

生物応答試験を用いた排水の評価手法と  
その活用の手引き  
(中間とりまとめ)

平成31年3月

生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会

## はじめに

我が国の水環境行政においては、これまで長年にわたり、水質汚濁防止法等の施行等を通して水環境保全、特に水質汚濁の防止に取り組んできた。水質汚濁問題に対する取組は、第二次世界大戦後の産業復興期に拡大した重大な公害問題に対処するため、昭和33年(1958年)に制定されたいわゆる旧水質二法(公共用水域の水質の保全に関する法律及び工場排水等の規制に関する法律)を端緒に始まり、その後、同法の限定的な規制内容を抜本的に見直した水質汚濁防止法が昭和45年(1970年)に制定されるに至り、現在も続く全国一律の排水規制の導入などの基本的な法制度が整備された。その後も、地下水汚染防止や事業場における事故時の措置に係る対策の強化等が順次講じられ、現在の制度体系が形づくられた。

こうした取り組みにより、地域や水域等によっては依然として課題が残されているものの、中長期的には公共用水域における水質環境基準の達成状況は改善が進んでおり、かつて全国的に生じていた激甚な公害への対策は成果を挙げてきた。

一方で、近年の水環境行政には、国民のニーズの多様化等の社会情勢の変化を踏まえつつ、健全な水循環の確保、生物多様性の保全を視野に入れた取組等を、地域に応じて展開していくことが求められている。

平成30年(2018年)5月に閣議決定された「第五次環境基本計画」においては、今後の環境政策が果たすべき役割として、環境保全上の効果を最大限に発揮できるようにすることに加え、多様な主体の参加によるパートナーシップの促進などが挙げられている。水環境保全については、同計画の6つの重点戦略の一つである「健康で心豊かな暮らしの実現」に関する施策として、「各主体の自主的な参画と連携を図りながら、生物の生息・生育環境の評価や維持・回復を目指す施策を水域や地域の特性に応じて展開する」ことなどが盛り込まれたところであり、従来の公害防止を目的とした水質汚濁防止法等の法制度に基づく水質対策を中心とする取組は引き続き維持しつつ、様々な主体が、それぞれの水域や地域の実情等に応じ、水生生物の生息・生育環境の保全を目指していくことが重要である。

平成28年6月に設置された「生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会」(以下、本検討会という。)では、このような水環境行政をとりまく水環境・水生生物の保全に関するニーズの変化を踏まえながら、学識経験者、事業者、地方公共団体、NPO等の関係者の参加を得て、計9回にわたり、水環境、とりわけ水生生物の保全に事業者等が自主的に取り組む際の一つの手法として、水質の評価・管理等に試験生物を用いる手法(諸外国においては、「Whole Effluent Toxicity (WET)」手法などと呼ばれる場合がある)を用いる場合の意義、有効性、課題を含めた活用時の在り方について検討を行った。

また、本検討会と並行して実施したパイロット事業においては、排水に対し生物応答試験を適用し、生物影響の評価、原因物質の推定等を行った。

現時点では事例等知見の蓄積が十分でない部分があるものの、今回、排水の評価において生物応答試験を使用・活用することを自ら考える事業者等に向けた手引きとして、これまでに得られた知見を基に、手法の基本的な考え方、活用時の留意点等について整理し、中間的にとりまとめを行った。

## 目次

### はじめに

#### 序章 本資料について

1. 資料の構成 ..... 1
2. 基本的な用語 ..... 1

#### 第1章 生物応答試験を用いた排水の評価手法の概要と活用意義

1. 手法の概要 ..... 3
2. 手法の活用意義 ..... 4

#### 第2章 事業場からの排水に対して用いる場合の主な留意点・考えられる使い方の例

1. 生物応答試験の対象毒性・試験生物種（試験法） ..... 8
2. 生物応答試験の精度 ..... 11
3. 排水変動の考慮 ..... 12
4. 生物応答試験の結果の評価・解釈 ..... 13

#### 第3章 考えられる活用方法とパイロット事業における活用事例・主な留意点

1. 本手法活用の基本的な考え方 ..... 15
2. パイロット事業の概要 ..... 17
3. パイロット事業における活用事例と留意点・課題 ..... 27

#### 第4章 課題と展望

1. 生物応答試験を用いた排水の評価手法自体について ..... 31
2. 生物応答試験を用いた排水の評価手法の活用について ..... 31
3. その他（本手法の普及関連） ..... 32

[参考資料]手法の技術的事項に関する関係資料

1. 生物応答試験の試験法
2. 生物応答試験の精度
3. 試験実施のタイミング等
4. 生物応答試験の結果の評価・解釈
5. 生物影響低減策の検討に関する米国の事例（TRE/TIE）
6. 過年度の環境省調査事業における生物応答試験結果

(別添)

1. パイロット事業事例集
2. 関係資料集

## 序章 本資料について

### 1. 資料の構成

本資料は、4章から構成され、第1章「生物応答試験を用いた排水の評価手法の概要と意義」では、本手法の概要を整理するとともに、これまでの検討会における議論を踏まえつつ、考えられる活用意義を提案している。

また、第2章「事業場からの排水に対して用いる場合の主な留意点・考えられる使い方の例」では、本手法を自ら選択して使用・活用することを考える事業者（事業場）において、どのような事項に留意し、これらを踏まえてどのような使い方が考えられるのかを、事業者の自主性を前提としつつ整理を行っている。

第3章「考えられる活用方法とパイロット事業における活用事例・主な留意点」では、環境省が実施したパイロット事業における活用事例や考えられる活用方法とその際の留意点等を示し、本手法を自ら選択して活用することを考える事業者にとって参考になると考えられる情報を整理した。

第4章「課題と展望」では、本手法に係る主要な課題と展望について整理した。

なお、本資料に記載した内容に関する技術的情報を参考資料として記載し、その数値データ等は関係資料集として添付した。また、環境省が実施したパイロット事業についても、事業場毎の取組を事例集として整理し添付した。

### 2. 基本的な用語

本資料では、基本的な用語について以下のとおり整理し用いることとする。

#### 【生物応答試験を用いた排水の評価手法】

水中の物質の濃度や水生生物への影響を個別的に評価・把握するのではなく、試験生物を利用した生物応答試験を用いることで、排水の水生生物に対する影響を総体として評価する手法。事業者等の利用者がその結果を事業場における化学物質管理の推進、関係者への情報発信等に活用できる可能性がある。

#### 【生物応答試験】

化学物質に対する生物の応答を確認（利用）することにより、化学物質の有害性を評価する試験。生態毒性試験、バイオアッセイなどの名称でも呼ばれることがある。

本資料では特段の断りが無い限り、平成27年11月に環境省が公表した「生物応答を用いた排水管理手法への活用について」（生物応答を利用した排水管理手法の活用に関する検討会）において提案された事業場排水に適用する短期慢性毒性に係る試験法案を指し、国内の化学物質管理関連の諸制度（化学物質審査規制法、農薬

取締法等)の下で導入されている水生生物を用いる試験とは、区別するものとする。

#### **【WET 試験 (WET 手法)】**

諸外国で排水規制制度等として導入されている生物応答試験を用いて全排水毒性 (Whole Effluent Toxicity (WET)) を評価する試験 (又はそれを用いた手法)。

#### **【事業場】**

河川、湖沼、海域等の公共用水域などに排水を排出する工場や事業場で、業種は特に問わない。ただし、水質汚濁防止法等の法令に基づき排水基準等の適用を受けている場合には、法令は適切に遵守しており、その上で更なる取組を自主的に行いたいと考えている工場・事業場を主な実施者と想定している。

なお、「事業者」は「事業場を所有・経営する事業者」の意味として用いる。

#### **【水環境】**

事業場排水のみでなく公共用水域も含めたものを指す。

## 第1章 生物応答試験を用いた排水の評価手法の概要と活用意義

本章では、本手法の概要および現時点で考えられる活用意義について記載した。なお、本手法の使用・活用に当たっては、排水基準等の法規制の遵守はもとより、事業場で使用する薬品や原材料等を把握し、当該事業場における使用化学物質の管理を適切に行ったうえで本手法を用いることが望ましい。

### 1. 手法の概要

#### 【ポイント】

- 生物応答試験は、本手法を特徴付ける最も重要な構成要素であり、含有物質の組成等がケース・バイ・ケースで変動する水に対して用いることで、水中の多種多様な物質による水生生物への影響を個別にではなく、その水総体としての影響を評価することができる。
- 試験には、一般に結果に信頼性（精度）が得られる試験生物種が用いられ、具体的な種は生物の栄養段階を考慮した3生物群（魚類、無脊椎動物、藻類）から選択する。
- こうした生物応答試験の結果は、事業場における化学物質管理の推進、関係者への情報発信等に活用し得る。
- 一方で、生物応答試験のみで排水の水質を完全に把握したり、試験結果で生物影響がみられた場合の原因を特定するものではない。このため、特に事業者が生物影響の低減を含めて検討しようとする場合には、例えば、
  - ・排水に含まれる物質の濃度や組成を確認するためには化学分析を用いる
  - ・製造事業者であれば、各事業場の製造プロセス等の状況を改めて点検・確認する
  - ・排水処理プロセスの運転・管理状況等を改めて点検・確認する
  - ・その他、事業者自らが平素の排水管理において蓄積している知見を有効利用するといった方法を生物応答試験と適切に組み合わせることが必要である。
- なお、生物を用いる試験の特性上、ある程度の試験結果のばらつきや試験期間を有することを考慮したうえで活用する必要がある。

(注) 試験精度及び試験期間については、2. 生物応答試験の精度及び [参考資料] 1. 参照

#### 【説明】

本手法は、水中の物質の濃度や水生生物への影響を個別的に評価・把握するのではなく、試験生物を利用した生物応答試験を用いることで、排水の水生生物に対する影

響を総体として評価する手法である。また、事業者等の利用者がその結果を事業場における化学物質管理の推進、関係者への情報発信等に活用できる可能性がある。試験に用いられる生物種は、【ポイント】に記載のとおり、一般に試験精度が得られ、なおかつ生物の栄養段階を考慮した3生物群（魚類、無脊椎動物、藻類）の中から選択される（詳細は第2章参照）。なお、このように事業場排水の水質評価等に生物応答試験を用いる手法は、諸外国では既に多くの実施実績がある（参考資料、関係資料集参照）。

一方で、生物応答試験を行うことだけが本手法の活用方法ではなく、事業者が自らの目的等に応じて本手法を活用する際には、【ポイント】にも記載のとおり、生物応答試験の結果や試験の実施を契機に化学分析等の様々な取組を組み合わせることが必要である。

## 2. 手法の活用意義

### 【ポイント】

#### 1) 事業場における化学物質管理推進の観点からの意義

- 排水に対して生物応答試験を用いることで、排水に含まれる多種多様な物質に由来する排水そのものの水生生物への影響を検出することができる。
- 試験の結果を事業者自らが自主的に評価し、その評価結果に応じ、又は試験を契機に、事業者が事業場における排水中の生態毒性を有する物質の削減といった自主的な取組や他の自主的な化学物質管理を行うことで、公共用水域への環境負荷の低減を図ることができる。また、排水基準等の法令に規定されている項目以外の化学物質管理を考える事業者の取組の選択肢の一つとして活用し得る。
- 本手法を用いることで、従来予期・認識していなかった排水の生態リスクに気づくきっかけとなる場合がある。
- なお、生物応答試験以外にも、生態毒性が明確な化学物質を使用している場合には個別化学物質の分析・モニタリングを行うなど、試験精度やコスト、試験期間等を勘案し、各事業者の目的等に応じて手法を選択することが考えられる。

#### 2) 排水放流先の水生生物保全の観点からの意義

- 生物応答試験の結果の自主評価や試験を契機とした生態毒性を有する物質の削減その他の自主的な化学物質管理が事業者等により行われることで、公共用水域への環境負荷が低減され、こうした取組が、ひいてはより良い水生生物の生息環境の実現に貢献できる可能性がある。
- 本手法を生物多様性・水生生物保全等の取組の一つとして実施し、環境報告書やCSRレポートで紹介すること等により、関係者への情報発信等に活用し得る。

○なお、生物応答試験以外にも、排水放流先の水生生物の生息状況調査結果を活用するなど、試験精度やコスト、試験期間等を勘案し、各事業者等の目的等に応じて手法を選択することが考えられる。

(注)「事業場における化学物質管理推進」は「排水放流先の水生生物保全」にも資すると考えられるが、ここでは、本手法の活用を考える事業者等が自らの関心、目的等に応じて活用意義を理解しやすくなるよう両者を区別して記載した。

## 【説明】

近年の水環境保全・水生生物保全に関する課題は地域・水域毎に多様化しており、全国的に設定されている水生生物保全に着目した水質環境基準（現時点で3項目（物質））の達成や水質汚濁防止法に基づく排水基準の遵守のみでは、各地域における水生生物の保全に対するニーズ等に十分に応えられない場合もあると考えられる。

このような場合、本手法を活用することで水質環境基準等が設定されていない物質も含めた多種多様な含有物質の水生生物への毒性影響を総体として評価すること、また、必要に応じ評価結果を踏まえた自主的取組を行うことは、こうしたニーズ等に定める一つの手段になる場合があると考えられる。

