5</u>	<u>3</u>	3	3			7	2	3	4	<u>2</u>	<u>5</u>	1	12	5	5		2		
ゴム製品製造業	4							2	1				1		1	2	1				
窯業・土石製品製造業	1							1											<u>1</u>		
金属製品製造業	1												<u>1</u>						1		
はん用機械器具製造業	4							3						<u>1</u>	1	3					
電子部品・デバイス・電子回路製造業	2	<u>1</u>									1	<u>1</u>	<u>1</u>		1	2					
電気機械器具製造業	5		<u>1</u>					1			3	2			3	1		1		1	
輸送用機械器具製造業	2												<u>2</u>					1	1		
電気業		<u>1</u>	<u>3</u>								2	2					2	1	1		
下水道業	2	<u>1</u>						1	1				<u>1</u>		3						
廃棄物処分業	5							3			1		1		3	1	1				
合計	38	8	7	3	<u>3</u>	<u>0</u>	0	17	5	3	12	<u>7</u>	<u>13</u>	2	25	14	9	4	5	<u>2</u>	0

- a ランク1 TU≤1.25
 2 1.25<TU≤2.5
 3 2.5<TU≤5
 4 5<TU≤10
 5 10<TU≤20
 6 20<TU≤40
 7 40<TU
b 20<TU と判断されたが、40<TU であるか未確認のものを含む