本手法活用の技術的意義としては、【ポイント】に記載のとおり、手法の使い方に応じて「事業場における化学物質管理推進」と「排水放流先の水生生物保全」の大きく2通りが考えられる。また、これらの活用意義と「生物応答試験の結果の自主評価」及び「評価結果を踏まえた自主的取組」との関係を整理すると、表1のとおりとなると考えられる。

表1 手法活用の技術的意義と使い方の例の関係

手法活用の 技術的意義	手法活用時の自主的取組方法（手法の使い方）の例 <sup>※1</sup>	
	生物応答試験の結果の自主評価	評価結果を踏まえた自主的取組
事業場における 化学物質管理推進	<p>○自主評価のための任意の影響評価値（TU 値<sup>※2</sup>など）を置く</p> <p>（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・社内で目標としやすい数字とする</li> <li>・環境基準に対する排水基準の倍率を参考にする 等</li> </ul>	<p>○自主目標とした試験結果の影響評価値を目安に、排水総体の生物影響の低減を図る</p> <p>○試験の実施や評価を契機に、各段階における化学物質等の使用量の更なる適正化を進めるなど、化学物質管理の自主的改善を図る 等</p>
排水放流先の 水生生物保全	<p>○排水放流先の水域の実態と関連付けて算出される任意の影響評価値（TU 値など）を置く<sup>※3</sup></p> <p>（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・排水の放流先の水域の水量（河川流量等）に対する事業場の排水量の比（希釈倍率）を踏まえる 等</li> </ul>	<p>○自主目標とした試験結果の影響評価値を目安に排水総体の生物影響の低減を図る 等</p>

※1 特定の使い方を事業者に奨励するものではない。特に自主的取組については様々な取組が考えられ、上記はあくまで一例である。

※2 TU（Toxic Unit）：慢性毒性に着目した生物応答試験において最大無影響濃度（NOEC）を算出した際に、 $TU = 100/NOEC$  により算出される値。TU が大きいほど慢性毒性が強い結果であることを表す。

※3 放流先水域の水生生物の生息状況調査結果などと組み合わせることも考えられる。

また、社会的な活用意義としては、化学物質管理推進の観点や生物多様性・水生生物保全等の観点から本手法を活用し、環境報告書やCSRレポートで紹介すること等により関係者への情報発信等に活用することが考えられる。この場合において、本手法を実施していることのみを紹介する場合や、本手法を実施した結果、生物影響が認められなかったことを紹介する場合、TU 値などのデータも含めて紹介する場合など、様々な情報公開の範囲が考えられる。また、情報発信の方法についても、ホームページで公開する他、事業所に来所された方を対象に紹介するなど種々の方法が考えられる。これらについては、本手法を活用する自身の目的等に応じて、各事業者がその公開範囲や方法等について判断することが考えられる。

なお、生物応答試験以外にも、生態毒性が明確な化学物質を使用している場合には個別化学物質の分析・モニタリングを行う、排水放流先の水生生物の生息状況調

査結果を活用するなど、試験精度やコスト等を勘案し、各事業者の目的等に応じて手法を選択することが考えられる。

## 第2章 事業場からの排水に対して用いる場合の主な留意点・考えられる使い方の例

本章では、本手法の活用を自ら考える事業者が、実際の手法の使い方をイメージしやすくなるように、現時点で考えられる手法の使い方の例を含めて記載した。

### 1. 生物応答試験の対象毒性・試験生物種（試験法）

#### （1）試験の対象毒性

##### 【ポイント】

- 試験法には、複数の種類が考えられ、特に試験の対象毒性（慢性毒性又は急性毒性）によっては試験そのものの持つ技術的な意味が異なってくる。
- 水生生物保全に着目した水質環境基準が慢性毒性を考慮して目標値を設定されていることを踏まえ、自主的取組の一つとして本手法の活用を考える事業者は、慢性毒性を優先して考慮することが考えられる。

（注）関連の技術的情報は、[参考資料] 1.（1）参照

##### 【説明】

試験法には、主に試験生物の生死等への影響を評価する急性毒性試験と、試験生物の成長、繁殖等といった個体群維持のために重要な指標への影響を評価する慢性毒性試験に大別され、これらはいずれも WET 試験法として諸外国の制度等で用いられている。

一方で、我が国の水生生物保全環境基準については、公共用水域において通常維持されるべき水質の水準とするため、慢性毒性の観点から目標値が設定されている。

これらから、自主的取組の一つとして本手法を活用することを考える事業者にとっては、水生生物に対する急性影響より慢性影響を優先して考慮する方が選択しやすいと考えられる。

なお、物質の性質としては環境中では短期間しか存在しないものの、それらが継続的に排水に含まれることから水生生物への影響を評価したい場合などには、慢性毒性に着目した試験では影響検出が難しい場合がある。こうした場合には用いる試験法に留意が必要となる。

## (2) 試験生物種と試験法

### 【ポイント】

- 試験生物種としては、生物の栄養段階を考慮した魚類、無脊椎動物（甲殻類等）及び藻類の3生物群から選択することが推奨される。ただし、具体の試験生物種については、ニーズとしては様々なものが考えられ得る一方、信頼性（精度）が確保された試験を実施できることが国内で確認されている試験法は現時点では限られている。
- 国内外で試験精度が確認された生物応答を利用した試験法は様々あるが、排水を対象としており、国内で試験精度、実施可能性等を行政レベルで検証されているのは、現時点では、平成27年に環境省が公表した検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案が唯一の試験法。
- ケースによっては、3生物群全てを用いる必要は必ずしもなく、例えば、排水の影響を受けないことが把握されていること、排水の排出先の水域の状況等を考慮し、一定の合理性があれば一部の生物種の試験を省略することも考えられる。

(注) 関連の技術的情報は、[参考資料]1.(2)参照

### 【説明】

生物応答を利用した生態毒性試験は、国内外の化学物質管理や水生生物保全に関連する制度等において幅広く用いられている。一方で、再現性を含めて信頼できる試験結果が得られることが国際的に広く認められている試験法とそれらに規定されている試験生物種は一定のものに限られている。また、試験生物種については、こうした試験法に由来する制約とは別に、飼育の容易さ等の実務的な制約から国内で安定して調達・利用できる種は限られている。

こうした実務上の制約の下で、国内外の化学物質管理や水生生物保全に関連する制度等においては、水生生物への単一化学物質による有害影響を評価する手法として、生物の栄養段階を考慮した魚類、無脊椎動物（甲殻類等）及び藻類の3生物群から試験生物種を選択することが広く行われている。

こうした試験生物種に関する一般的な状況に加え、平成27年11月に環境省が公表し、意見等の募集をその後行った「生物応答を用いた排水管理手法への活用について」（生物応答を利用した排水管理手法の活用に関する検討会。以下「平成27年検討会報告書」という。）において提案された事業場排水に適用する短期慢性毒性に係る試験法案（以下「短期慢性毒性試験法案」という。）では、

- ・OECDテストガイドライン、米国環境保護庁（EPA）のWET試験など国際的に信頼性が確保されている

- ・ 短期間（比較的 low コスト）で慢性毒性が評価できる
- ・ 国内の試験機関において実行可能である

等の点を考慮し、3 生物群（魚類、無脊椎動物及び藻類）について試験法を示し、具体的な試験生物種としては、魚類はゼブラフィッシュ又はメダカ、無脊椎動物はニセネコゼミジンコ、藻類はムレミカヅキモを推奨種としている。

また、国内外で試験精度が確認された生物応答を利用した試験法は様々あるが、事業場排水に適用できる生物応答試験法として、現時点で排水への適用性や試験精度、国内での実施可能性等が行政レベルで検証されているものはこの短期慢性毒性試験法案に限られている。

なお、生物応答試験の実施に際して 3 生物群（魚類、無脊椎動物及び藻類）から選択することが基本となるが、常時 3 生物群全てを用いる必要は必ずしもない。諸外国の事例等を踏まえると、一部の生物種の試験を省略することに一定の合理性があると考えられる場合としては、例えば、排水性状が安定している場合において、過去に連続してある生物種を用いた試験で生物影響がみられないと判断された場合などがある。また、この他には、排水の排出先の水域の状況等を考慮することも考えられる。

※例えば、OECD テストガイドラインや、諸外国で用いられているその他の WET 試験等、短期慢性毒性試験法案以外の試験法を事業者が自主的に用いることを否定するものではなく、あくまで各事業者が試験結果の信頼性に十分な注意をしてその結果を適切に関係者に説明できることが重要である。

## 2. 生物応答試験の精度

### 【ポイント】

- 排水に対する生物応答試験の結果は、試料に由来する変動の他、各試験機関における試験生物の状態や試験者の技術水準などに伴い変動すると考えられ、この変動のしやすさは使用する生物応答試験の種類（試験法）によっても異なる。本手法を事業者が活用し、試験結果の評価などを行う際には、試験精度を十分に考慮することが必要。
- 諸外国で試験精度が確認された生物応答試験法は様々あるが、国内で試験精度、実施可能性等を行政レベルで検証されているのは、現時点では、平成 27 年に環境省が公表した検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案が唯一の試験法。
- ただし、短期慢性毒性試験法案でも、試験結果をもとに最大無影響濃度（NOEC）を算出する場合、各試験生物種とも中央値に対して 1 濃度区間（排水希釈濃度にして 2 倍）以内のばらつきを伴うなど、具体的な試験精度に十分考慮が必要。

（注）関連の技術的情報は、[参考資料] 2. 参照

### 【説明】

短期慢性毒性試験法案の試験精度は、同試験法案の作成に際して参考とした米国の WET 試験の米国内での実績と比較して、国内でも十分な精度があると言える。

ただし、この試験精度は、NOEC を試験結果に係る指標として用いたときには魚類、無脊椎動物（ミジンコ）、藻類とも概ね中央値に対して 1 濃度区間（排水希釈濃度にして 2 倍）以内のばらつきを伴うものであり、また、排水濃度に依存しない生物影響がみられる場合がある。これに加え、各試験機関における試験毎の「検出力」\*、用いられる試験生物の系統の違い等が試験精度に影響する。試験の活用には、こうした試験精度に関する現状を各事業者が十分に考慮する必要がある。

また、事業場から試験を依頼された試験機関は、試験条件を満たす試験を行うことは当然として、どの試験機関がどのような精度の試験をどの程度のコストで提供しているのかを各依頼者に分かりやすく情報を提供することが望ましいと考えられる。

※ここでは、試験の対照区（排水を対象とする場合、排水濃度がゼロの場合）に対してどの程度の差があるときに、統計学的に有意な差が検出できるかを意味する。対照区および排水濃度区の繰り返し試験間のばらつき等が影響する。

### 3. 排水変動の考慮

#### 【ポイント】

○事業場では、一般に、排水の性状（水質等）が、使用される原材料、生産品、製造プロセス（製造業の場合）、排水処理の方法・プロセス、これらの運転・管理状況等の様々な要因によって変化すると考えられる。このため、こうした変動を考慮して、事業者自らが排水の採取のタイミング・頻度等を決定することが考えられる。

(注) 関連の技術的情報は、[参考資料] 3. 参照

#### 【説明】

本手法を用いて事業場排水の評価等を自主的に行う取組は、現時点では国内では実施例が少ない。また、水質汚濁防止法に基づき全国的かつ多様な業種において従来から行われている事業者の排水管理と異なり、本手法を用いて自主的に生物影響低減策を行う取組も、今後の知見収集が待たれる状況にある。

このため、事業者の業種等に応じてどのようなタイミングで排水の採水を行い、生物応答試験を行うことが最も効果的であるのかは、現時点では十分な知見がないが、諸外国の事例やパイロット事業における取組等を踏まえると、排水処理設備等の設備の更新を行う前後に試験を行うことは、一つのタイミングだと考えられる。

#### 4. 生物応答試験の結果の評価・解釈

##### 【ポイント】

○事業者が、生物応答試験の結果をどのように評価・解釈するのかは、本手法を活用する自身の目的等に鑑みて各事業者が判断することが考えられる。

(注) 関連の技術的情報は、[参考資料] 4. 参照

##### 【説明】

事業者が、排水に対して行った生物応答試験の結果をどのように評価・解釈するのかは、本手法を活用する自身の目的等に鑑みて各事業者が判断する必要がある。

例えば、第1章2. で記述した本手法活用の技術的意義として考えられる「事業場における化学物質管理推進」と「排水放流先の水生生物保全」のそれぞれの目的で手法を用いる際、以下のような評価の方法が考えられる(表2)。ただし、これはあくまで一例に過ぎず、特定の使い方を事業者に奨励するものではない。

表2 手法の試験結果の自主評価の例

活用の目的 (意義)	生物応答試験の結果の自主評価の例
事業場における化学物質管理推進	○自主評価のための任意の影響評価値(TU <sup>*1</sup> 値など)を置く。  (自主評価のための影響評価値の設定の例) ・社内で目標としやすい数字とする ・環境基準に対する排水基準の倍率を参考にする など
排水放流先の水生生物保全	○排水放流先の水域の実態と関連付けて算出される任意の影響評価値(TU値など)を置く。  (自主評価のための影響評価値の設定の例) ・排水の放流先の水域の水量(河川流量等)に対する事業場の排水量の比(希釈倍率)を踏まえる など

※1 短期慢性毒性試験法案(排水の希釈倍率が2倍毎)を用いる場合、具体的な試験濃度区の設定の仕方について、試験機関と相談が必要となる可能性がある。

また、水生生物保全の観点から本手法の活用を考える場合、放流先水域の水生生物の生息状況調査結果などと組み合わせて用いてもよい。

次に、自主評価と試験精度の関係については、生物応答試験の精度には一定の結果のばらつきがある(本章2. 参照)ことを考慮すると、複数回の試験結果がある一定

の幅に収まった場合に応じ、試験結果を踏まえて各事業者が選択するその後の取組を変えることも考えられる。なお、短期慢性毒性試験法案以外の試験法を事業場排水に対して用いる場合については、現状では国内では試験精度の確認が行政レベルでは行われていないことから、現時点では、各事業者において試験機関からの助言等をもとに試験結果を評価することが考えられる。

また、試験結果の評価に用いる試験の回数については、試験の精度及び諸外国の事例を踏まえると、複数回の試験をもって判断することが技術的な観点からは考えられる。ただし、試験の実施回数を増やすことは事業者にとってのコストの増加につながる側面もあり、かつ、現状では排水性状の変動に応じてどのような試験結果が得られる傾向にあるのか等について知見が乏しいため、実際に本手法を事業者が活用する際には、その目的等に応じることが考えられる。

### 第3章 考えられる活用方法とパイロット事業における活用事例・主な留意点

本章では、本手法活用の基本的な考え方を示すとともに、本手法の活用を自ら考える事業者が、実際の手法の使い方をより具体的にイメージしやすくなるように、環境省が平成28年度から平成30年度にかけて実施してきたパイロット事業の概要及びそこで得られた知見等を記載した。

#### 1. 本手法活用の基本的な考え方

##### 【ポイント】

- 本手法を活用し、生物応答試験の結果を踏まえて、生物影響の原因物質究明や影響低減策を検討するかどうかは、自身の目的等に鑑みて各事業者が判断することが考えられる。
- 事業者が、試験の結果によって自主的な取組を検討する場合には、
  - ・各事業場が使用している化学物質等の使用量等を点検して適正化の余地があれば実行するといった自主的な化学物質管理等によっても、環境負荷の低減が図られる
  - ・生物応答試験のみで排水の生物影響の原因が特定可能な訳ではなく、化学分析等も適切に組み合わせることが有効な場合がある
  - ・現時点では、どのようなケースでどの程度影響低減に取り組めるのか知見が乏しいことにも、考慮することが考えられる。

(注) 関連の技術的情報は、[参考資料] 5. 参照

##### 【説明】

事業者等が、生物応答試験の結果をどのように評価・解釈するのかや、生物応答試験の結果を踏まえて自主的な影響低減策を検討するかどうかについては、本手法を活用する自身の目的等に鑑みて各事業者が判断することが考えられる。

事業者が自主的な影響低減策を検討する場合には、米国 EPA が 1989 年～1999 年にかけて発行した毒性削減評価 (Toxicity Reduction Evaluation、TRE) および毒性同定評価 (Toxicity Identification Evaluation、TIE) と呼ばれる手法のガイダンス文書を参考とすることも考えられる (参考資料 5. 参照)。

TRE/TIE 手法は複数のプロセスから構成され、各事業場が使用している化学物質等の使用量等の適正化や排水処理システムの最適化といった、自主的な化学物質管理や施設管理によっても、生物影響の低減が可能となる場合がある。

TRE 手法の目的は生物影響を低減するために適切な対策 (発生源制御や排水処理手法の改善など) を明らかにすることであり、必ずしも原因化学物質を特定する必要は

ない。しかし、発生源を制御するにあたり、原因化学物質を特定する必要がある場合、TIE 手法によって原因究明調査を実施することが考えられる。TIE 手法による原因究明調査では、生物応答試験だけではなく、排水処理を模擬した物理化学的な前処理や化学分析等を適切に組み合わせることで原因化学物質（群）の特定を試みることが有効な場合がある。

米国 EPA のガイダンス文書では、TRE/TIE の一般的な手順や技術的な解説を示すとともに、1970～1990 年代に実施された個別事業場の事例を紹介しているが、現在の我が国の事業場での実施事例は少なく、広く共有されていない。

そのような状況も踏まえ、平成 28 年度から環境省で開始したパイロット事業において、本手法の我が国の事業場での有効性について知見を集積する目的で、一部の事業場で影響低減に向けた取組を実施した（別添 1．参照）。ただし、これらは限られた事例であり、引き続き、広く共有可能な知見が得られるよう情報収集等を行う必要がある。

なお、米国 EPA の TRE/TIE について例示したが、あくまでも一例であり、特定の取組を事業者に奨励するものではない。

## 2. パイロット事業の概要

前述のとおり、本手法の国内での実施事例は限られているため、手法の意義、生物影響低減等に活用する場合の技術的な有効性、課題等について検討していくためには、関係者が共通の理解を持つことができるような形で実態を把握することが重要である。そのため環境省では、本手法を実際の事業場において用いた際の知見を得るため、平成28年度から平成30年度にかけてパイロット事業を行ってきた。

これまでパイロット事業に参加した各事業場の概要を以下に示す。なお、パイロット事業には11業種、14事業場の参加があったが、これらの事業場の結果が各業種を代表するものではないことに留意する必要がある。また、各パイロット事業の詳細については適宜事例集を参照されたい。

表3 パイロット事業参加事業場の概要

事業場名	業種	主な製造品目	パイロット事業参加年度
A	印刷・同関連業	包装関連製品	平成28～30年度
B	化学工業	有機化学物質の合成品	平成28～30年度※
C	プラスチック製品製造業	シート状のプラスチック製製品	平成28～30年度※
D	ゴム製品製造業	ゴム製品等	平成28年度
E	冷凍機・温湿調整装置製造業	極低温冷凍装置（冷凍機、真空ポンプ）	平成28～30年度※
F	玉軸受・ころ軸受製造業	金属製軸受等	平成28年度
G	自動車部分品・附属品製造業	樹脂製・金属めっき製製品	平成28～30年度※
H	自動車部分品・附属品製造業	樹脂製製品・半導体製品	平成28～30年度※
I	自動車部分品・附属品製造業	自動車用金属製クラッチ部品、回転軸部品、バルブ、オイルポンプ、鋳造品	平成28年度
J	その他製造業	プラスチック製製品	平成28～30年度※
K	下水道業	—	平成28～30年度
L	下水道業	—	平成28～29年度※
M	廃棄物処理業	—	平成28年度
N	ごみ（一般廃棄物）処理業	—	平成28年度

※ 平成27年度以前のパイロット事業への参加あり

パイロット事業における各事業場の主な取組内容を表4に示す。なお、パイロット事業においては、参加いただいた事業場の意向も踏まえ取組を実施しており、全ての事業場で同様の調査を行っている訳ではなく、その取組状況も事業場により異なっている。

主な取組内容としては、排水の週間・季節・経年変動の調査、複数の排水経路を有している場合の排水経路別調査、生物影響があった場合の原因究明調査及び影響低減策の実施が挙げられる。その他の取組としては、下水道業における残留塩素の影響調査等を実施した。

次に、平成28年度から30年度の生物応答試験の結果を表5～7、図1～5に示す。複数回試験を行った場合は採水日時順に値を示している。なお、各試験結果は各事業場における主要なものを示している。

表4 パイロット事業における各事業場の主な取組内容

事業場名	TU>10を示した生物			主な取組内容					
	藻類	ミジンコ	魚類	排水評価	排水変動調査※1	排水経路別調査	原因究明調査※2	影響低減策の実施	その他
A	○			○	○		○		
B	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	○			○		○	○		
D	○			○					
E	○	○		○	○		○	○	
F		○		○					
G	○	○		○			○		
H	○	○		○			○		
I		※3		○					
J		○		○			○	○	
K	○	※3		○	○		○		○※4
L	○	○		○	○		○		○※5
M	○			○					
N	○			○					

※1 週間変動、季節変動、経年変化に主眼を置いて調査を実施したもの

※2 単年度のみの実施で、継続調査をしなかったものは除く

※3 ミジンコに対し TU=5

※4 残留塩素の影響調査及び海産生物試験を実施

※5 残留塩素の影響調査及び藻類試験条件の比較を実施

表5 平成28年度の生物応答試験結果

事業場名	最大無影響濃度 (NOEC) (%)			TU (=100/NOEC)		
	藻類	ミジンコ	魚類	藻類	ミジンコ	魚類
A	10	80	80	10	1.25	1.25
B	5	5	40	20	20	2.5
C	40	40	80	2.5	2.5	1.25
D	5	40	80	20	2.5	1.25
E	<5	5	80	>20	20	1.25
F	80	5	80	1.25	20	1.25
G	<5	10	80	>20	10	1.25
H	20	<5	80	5	>20	1.25
I	80	20	80	1.25	5	1.25
J	80	5	80	1.25	20	1.25
K	80	20	80	1.25	5	1.25
L	5	80	80	20	1.25	1.25
M	<5	40	80	>20	2.5	1.25
N	5	80	80	20	1.25	1.25

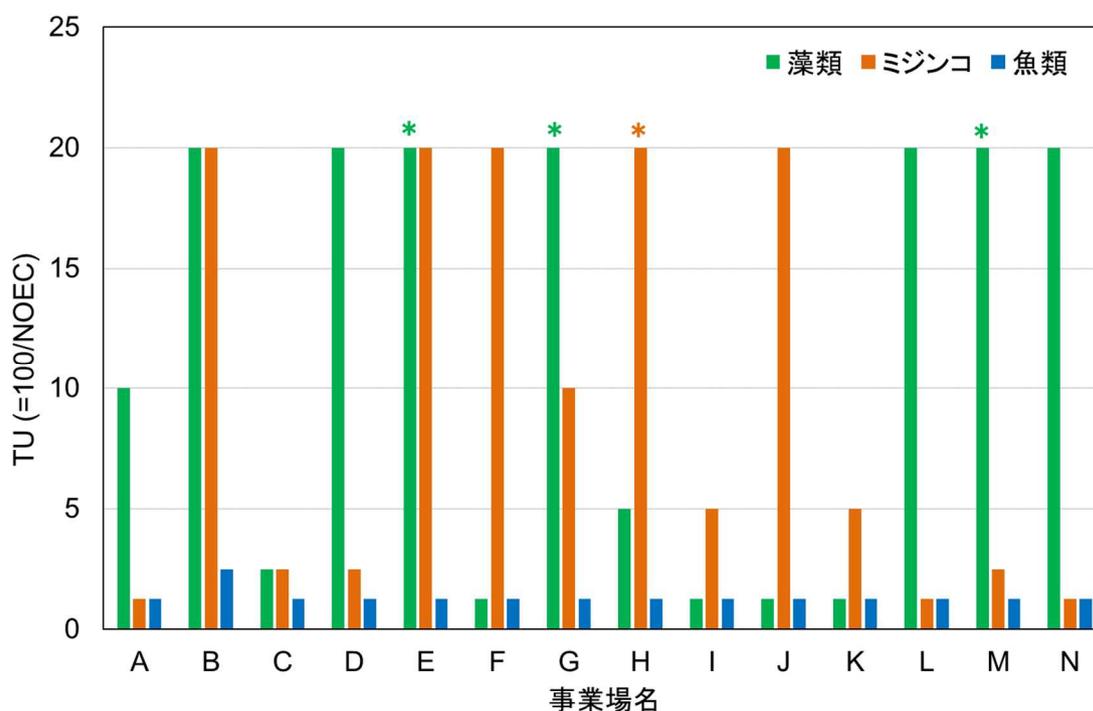


図1 平成28年度の各事業場の生物応答試験結果 (TU)

注 「\*」が付加されているものは「>」(大なり)を表す。便宜上グラフでは20として表記している。

表6 平成29年度の生物応答試験結果

事業場名	試料名 (別添1参照)	最大無影響濃度 (NOEC) (%)			TU (=100/NOEC)		
		藻類	ミジンコ	魚類	藻類	ミジンコ	魚類
A	H29 夏 <sup>a</sup>	<5	40	80	>20	2.5	1.25
	H29 冬 <sup>a</sup>	<5	20	80	>20	5	1.25
B	H29-0 <sup>b</sup>	40	<5	80	2.5	>20	1.25
	H29-1 (B-1) <sup>c</sup>	5	5	40	20	20	2.5
	H29-2 (B-2) <sup>c</sup>	<5	5	<5	>20	20	>20
	H29-3 (B-3) <sup>c</sup>	<5	5	10	>20	20	10
	H29-4 (B-4) <sup>c</sup>	<5	<5	40	>20	>20	2.5
	H29-5 <sup>d</sup>	<5	<5	40	>20	>20	2.5
C	C-3 <sup>e</sup>	<5	10	20	>20	10	5
E	H29-0 <sup>f</sup>	—	1.25	—	—	80	—
	H29-1 <sup>g</sup>	40	0.125	80	2.5	800	1.25
	H29-2 <sup>g</sup>	20	0.125	80	5	800	1.25
	H29-3-1, H29-3-2 <sup>g,h</sup>	40, 40	<0.625, <0.625	80, 80	2.5, 2.5	>160, >160	1.25, 1.25
G	H29	5	<5	80	20	>20	1.25
H	H30	5	<5	80	20	>20	1.25
J	1-J-1 <sup>i</sup>	40	10	80	2.5	10	1.25
	2-J-1 <sup>i</sup>	40	5	—	2.5	20	—
K	H29 夏 <sup>j</sup>	80	20	40	1.25	5	2.5
	H29 冬 <sup>j*</sup>	<5	40	80	>20	2.5	1.25
L	H29 <sup>**</sup>	10	80	80	10	1.25	1.25

<sup>a</sup> 季節変動調査のため9月 (H29 夏) と1月 (H29 冬) に採取した。

<sup>b</sup> 活性汚泥処理検討のため、最終放流口よりコンポジット採取した。

<sup>c</sup> 排水変動調査のため1～2週間に一度採取した。

<sup>d</sup> MBR・AOP 処理検討のため、最終放流口よりコンポジット採取し、2～3か月冷蔵保管後に試験したものの。

<sup>e</sup> 2つの排水経路の混合により最終放流水を模擬したもの。

<sup>f</sup> 原因究明調査のためミジンコのみ試験した。

<sup>g</sup> 排水変動調査のため1～2週間に一度採取した。

<sup>h</sup> 再現性の確認のため同一試料を同一機関で同時に2試験実施した。

<sup>i</sup> 処理装置を試験導入した排水経路の処理前排水。

<sup>j</sup> 季節変動調査のため9月 (H29 夏) と12月 (H29 冬) に採取した。

\* 残留塩素の影響確認試験も別途実施した。

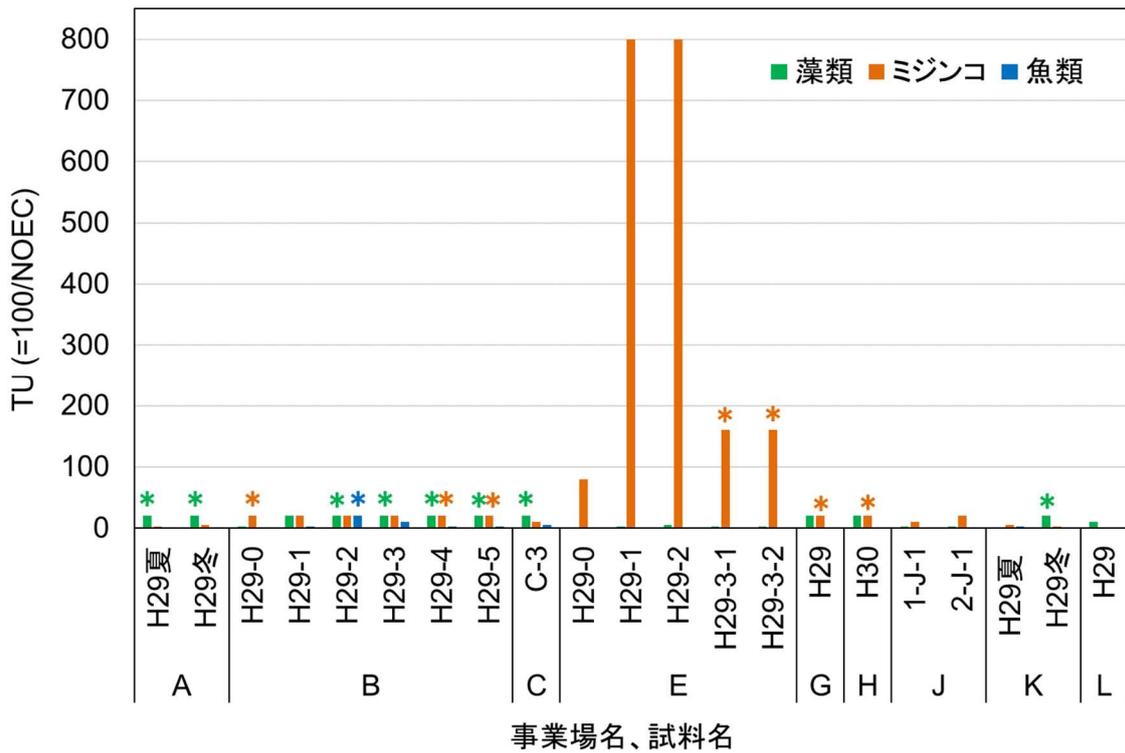


図2 平成29年度の各事業場の生物応答試験結果 (TU)

注 「\*」が付加されているものは「>」(大なり)を表す。便宜上グラフでは20又は160として表記している。

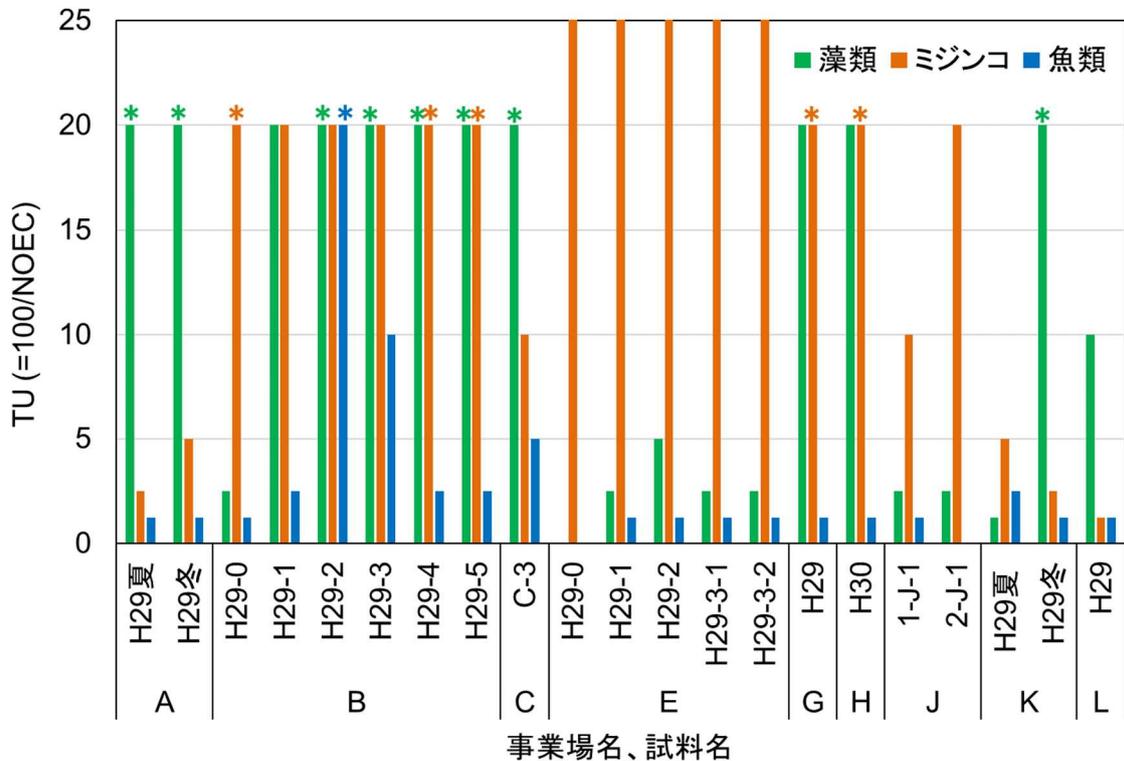


図3 平成29年度の各事業場の生物応答試験結果 (TU) (図2拡大版)

注 「\*」が付加されているものは「>」(大なり)を表す。便宜上グラフでは20として表記している。

表7 平成30年度の生物応答試験結果

事業場名	試料名 (別添1参照)	最大無影響濃度 (NOEC) (%)			TU (=100/NOEC)		
		藻類	ミジンコ	魚類	藻類	ミジンコ	魚類
A	H30 夏 <sup>a</sup>	<5	20	40	>20	5	2.5
	H30 冬 <sup>a</sup>	<5	10	40	>20	10	2.5
B	H30(処理前) <sup>b</sup>	10	1.25	10	10	80	10
C	C-3 <sup>c</sup>	<5	20	40	>20	5	2.5
E	H30 <sup>d</sup>	80	<5	80	1.25	>20	1.25
G	H30	<5	<5	80	>20	>20	1.25
	H30-1	10	<5	80	10	>20	1.25
H	H30-2 <sup>e</sup>	—	10	—	—	10	—
J	3-J-2 <sup>f</sup>	40	<5	80	2.5	>20	1.25
	4-J-2 <sup>f</sup>	—	40	—	—	2.5	—
K	H30 夏	40	40	80	2.5	2.5	1.25

<sup>a</sup> 季節変動調査のため9月 (H30 夏) と12月 (H30 冬) に採取した。  
<sup>b</sup> MBR 処理等の検討のため、最終放流口よりコンポジット採取し、約1か月冷蔵保管していた試料。別途、排水経路別調査を実施。  
<sup>c</sup> 経路別調査において最終放流口より採取した試料。  
<sup>d</sup> 別途、排水処理手法の改良を検討。  
<sup>e</sup> 原因究明調査のため追加採取し、ミジンコ試験のみ実施した。  
<sup>f</sup> 処理装置を実機導入した排水経路の処理後排水の試験結果。ミジンコのみ追加採取し試験を実施した(4-J-2)。

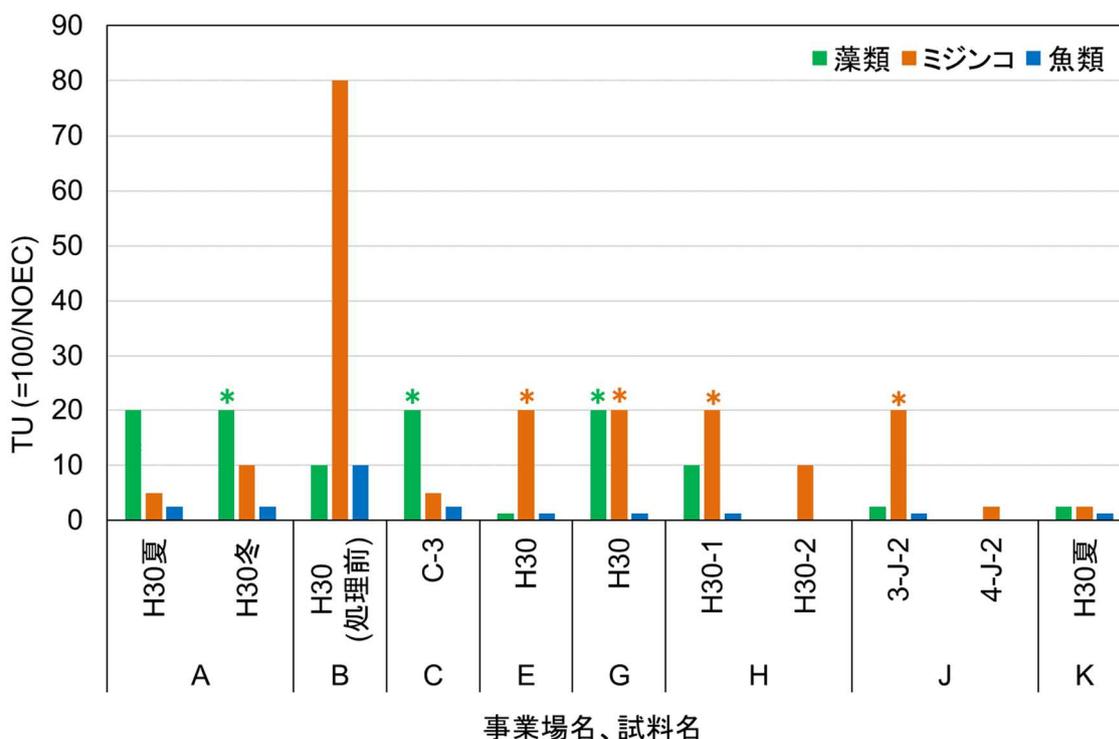


図4 平成30年度の各事業場の生物応答試験結果 (TU)

注 「\*」が付加されているものは「>」(大なり)を表す。便宜上グラフでは20として表記している。

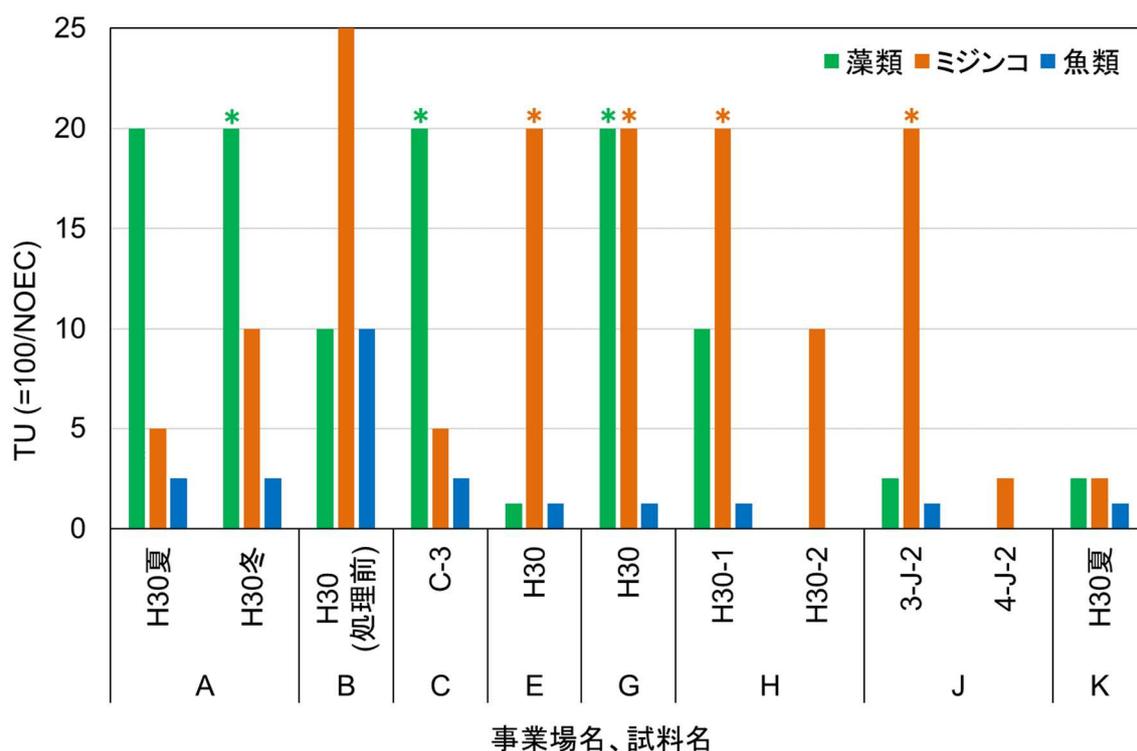


図5 平成30年度の各事業場の生物応答試験結果 (TU) (図4拡大版)

注 「\*」が付加されているものは「>」(大なり)を表す。便宜上グラフでは20として表記している。

なお濃度区は、参考資料1. に示すように、排水濃度80%から公比2で希釈し、5濃度区(すなわち80、40、20、10、5%)で設定することが考えられるが、過去に実施した試験の結果などから適切な濃度区数を設定する。平成29年度のE事業場については、最小濃度5%においても親ミジンコがすべて死亡し産仔が観察されなかったため、更に低濃度まで設定している。また、平成30年度のB事業場についても、先んじて行った調査・検討の結果を受けて、より低濃度まで濃度区を設定している。

次に、パイロット事業における各事業場の原因候補物質及びその特定方法を表8に示す。パイロット事業においては、基本的に、各事業場排水の水質(pH、硬度、全有機炭素、塩分、残留塩素、アンモニア、金属類等)測定結果と、米国環境保護庁の毒性削減評価ガイダンスによる指針値、各物質の毒性データとの比較を行い、それらの結果を基に、必要に応じて追加的な調査を実施し、金属類や有機化合物等の検証を行うなどして原因候補物質を絞り込んでいる(パイロット事業における原因究明調査の手順及び各事業場の取組の詳細についてはパイロット事業事例集を参照)。

表8 パイロット事業における各事業場の原因候補物質

事業場名	TU>10 を示した生物			原因候補物質					原因候補物質の特定方法 (詳細についてはパイロット事業事例集参照)
	藻類	ミジンコ	魚類	金属類	有機化学物質	塩分	残留塩素	その他	
A	○			○			○		<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>相加影響予測との比較</li> <li>相関分析</li> </ul>
B	○	○	○	○	○	○	○		<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>キレート剤添加・固相剤添加固相抽出処理 (TIE) 実験</li> <li>相関分析</li> </ul>
C	○			○	○※2	○		○※2	<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>使用化学物質の SDS 調査</li> <li>排水経路別調査</li> </ul>
D	○			○					<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> </ul>
E	○	○		○					<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>キレート剤添加処理 (TIE) 実験</li> <li>相関分析</li> </ul>
F		○		○					<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> </ul>
G	○	○		○		○	△		<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データ</li> <li>相加影響予測との比較</li> <li>相関分析</li> </ul>
H	○	○		○	△				<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>相加影響予測との比較</li> <li>TIE 実験</li> <li>使用化学物質の暫定リスク評価</li> </ul>
I		※1		○					<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>相加影響予測との比較</li> </ul>
J		○			○				<ul style="list-style-type: none"> <li>使用化学物質の情報収集</li> <li>活性炭処理試験</li> </ul>
K	○	※1				○	○		<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>塩素消毒前後排水の比較</li> </ul>
L	○	○		○			○	△※3	<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> <li>塩素消毒前後排水の比較</li> </ul>
M	○					○			<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> </ul>
N	○					○	○		<ul style="list-style-type: none"> <li>測定値と各物質の毒性データとの比較</li> </ul>

注) △は一部の試料においてのみ原因候補として推定されたもの。

※1 ミジンコに対し TU=5

※2 殺菌剤

※3 アンモニア

パイロット事業における各事業場の主な取組の成果を表9に示す。事業場毎に取組内容やその進捗状況に違いがあるものの、主な取組の成果としては、排水変動の確認・把握、各排水経路の影響の推定、影響原因物質の推定・特定、影響低減策の実施、効果の確認などが挙げられる。

なお、パイロット事業は各事業場の個別の事情や希望に応じて事業を進めているため、同業種であっても、同様の成果を得るために、必ずしもパイロット事業と同様の時間を要する訳ではないことに留意する必要がある。

表9 パイロット事業における各事業場の主な取組の成果

事業場名	主な取組の成果 (対策の効果確認)
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 季節・経年変動を確認</li> <li>・ 影響原因を推定</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 変動傾向、経路別調査から主要な発生源経路を推定</li> <li>・ 影響原因は一定程度推定</li> <li>・ 活性汚泥処理、MBRによる影響削減効果あり。AOPによる影響増加あり</li> </ul>
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 各経路の影響寄与を推定</li> <li>・ 主要な影響原因を推定</li> <li>・ 一部経路の影響が若干低減</li> </ul>
D	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因（亜鉛）を推定</li> </ul>
E	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 変動範囲を把握</li> <li>・ 原因物質（ニッケル）を特定</li> <li>・ ニッケルの削減手法を検討、影響削減効果を確認</li> </ul>
F	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因（亜鉛）を推定</li> </ul>
G	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因（ニッケル、亜鉛など）を推定</li> </ul>
H	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ミジンコへの影響原因（ニッケル、亜鉛など）を一部推定</li> </ul>
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因（ニッケル、亜鉛）を推定</li> </ul>
J	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 活性炭処理装置の試験機・実機レベルで影響低減効果を確認</li> </ul>
K	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 季節変動を把握</li> <li>・ 残留塩素による藻類への影響を確認</li> <li>・ 海産ヨコエビへの急性影響がないことを確認</li> </ul>
L	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 藻類試験条件による差がないことを把握</li> <li>・ 残留塩素による藻類・ミジンコへの影響を確認</li> </ul>
M	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因候補（塩分）を推定</li> </ul>
N	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 影響原因候補（塩分、残留塩素）を推定</li> </ul>

パイロット事業に参加した各事業場の今後の取組予定を表 10 に示す。今回のパイロット事業で得られた知見を踏まえて取組の継続や更なる取組の検討を行う事業場がある一方、生物影響が軽微であった、排水基準項目は遵守している等の理由で今後の取組の予定は特になし事業場もある。

表 10 パイロット事業に参加した各事業場の今後の取組予定

事業場名	今後の取組予定
A	・原因候補物質の非意図的な使用（不純物など）を含めた使用材料等の再調査と代替化の検討
B	・現時点では未定 ・現在、影響低減策について知見を増やしつつあり、影響低減策の全体像が分かるノウハウ事例集を作り、同系統の事業場の対策に活かしたい考え
C	・（原因特定後）対象物質の削減や代替等の検討 ・排水リサイクル率の向上
D	・生物応答試験を継続的（年 1 回程度）に実施 ・特に、今後予定されている排水処理施設の更新に合わせて実施する予定
E	・影響低減策で効果の得られたものについて、設備変更が不要で添加剤の追加等に対応できるものは実施に向けて検討
F	特になし
G	特になし
H	特になし
I	特になし
J	・生物影響低減を図るため、原因究明を推進 ・排水中の含有化学物質の調査、当該物質の生態系への影響調査を進め、それらを除去または無害化するための方策を検討 ・（原因特定後）対象物質の削減や代替等の検討
K	特になし
L	・可能な範囲で残留塩素濃度を低減できるよう検討
M	特になし
N	特になし

### 3. パイロット事業における活用事例と留意点・課題

#### (1) 活用事例

各事業場がパイロット事業に参加した理由、どういった活用を意図して参加したかについては、以下のような内容が挙げられた。

#### 【参加理由・意図】

- ①排水の生物影響の把握、環境負荷低減等の検討（A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 事業場）
  - ・排水基準は厳守しているが、排水の生物影響については未知の部分も多く、基礎的データ収集の一環として参加した。
  - ・排水の環境負荷低減に興味があり、環境影響リスクを定量的に見て問題がある場合は可能な限り低減させたい。
  - ・排水が生物に与える影響を把握し、改善の方向を見いだしたい。
  - ・水濁法等を遵守していれば良いのか、今後の地域共生の観点からも生物影響を評価することは大変重要。
  - ・生物多様性取組みの一環として水生生物への影響を把握することにより、より環境に配慮した水質管理の実施を検討するため。
  
- ②関係者への説明、環境対策の PR への活用（K, N 事業場）
  - ・排水基準を遵守していてもイメージが悪い。生物を用いた試験で良好な結果が得られれば、関係者への説明に活用できるのではないかと考えたため。
  - ・排水の安全性を確認することで関係者からの信頼が高まり、環境対策の PR につながる。生物影響が確認された場合には、施設更新の際の検討対象となる。
  
- ③情報収集等（L, M 事業場）
  - ・地方自治体より紹介があり、興味をもったため。
  - ・生物応答試験に関わる情報収集のため。

以上のように、①では、排水自体の生物影響の把握・評価や、より環境に配慮した水質管理、環境負荷低減等の検討のために本パイロット事業に参加しており、②では、関係者への説明や環境対策の PR に活用するためにパイロット事業に参加していた。また、③では情報収集等の参加理由が挙げられた。

実際にパイロット事業を実施した結果の受け止め・感想としては以下のような意見があった。

#### 【結果の受け止め・感想】

- ①排水の生物影響の把握、環境負荷低減等の検討（A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 事業場）

- ・排水基準よりも厳しい自主基準を設けて管理しているが、排水基準のない項目が生物に影響を与えていることが分かり、さらなる改善の方向性に気づかされた。
- ・生物によってはTUが20を上回ったのでどのような排水が生物に影響を及ぼしたか可能な限り追跡したい。
- ・水質規制上は全く問題なかったが、生物影響が高いことは意外であった。
- ・従来の水質分析では見えなかった排水の特性と生態への影響を定量的に評価でき、更なる水質改善のきっかけとなった。
- ・これまで排水の経路変更を行うなど、可能な対策を実施してきたが、生物応答試験の結果にはあまり反映されず、生物影響を無くすのは非常に困難で大変であると感じた。
- ・規制対象物質以外でも複合的に生物に影響を与えていることを知ることができた。
- ・排水内に混在する化学物質の生物影響はSDSなどで判断するしか無かったため、自社の排水がどの程度生物に影響があるか「まず知る」ことが出来き、今後の改善の道標となった。
- ・水生生物に対しては一律排水基準だけでは気づくことが出来ない影響があること、またそれは何が原因であるのかを追究することの難しさに気づかされた。

### ②関係者への説明、環境対策のPRへの活用（K,N事業場）

- ・良好な試験結果の実績ができたのはメリットがあった。関係者への説明に際して効果的。排水基準対象外物質も含めた総合的な安全性のアピールに役に立った。
- ・試験結果を関係者が見たら不安を抱く恐れがある。

### ③情報収集等（L,M事業場）

- ・藻類に対してはわずかな残留塩素で影響が出ることが判明した。何らかの対策が必要。
- ・パイロット事業により初めて生物応答試験の結果が分かった。

①では、排水の生物影響についての気づきやそれに対応した取組を考えるきっかけとなったという意見が挙がった。一方、対策を実施してきたが生物影響を無くすのは非常に困難で大変であるという意見や、何が原因であるのかを追究することの難しさに気づかされた、という意見もあった。

関係者への説明や環境対策のPRに活用するためにパイロット事業に参加していた②の事業場からは、良好な試験結果の実績ができ、排水基準対象外物質も含めた総合的な安全性のアピールに役に立った、という意見があった一方、結果によっては関係者への説明に活用しづらいことも示唆された。

## (2) 留意点・課題

パイロット事業を実施する中で、各事業場から留意点・課題について主に以下のような意見があった。

### 【生物応答試験のコストについて】

- ・排水の生物影響を自主的に評価しようとした場合、多額の費用がかかることから、継続的な評価は難しいと感じている。
- ・生物応答試験の継続的な実施が必要な場合、コスト負担が大きい。今後の低コスト化が望ましい。
- ・試験頻度と内容がコストに影響すると思うのでコストが課題。
- ・定期実施するとなれば大抵の企業では費用捻出困難になると思われる。
- ・継続的な試験を実施するためには試験費用が高額になると思われる。当該費用の捻出は難しく、試験実施は現実的に困難になるのではないか。
- ・住民アピールには良いが、現時点の一般試験費用は高い。10～20万円/1検体なら実施する。
- ・実際は、試験にかかるコストが一番の課題。今後、生物応答試験を普及させていくには、事業場の負担を軽減させていく必要があると思われる。

### 【専門家からのアドバイスについて】

- ・事業者だけでは影響低減対策ができないので、影響低減対策の計画立案に対して監修・アドバイスがまだまだ必要な段階である。
- ・試験結果の解釈については、専門知見を有する機関の協力が必要となる。特に、生物影響があるという結果が出た場合に、何が影響するのかを特定するには、かなりの専門的な知識が必要であり、事業者独自での対応は難しい。
- ・試験結果の解釈には専門家による診断や判定ガイドラインが必要（結果と想定原因の結び付けは素人には困難）。
- ・調査結果から改善への計画立案、設備改善の提案など、施設管理者だけでは対応が難しい。試験結果を改善へどのように結び付けていくかが課題。
- ・生物応答試験の結果に基づいた研究者の意見を聞ける場の提供、資料提供などを実施してほしい。
- ・結果の解釈に専門家の意見が必要

### 【試験機関について】

- ・試験機関の拡大、試験コストが課題と思われる。
- ・生物応答試験を実施できる試験機関の増加とそれによるコスト低減が必要。
- ・安価かつ高精度の生物試験を行える受託機関の養成

また、残留塩素による影響が確認されたL事業場（下水道業）から以下のような意見があった。

- ・現在、放流水質についてBODや大腸菌群数に厳しい管理目標値が設定されており、残留塩素濃度を低下させにくい状況となっている。放流先環境への影響を考慮し、放流水質と環境影響緩和についてのバランスが重要と感じた。
- ・下水処理水への塩素添加は、殺菌のみならず、放流水中のBODの低減などにも寄与しており、放流水による公共用水域への環境負荷低減のために不可欠な措置であることから、塩素濃度の低減は慎重に行う必要がある。

このように、生物影響の原因物質が公衆衛生確保等の観点からは必要と考えられる場合、水生生物保全のための取組とその他の観点からの取組のバランスを取ることが重要であるため、両者のバランスに十分に留意の上、対策を検討する必要がある。

なお、パイロット事業の結果より、残留塩素による影響は、事業場から採取した排水を試験機関に運搬中または冷蔵保存中に消失し、現行試験法ではその影響を過小評価する可能性が示唆された。そのため、排水口近辺での影響を評価したい場合には、塩素処理前の排水を採取し、事業場と同様の条件で試験機関において塩素消毒を行い、直ちに試験に供するなどの対応が必要である。（詳細についてはパイロット事業事例集のK事業場及びL事業場を参照）

## 第4章 課題と展望

今回、本検討会及びパイロット事業等から得られた知見を基に、本手法の基本的な考え方、活用時の留意点等について中間的にとりまとめを行った。

本手法には、今後更なる知見の集積や考え方の整理等が必要な課題が存在する一方で、これまでの人への影響に主眼を置いた水質汚濁対策を補完し、水環境、とりわけ水生生物の保全につながる可能性もあると考えられる。

一方、水生生物保全や事業場等におけるより高度な化学物質管理の推進等を考える場合には、生物応答試験のみではなく、平時からの使用化学物質の適切な管理・把握、化学分析を活用した原因物質の特定や原因物質特定後の当該物質のモニタリング、生物影響低減策、放流先の水生生物の生息状況調査結果などとの適切な組合せが重要であり、本手法の特性を踏まえた活用方法、その際の他の手法も含めた中での使い方等について、知見の集積を図ったうえで更に明確化していくことが重要である。

本章では、そういった今後の可能性を踏まえつつ、現時点で考えられる主な課題と展望について記載した。

### 1. 生物応答試験を用いた排水の評価手法自体について

パイロット事業において、現在の短期慢性毒性試験法案では下水道業等における残留塩素の影響を過小評価している可能性があることが示唆された。また、事業場等において排水を海域に排出している場合や、海水を冷却水等に使用しており、その排水を生物応答試験で評価したい場合等には、海産生物を用いる生物応答試験に一定の利用ニーズがあると考えられるが、国内では広く実施可能な試験法が確立されていない状況である。その他にも、多様な業種や利用ニーズに対応できるよう、短期慢性毒性試験法案と同等の精度確認がなされた試験方法や現場において活用しやすい簡易的な測定方法の整備・拡充が必要である。

### 2. 生物応答試験を用いた排水の評価手法の活用について

#### (1) 生物影響低減策等の知見の充実

生物応答試験の結果によって、自主的な影響低減策を検討する場合には、化学物質の使用量の点検や、化学分析を組み合わせ生物影響の原因特定等を行うことが考えられる。

今回のパイロット事業では、生物応答試験において生物影響が確認された際に、米国EPAのガイドラインを参考にしつつ、原因物質の推定や影響低減策の検討を行った。一方、EPAのガイドラインが作られてから時間が経っているため、技術の発展に合わせ処理技術等の知見の充実を図ることで、より効果的に生物影響を低減できる可能性がある。また、どのようなケースでどの程度影響低減に取り組めるのかについても知見が乏しいため、今後も事例等知見の収集に取り組む必要がある。

## (2) 公共用水域への生物応答試験の適用

水生生物保全等の観点からは、放流先の公共用水域について評価することが有効であると考えられる。一方、公共用水域の評価のためには、河床の物理的な構造等の水質以外の要因の影響を考慮する必要があり、信頼性が確認された試験方法の確立や、公共用水域を対象として生物応答試験を実施する場合の考え方（採水地点、水生生物の生息状況と水質の関係等）について、知見の集積を図ったうえで整理が必要である。

### 3. その他（本手法の普及関連）

第3章3.(2)で記載したとおり、パイロット事業に参加した事業場からは、生物応答試験のコスト負担が大きいことや、原因究明及び対策の検討は事業場のみでは対応が難しく、専門家・専門機関の支援が必要であるとの意見が多く挙げられた。また、生物応答試験のコストにも関連して、生物応答試験を実施可能な試験機関の充実が必要であるとの意見もあった。

生物応答試験については、国立環境研究所において試験生物の分譲や試験法の実習セミナー等を実施しており、今後もこうした取組を通じて、専門家・専門機関の養成、生物応答試験を実施可能な試験機関の充実を図ることが望ましい。

また、本手法について、より多くの方に認識・理解してもらうよう、環境省等において周知していくことが重要である。

## [参考資料]手法の技術的事項に関する関係資料

1. 生物応答試験の試験法 .....P. 34
2. 生物応答試験の精度 .....P. 41
3. 試験実施のタイミング等 .....P. 43
4. 生物応答試験の結果の評価・解釈 .....P. 44
5. 生物影響低減策の検討に関する米国の事例 (TRE/TIE)  
.....P. 45
6. 過年度の環境省調査事業における生物応答試験結果  
.....P. 50

## 1. 生物応答試験の試験法

### (1) 対象毒性

#### 1) 慢性毒性と急性毒性

生物応答を利用した生態毒性試験には、主に試験生物の生死等への影響を評価する急性毒性試験と、試験生物の成長、繁殖等といった個体群維持のために重要な指標への影響を評価する慢性毒性試験の2種類があり、諸外国の制度等で用いられている。また、対象が排水・環境水ではなく化学物質となる生態毒性試験一般については、国内外の化学物質管理や水生生物保全に関する各種の制度においても、幅広く用いられている。(関係資料集：参考1)

なお、事業場排水や環境水の総体としての水生生物に対する急性毒性と慢性毒性の関係については知見が限られているが、環境省が平成28年度に14事業場を対象に短期慢性毒性試験法案を用いて行ったパイロット事業で得られたデータをもとに、慢性毒性試験期間中又は試験終了時の各試験生物種(魚類、ミジンコ及び藻類)の生存率等から急性毒性が検出された事例を抽出すると、各生物種について慢性毒性が検出された事業場のうち急性毒性も検出されるとみられたものは半数以下であった(魚類は該当なし)。(関係資料集：参考2)

#### 2) 国内での事例

我が国の水質環境基準は、項目によって様々な考え方で設定されているが、項目(物質)の毒性をもとに環境基準を設定している場合、基本的に慢性毒性を考慮して目標値を設定している(関係資料集：参考3)。例えば、水生生物保全に関する制度の一つである水生生物保全環境基準の設定においては、

- ・特に感受性の高い生物個体の保護までは考慮せず、集団の維持を可能とするレベルとする
  - ・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
- 等の観点から、基本的に慢性影響の観点から基準値が設定<sup>(注1)</sup>されている。

#### 3) 海外での事例

事業場排水に対して生物応答を利用した生態毒性試験を制度等として用いている諸外国の事例では、米国、カナダでは慢性毒性試験と急性毒性試験のいずれかが個別の排水実態等に応じて用いられており、ドイツ等では急性毒性試験が用いられている(関係資料集：参考1)。ただし、米国も含めてWET試験に係る制度を導入している各国では、制度の導入時期は主に1970年代から1990年代にかけてであり(関係資料集：参考4)、その当初段階で用いられた生物応答試験は急性毒性試験であった点は共通している(米国では、制度導入後しばらくして慢性毒性試験を用いるようになって

ている)。

また、急性毒性と慢性毒性は水生生物にとって異なる影響をもたらすが、こうした意味とは別に、同じ試験生物種を用いる場合、急性毒性試験の方が慢性毒性試験に比べて試験期間が短い<sup>(注2)</sup>等の要因により、一般に試験コストが低いとされる。

(注1) 水生生物保全環境基準の検討に際しては、検討の対象とされる物質によっては必ずしも慢性毒性試験のデータが十分に得られないこともあり、こうした場合には、実務上は、慢性毒性試験の結果をなるべく考慮することとしつつ、必要に応じて急性毒性試験のデータを活用して慢性毒性値の推定を行っている。

(注2) 国内外の制度(WET試験に係るもの以外を含む)で用いられている急性毒性試験のほとんどは、試験期間が藻類、無脊椎動物及び魚類のいずれでも96時間(4日)以内。短期慢性毒性試験法案では、藻類、無脊椎動物及び魚類のいずれも試験期間が短期間となる慢性毒性試験が提案されており、試験期間は生物種により3日～2週間程度。

## (2) 試験生物種・試験法

### 1) 試験生物種・試験法の概況

排水・環境水に対して適用される生物応答を利用した生態毒性試験は国内外の化学物質管理や水生生物保全に関連する制度等において幅広く用いられている。一方で、再現性を含めて信頼できる試験結果が得られることが国際的に広く認められている試験法とそれらに規定されている試験生物種は一定のものに限られている。また、試験生物種については、こうした試験法に由来する制約とは別に、飼育の容易さ等の実務的な制約から国内で安定して調達・利用できる種は限られている。

このような実務上の制約の下で、国内外の水生生物保全に関連する制度等においては、水生生物への単一化学物質による有害影響を評価する手法として、生物の栄養段階を考慮した魚類、無脊椎動物(甲殻類等)及び藻類の3生物群を用いることが広く行われている。(関係資料集：参考1)

こうした試験生物種に関する一般的な状況に加え、

- ・ OECDテストガイドライン、米国環境保護庁(EPA)のWET試験など国際的に信頼性が確保されている
- ・ 短期間(比較的 low コスト)で慢性毒性が評価できる
- ・ 国内の試験機関において実行可能である

等の点を考慮し、平成27年検討会報告書において提案された短期慢性毒性試験法案では、魚類はゼブラフィッシュ又はメダカ、無脊椎動物はニセネコゼミジンコ、藻類はムレミカヅキモを推奨種としている。短期慢性毒性試験法案における生物種毎の排

水等の試料へのばく露期間は表1のとおりである。なお、この他の慢性毒性試験法・試験生物種で国内の関連制度で用いられている主なもの（底質に係るものを除く）としては、OECD テストガイドライン 211 に基づくオオミジンコ繁殖影響試験（試験期間 21 日）、OECD テストガイドライン 210 に基づく魚類初期生活段階試験（試験期間約 30-40 日）がある。（関係資料集：参考 1）

表 1 平成 27 年検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案の概要

試験法	試料へのばく露期間	参考とした既存の試験法
魚類胚・仔魚期短期毒性試験 (推奨種はゼブラフィッシュ又はメダカ)	ゼブラフィッシュ：8～9日 メダカ：12～16日	OECD テストガイドライン 212 ISO 規格 15088 米国環境保護庁 (EPA) 試験法
ミジンコ繁殖試験 (推奨種はニセネコゼミジンコ)	6～8日	米国 EPA 試験法 カナダ環境省試験法 米国試験材料 (ASTM) ガイドライン
藻類生長阻害試験 (推奨種はムレミカヅキモ)	3日 (72時間)	OECD テストガイドライン 201

一方で、平成 27 年検討会報告書等において検討課題として指摘がある海産生物を用いる試験法については、淡水生物を用いる試験法に比べて国内では試験実績が限定されており、排水・環境水に対して用いる試験法として実施可能なものは現時点で確立されていない。また、公共用水域を対象とした試験については、研究レベルで個別に実施された事例が確認されているが、試験法は現時点では確立されていない。（関係資料集：参考 1）

なお、平成 27 年検討会報告書では、3 生物群（魚類、無脊椎動物、藻類）を用いた生物応答試験の活用を提案しているが、3 生物群をあらゆる場合の試験において常に用いるのかどうか等については、特段記載していない。

この点について、3 生物群に係る WET 試験を整備している米国の事例では、EPA の指針において、過去の試験結果によっては試験に用いる生物種を最も感受性の高いものに限定してよいこととしているなど、常に 3 生物群全てに係る試験を事業者に求めているわけではない。また、ドイツのように、排水基準が業種毎に設定されており、WET 試験に係る基準への適合性を評価する際に用いることが求められる試験生物種が業種により異なる事例もある。（関係資料集：参考 4）

## 2) 短期慢性毒性試験法案の実施手順

平成 27 年検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案をベースとして、実施手順の概要を示す。なお、OECD テストガイドラインや、諸外国で用いられているその他の WET 試験等、短期慢性毒性試験法案以外の試験法を事業者が自主的に用いることを否定するものではなく、あくまでも短期慢性毒性試験法案において考えられる一般的な手順を例示するものである。

### (排水の採取)

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ことが考えられるが、物理的要因により採取が困難な場合や事業者の自主的な取組の目的等に応じて適切な場所を採取地点とすることが望ましい。

採取方法には、大きく分けてグラブ(スポット)採水とコンポジット採水がある。グラブ(スポット)採水は特定の時間に1回のみ採取する方法で、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回のみ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がある。一方、コンポジット採水は持続的または間欠的に採取した排水を混合する方法で、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ある反面、時間とコストがかかるという特徴がある。採取方法についても、時間やコスト、取組の目的等に応じて適切な方法を選択することが考えられる。

### (試料の前処理)

排水(試料)は原則として、採取したままの状態で行うことが望ましいが、必要に応じて次のような前処理を行う。

- ・粗大な夾雑物を除去するため、目開き約 60  $\mu\text{m}$  程度のプランクトンネットですろ過する。なお、藻類生長阻害試験では試料中の浮遊物質や微生物による試験結果への影響を除外するため、さらにフィルター(0.2-0.4 $\mu\text{m}$ )を用いたろ過滅菌を行う
- ・一日に使用する分量ずつ密栓できるガラス製容器に試料を分注し、暗所(または遮光容器)にて冷蔵保存(0~6 $^{\circ}\text{C}$ )
- ・pH が 6.5~8.5 の範囲外である場合、原則 pH 調整をせずに試験に供するが、pH による影響を除外するため、pH 調整した排水で再度試験を行うことも考えられる
- ・溶存酸素量が飽和濃度の 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%以上になった時点で止める

(試験計画の立案)

試料は採取終了時から 36 時間以内に試験に供することが望ましい。そのため、速やかに試験を実施できるよう、採取計画と試験計画を予めよく調整しておき、試験開始の 1～2 週間程度前から試験生物の準備を行なうことが望ましい。

試験に用いる排水は、試験用水（飼育および試験の対照区として用いる標準水/培地）を用いて段階的に希釈して、試験用水（対照区）とともに試験に供する。無希釈の試料を 100%と定義して、例えば 80%から公比 2 で、5 濃度区とする（すなわち、80、40、20、10、5%）ことが考えられるが、過去に実施した試験の結果などから適切な濃度区数を設定する。

表 2 短期慢性毒性試験法案の試験条件

	魚類胚・仔魚期短期毒性試験	ミジンコ繁殖試験	藻類生長阻害試験
供試生物	推奨種：ゼブラフィッシュ、メダカ	推奨種：ニセネコゼミジンコ	推奨種：ムレミカヅキモ
供試齢	受精後 4/10 時間 <sup>a</sup> 未満の受精卵	24 時間齢未満の仔虫	対数増殖期の細胞
試験期間	ふ化日 <sup>b</sup> + 5 日間	最大 8 日間 <sup>c</sup>	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 <sup>d</sup>	生存率、産仔数	生長速度
試験用水	活性炭ろ過水道水		OECD 藻類培地
試験濃度区	排水濃度 80%から公比 2 で適宜希釈		
換水	最低週 3、隔日または中 2 日	週 3 または隔日	なし
試料量/容器	50 mL	15 mL	100 mL
生物数/容器	最低 10、推奨 15 個体	1 個体	5000 cells/mL
繰り返し	4 連	10 連	6 連（対照区） 3 連（濃度区）
試験温度	26±1℃(ゼブラフィッシュ) 25±1℃(メダカ)	25±1℃	23±2℃
光条件	16 時間明: 8 時間暗、室内光		連続光、60-120 μmol/m <sup>2</sup> /s
給餌	なし	あり（毎日）	なし

a: ゼブラフィッシュ 4 時間、メダカ 10 時間

b: 対照区において半数以上の受精卵がふ化した日

c: 供試個体の 6 割以上が 3 回産仔した時点で終了

d: 生存指標=ふ化率×ふ化後生存率

(魚類胚・仔魚期短期毒性試験)

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亜慢性毒性等を評価する。

受精後 4 時間未満 (ゼブラフィッシュの場合、メダカは 10 時間未満) の受精卵を  
実体顕微鏡下で選別し、正常な受精卵を表 2 に示す試験条件で、各排水濃度区およ  
び対照区の試験溶液が入った試験容器に投入する (ばく露開始)。ばく露開始から、  
原則として 24 時間ごとに試験生物の観察を行い、生死及びふ化した個体数や、発  
生異常個体の有無などを記録する。試験期間中は、試験溶液を少なくとも週 3 回、  
2 日または 3 日ごとに換水することが望ましい。

対照区において半数以上がふ化した日から 5 日後にばく露を終了し、各容器につ  
き、ふ化率、ふ化後生存率、生存率、生存指標 (ふ化率×ふ化後生存率) をエンド  
ポイントとして算出する。

#### (ミジンコ繁殖試験)

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  
評価する。

試験に用いるミジンコは、試験開始約 1 週間前から試験条件と同じ環境下で個別  
飼育をおこない、一定の産仔条件等を満たした個体から算出された、生後 24 時間  
以内の仔虫を用いる。表 2 に示す試験条件で、各排水濃度区および対照区の試験溶  
液が入った試験容器に 1 個体ずつ仔虫を投入してばく露を開始する。試験期間中は  
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 (計数後は除去する)。試験溶液は、少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごと  
に換水することが望ましい。

対照区における産仔数を集計し、6 割以上の供試個体で 3 回以上の産仔が確認さ  
れた日をもって、試験を終了とする。ただし、ばく露期間は最長 8 日間とする。エ  
ンドポイントとして各容器につき産仔数を、各試験区につき供試個体の死亡率を算  
出する。

#### (藻類生長阻害試験)

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評価する。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いう。

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。指数増殖期に達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試験条件 (表 2) を満たすように、各試験容器  
の試験溶液に前培養液 (藻類懸濁液) の所定量を無菌的条件下で添加してばく露を

開始する。各試験容器を恒温装置内で振とう培養し、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。各試験容器につき、エンドポイントとして試験期間中の生長速度を算出する。

(最大無影響濃度 NOEC および TU の算出)

各試験のエンドポイントについて、統計学的手法を用いて対照区との有意差が示されない最大濃度区を最大無影響濃度 NOEC (No observed effect concentration) とする。NOEC の逆数を TU (Toxic Unit, 100/NOEC(%)) として算出する。TU は排水を無影響 (NOEC) にするために必要な希釈率を意味する。

## 2. 生物応答試験の精度

平成 27 年検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案の試験精度については、これまでの環境省事業や国立環境研究所で検証等が行われている。これらの検証等では、GLP 取得機関を含む国内の試験機関（9 機関）で同一の試験排水を用いて試験を実施したところ、米国で WET 試験に係る制度が導入されてから 10 年が経過した時点と同等以上の試験精度（試験機関間での試験結果のばらつきが小さい）が確認されている。

具体的な国内及び米国（2001 年時点）での試験結果の試験機関間でのばらつきの程度は、最大無影響濃度（NOEC）では魚類、無脊椎動物（ミジンコ）、藻類とも概ね中央値に対して 1 濃度区間（排水希釈濃度にして 2 倍）以内であり、米国で用いられている IC25<sup>(注3)</sup> で評価した場合には変動係数（Coefficient of Variation、CV）<sup>(注4)</sup> で表現される相対的なばらつきは、概ね 30~40% 台である。（関係資料集：参考 5）

なお、上記に加え、水生生物に対する慢性毒性試験一般や事業場排水に慢性毒性試験を適用する場合、以下のような特徴、動向等がある。（関係資料集：参考 5）

（試験毎の検出力の違い）

短期慢性毒性試験法案に限らず一般に生物応答試験では、試験の成立条件が各試験生物種・試験毎に定められているが、これらの成立条件を満たした試験であっても、検出可能な最小の統計学的有意差は、濃度区数や各試験区の繰り返し結果間のばらつき<sup>(注5)</sup>（標準偏差等で表現）によって異なる。例えば、同一試験条件・同一試験料を用いて独立に行われた試験において、同じ濃度区で平均値では同じ影響がみられても、各試験の試験区内の結果のばらつきによって、対照区と比べて統計学的に有意な差があるかどうかは異なってくる。

短期慢性毒性試験法案では、試験結果に影響すると考えられる事項（供試生物の状態など）の適切な管理や、標準物質を用いた精度管理の実施が推奨されている。

なお、こうした試験毎の検出力の違いは、米国では **Percent of minimum significant difference（PMSD）** の指標等で評価され、各試験機関においてこの指標が一定の基準を満たさない試験結果は信頼性が低いとして当局が受理しないといった精度管理が行われている。また、一般に、生物応答試験において対照区の試験結果のばらつきを管理する場合には、試験生物の繁殖・成長の状態を一定に保つことが有効とされる。

（排水濃度に応じない試験生物への影響がみられる例）

試験精度が低い場合以外にも、必須元素が毒性原因物質の場合、排水低濃度区で対照区より生長等が増加したり、硬度や有機物等による毒性緩和作用がある場合、高濃度区において影響が低くなるなど、排水濃度に応じない影響がみられることが

ある。

なお、米国 EPA では、WET 試験の結果によりみられる様々な排水濃度-影響関係について、試験精度の確認などガイダンスで解釈を示している。

(試験生物の系統の違いの影響)

試験生物の系統の違いによる試験結果への影響（感受性の違い）については、従来からの生物応答試験に係る関係者の間では広く認識されており、この点については、国内では国立環境研究所において一部の試験生物種の系統の確立・維持のための取組が行われている。

(注3) 濃度反応曲線モデルから、阻害率 25%が観察されると推定される濃度。

(注4) 結果のばらつきを、標準偏差を算術平均で割ることで示す量。

(注5) 生物応答試験では、通常、一つの試験濃度に対して複数の検体を準備して試験を行い、結果のばらつきを評価できるようにする。

### 3. 試験実施のタイミング等

試験の実施頻度に関して、平成 27 年検討会報告書では、現行の水質汚濁防止法において通常の事業場の操業状態の下で排水の汚染状態が最も悪いと推定されるタイミングで最低限年 1 回の排水水質の測定を事業者に対して義務付けていることを参考に、本手法を事業者が活用する際にも、最低限年 1 回の生物応答試験の実施が必要とする旨の考え方を提案していた。

一方で、平成 28 年に設置された本検討会におけるこれまでの議論により、本手法が、従来からの水質汚濁防止法等に基づく規制的・制度的なアプローチではなく、自主的にその活用を考える事業者がそれぞれの考えに応じて使い方を含めて選択し、結果としてより良好な水環境の実現に資するものであるという活用意義等が整理されてきた。また、水質汚濁防止法に基づき全国的かつ多様な業種において従来から行われている事業者の排水管理に係る取組の実施実績と比べると、本手法を用いて行う事業場排水の評価やそれを踏まえた事業者による自主的な取組は、現時点では実施例が少ない状況にある。

本事業で実施したパイロット事業においては、経年変化を見るために基本的に年 1 度は試験を行い、さらに季節変動を見るために年に 2 回程度試験した事業場があった。また、生産工程の変動によって、どの程度排水の生物影響が変動するか調べるため、1～2 週間に 1 度の頻度で試験を行った事業場もあった。

なお、WET 試験に係る制度等を導入している諸外国の事例では、米国の場合、EPA の技術指針では制度の対象とされている事業場に対する試験頻度を月 1 回～年 4 回とすることを基本としている。ただし、1 年目に生物影響がみられなかった事業場に対しては 2 年目以降に試験頻度を減らすことを許容する、設備変更等があった場合には基本の頻度に戻すこと等とされている。これらの EPA が定めた指針は、実際には各州で様々な運用されており、排水変動の大小や事業場の規模、過去の試験結果等に応じて異なる。カナダの場合も概ね同様であり、生物影響がみられた場合には試験頻度を増やし、影響が連続してみられない場合には頻度を減らす等されている。（関係資料集：参考 4）

#### 4. 生物応答試験の結果の評価・解釈

平成 27 年検討会報告書では、短期慢性毒性試験の結果の評価方法について、NOEC を算出した上で、現行の水質汚濁防止法の排水基準の多くが環境基準の 10 倍値に設定されていることを踏まえ、3 生物群（魚類、無脊椎動物、藻類）のいずれかに係る生物応答試験の結果において排水が 10 倍超で希釈されないと無影響にならない場合（NOEC の逆数（TU）が 10 超となる場合）には、当該排水について改善を必要と評価することを想定する旨の考え方等を提案していた。この「TU>10」を試験結果の評価の目安とする考え方は、上記報告書がその後の検討のたたき台であることも勘案した上で、本手法の活用が事業者にとっての自主的な取組として行われるものであっても、一定の評価の目安を行政から示す方が本手法の活用を考える事業者にとって有用ではないかとの考え方から、環境基準と排水基準の関係に着目して提案されたものである。なお、水生生物保全環境基準等の設定に際しては、毒性データが得られている種がその物質への感受性において最も感受性が強い種であるとは限らないことから、生物種による感受性の違い（種比）を考慮することとしている。この際、種比に係る係数として「10」を用いているものが多い。（関係資料集：参考 3）

一方で、実際の環境基準と排水基準の関係には様々な場合があり、特に水生生物保全に係る項目（亜鉛）を含めた生活環境項目の場合には、排水処理技術等を考慮して排水基準が環境基準の 10 倍値とされていないものもある（関係資料集：参考 6）。なお、水質汚濁防止法の一律排水基準は、国が全国一律に設定する排水基準であり、同法の枠組みでは、地域（水域）の実情に応じ、都道府県が国の一律排水基準より厳しい基準（上乘せ排水基準）を定めることができるようになっており、水域に応じた排水対策の実施は地方自治体に委ねられている。

なお、短期慢性毒性試験法案の試験精度については、2. で記載したとおり、試験結果に一定のばらつきが生じるものである。

また、WET 試験に係る制度等を導入している諸外国の事例のうち、米国等では、排水の排出先の受水域において希釈された状態で無影響であることに基づき、事業者が毒性削減を行うべき排水の基準値が算出される一方、ドイツ等では、利用可能な最良の技術（Best Available Technique、BAT）を考慮して、業種等に応じて一律的に毒性削減を必要とする TU 基準値を設定している。また、いずれの場合も、排水性状の変動や試験精度を考慮して基準値が定められている。排水や試験結果の変動への考慮として、米国の場合、多くの州で複数回の試験結果で基準超過率が 25%（4 回に 1 回）以上のとき毒性削減を事業者に求めている。（関係資料集：参考 4）

## 5. 生物影響低減策の検討に関する米国の事例（TRE/TIE）

我が国の場合、本手法は規制的・制度的なアプローチではなく自主的なアプローチであるため、事業者にとっての位置付けは異なるが、WET 試験に係る制度を導入している諸外国では試験結果に応じて影響低減策が事業者により行われている。

また、米国 EPA が 1989 年（産業系事業場）及び 1999 年（下水処理施設）に発行した影響低減策に関するガイダンス等では、毒性削減評価（Toxicity Reduction Evaluation、TRE）と呼ばれる手法により事業者が影響低減策を進める際の一般的な手順を示すとともに、個別事業場の事例を紹介している。これらの事例は、1970～1990 年代の事例であり、各事例で紹介されている取組が現在の我が国の事業場で有効かは定かではないが、WET 試験を化学分析等と組み合わせて活用することで、排水の生態毒性の低減が行えることは示されている。（関係資料集：参考 4）

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に示す。主に 6 段階から構成され、第 1 段階および第 2 段階では、使用化学物質や処理方法の情報収集と最適化を行う。ここまでの段階で影響低減が図れなかった場合、原因物質群を特定するため、第 3 段階の毒性同定評価（TIE: Toxicity Identification Evaluation）へと進む。ここでは、排水処理と生物応答試験、化学分析を併用して、どのような排水処理によって影響が低減できるか、ひいては、そのとき削減された原因化学物質（群）は何かを推定する。第 3 段階で影響を低減できる処理手法あるいは原因化学物質（群）が特定された後は、第 4 段階～第 6 段階において毒性物質を低減するための具体的な対策を事業場において検討していく流れとなっている。

環境省が平成 28 年度に 14 事業場の協力を得て開始したパイロット事業においても、平成 29 年度は 9 事業場、平成 30 年度は 8 事業場が継続参加し、このうち一部の事業場において、各事業者の意思に基づき、排水の生物影響の原因調査や影響低減に向けた取組（米国の TRE 手法に準じた取組）を実施した。また、平成 27 年度以前の環境省事業に参加したことがある 7 事業場について試験結果の経年変化を見ると、これまでに具体的な影響低減策を行った事業場においては、生物影響が一定程度改善につながったことが示唆される結果が得られている。しかし、国内では、生物応答試験を活用して生物影響の低減に至った具体的な事例が乏しく、知見が不足している状況である。

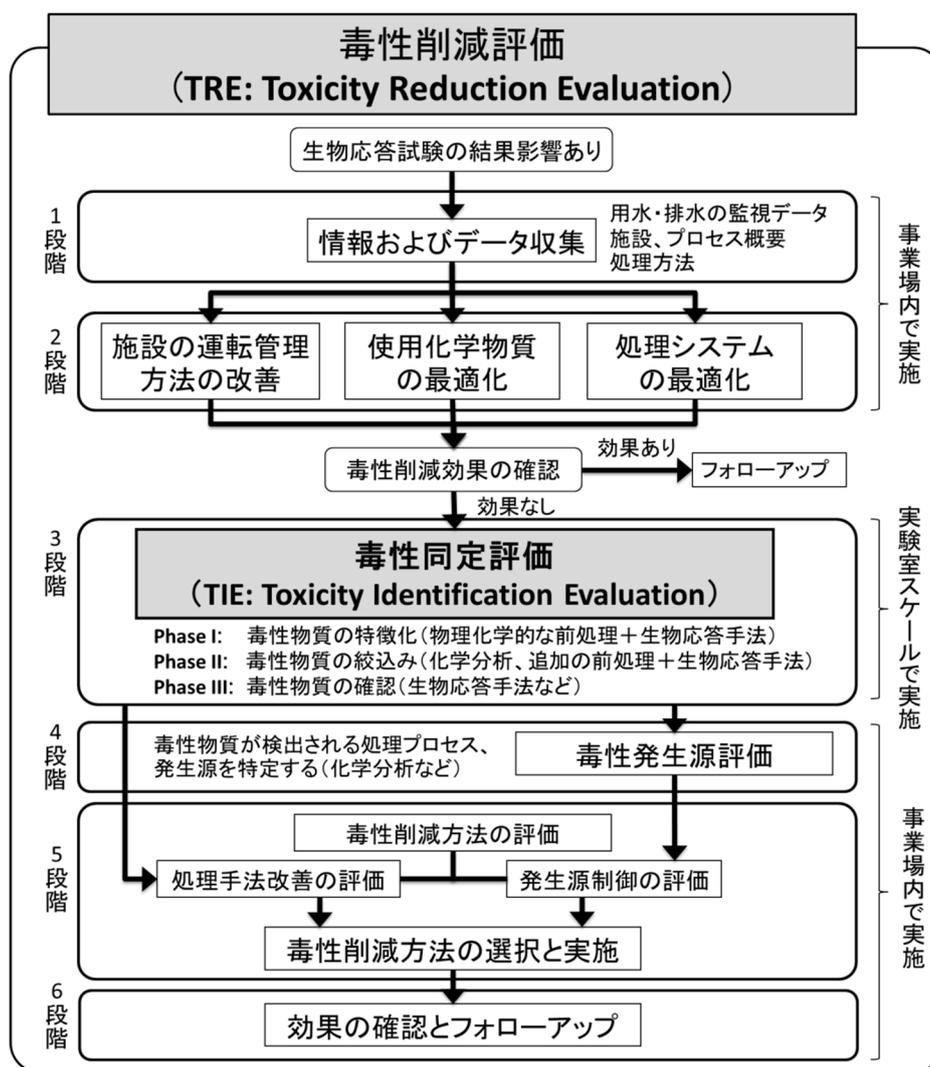


図 毒性削減評価 (TRE) の概要と手順

TRE/TIE の実施手順の各段階についてより詳細に解説する。

[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、生產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つの負荷削減策のいずれか (またはすべて) を実施する。

- 使用化学物質の最適化

代替品への変更や使用量の削減

- 処理手法の最適化

既存の処理システムの処理性能が最大限になるよう改善する。例えば粉末活性炭投入量の増加や変更、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、化学物質を取り扱う機具やエリアの管理、排水経路や漏水の確認などの見直しなどを行う。

この段階で問題となった排水の影響を削減出来た場合、TRE は終了となる。削減できない場合は第3段階としての毒性要因評価（TIE）を行う。

### [第3段階] 毒性同定評価（TIE）

第3段階のTIEは排水影響の原因となる化学物質（群）を特定する、あるいはそれらを削減することができる処理手法を特定する。原因推定の概念は、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、未処理の排水より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）を原因化学物質として推定できるというものである。例えばキレート処理（金属のフリー態の減少）によって生物影響が低減した場合は、金属類が主要な原因化学物質群として推定される。推定のプロセスは、Phase I の特徴化、Phase II の同定、Phase III の確認、という3つの手順により構成される。

- Phase I（特徴化）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（あるいは原因物質）の特徴化を行う。排水処理を模擬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して推定する。
- Phase II（同定）では、Phase Iにおいて主要原因として推定された化学物質群から原因物質の絞込み（同定）を行う。必要な場合、Phase Iと同様に排水の物理化学的な前処理と生物応答試験を用いて、排水中の特定の物質群の生物影響を確認する。さら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毒性データが入手可能な場合は、最大無影響濃度（NOEC）等と排水中濃度を比較し（各物質のTU(=濃度/NOEC)を算出)、排水中濃度の方が高い場合(TU>1)は原因物質候補とする。ただし、個別では毒性レベルではなくとも、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 IIIにおける確認が必要である。

- Phase III（確認）では、Phase II で推定された原因物質（群）候補が、真に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。複数サンプルにおける濃度と生物影響の相関性を評価する方法、毒性症状や種による感受性差を利用する方法、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を確認するスパイク法などがある。

TIE で重要なことは、特定の原因化学物質（群）を同定することではなく、原因となる化学物質の特徴を把握し、どのようにそれが除去できるか明らかにすることである。具体的には、排水に対して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なら、その処理によって削減（または変化）された物質の中に原因化学物質が含まれていたと考える。この時に効果的だった影響の削減方法は、第5段階での生物影響の低減のヒントになる。

例えばキレート処理によって金属類を除去して毒性が削減された場合、原因物質（群）は金属類の可能性が高く、金属類を除去するような排水処理を導入すれば毒性が低減される可能性が高いと考えられる。同様に、例えば排水のpHを一度アルカリ側にして沈殿等を処理し、再度中性にして試験した際に毒性が削減されたのであれば、アルカリ側で分解または沈殿する物質群が原因化学物質である可能性がある。この時、アルカリで分解する物質としては様々な有機化合物が挙げられ、アルカリで沈殿する物質にも様々な金属類が含まれるため、これだけでは原因物質を推定できるわけではないことに注意が必要である。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とも、影響を低減することができる場合がある。

第3段階において毒性物質（群）の特定ができなかった場合、第4段階としてどこかの製造工程において毒性が発生しているのか調べる。

#### [第4段階] 発生源評価

第4段階では、第3段階で特定した原因物質（群）について、ピンポイントでその最適な処理を行うために、その物質（群）がどの工程で発生しているか特定を試みる。原因物質（群）の化学分析または生物応答試験により、発生源であると疑われる工程排水について調査する。第3段階で原因物質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。発生源に関する情報が得られない場合は、各排水経路の排水について、生物応答試験または化学分析を行い、発生源の特定を試みる。

第3段階および第4段階で原因化学物質の特定または発生源調査が終了後、その具体的な処理方法について第5段階で検討・実行する。

#### [第5段階] 生物影響低減方法の選択と実施

第3段階、第4段階の結果を受けて、生物影響低減方法を検討・実行する。原因化学物質の発生源の処理プロセスを見直し、原因化学物質が生成されないようにする方

法と、発生した原因化学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。現実的に原因化学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事業者が判断する。

[第6段階] 確認とフォローアップ

最後は処理排水の生物応答試験を実施し、生物影響削減の確認を行う。排水の生物影響が目標とするレベルまで改善したか、生物応答試験による定期的なモニタリングによって確認する。または、特定した原因化学物質のモニタリングを行ってもよい。削減効果が確認できれば TRE 終了となる。

これらの段階的アプローチは必ずしも順番に実施する必要はなく、事業場に応じて、適切と考えられる手順で行ってよい。TRE/TIE の本事業における適用事例については別添パイロット事業事例集に取りまとめた。

## 6. 過年度の環境省調査事業における生物応答試験結果

環境省においては、別添パイロット事業事例集にまとめた平成 28 年度から平成 30 年度かけて実施した取り組み以前にも、事業場に協力いただき、排水について生物応答試験を実施している。以下に、平成 21 年度から平成 27 年度にかけて環境省の請負業務において生物応答試験を実施した結果を参考までに示す。

表 過年度の環境省調査業務における生物応答試験結果

年度	事業場 番号※	試料 番号	業種	最大無影響濃度 (NOEC) (%)			TU (=100/NOEC)		
				藻類	ミジンコ	魚類	藻類	ミジンコ	魚類
平成 21 年度 : 4 業種 16 事業場 16 試料	1	1	化学工業	6.25	1.56	6.25	16	64	16
	2	2	〃	80	80	80	1.25	1.25	1.25
	3	3	〃	40	50	80	2.5	2	1.25
	4	4	〃	80	80	80	1.25	1.25	1.25
	5	5	〃	20	12.5	40	5	8	2.5
	6	6	ゴム製品製造業	40	100	100	2.5	1	1
	7	7	〃	25	50	100	4	2	1
	8	8	〃	40	3.125	80	2.5	32	1.25
	9	9	電気業	20	10	40	5	10	2.5
	10	10	〃	6.25	6.25	25	16	16	4
	11	11	〃	20	5	20	5	20	5
	12	12	〃	13	12.5	25	8	8	4
	13	13	廃棄物処分業	20	2.5	80	5	40	1.25
	14	14	〃	100	100	100	1	1	1
	15	15	〃	100	100	100	1	1	1
	16	16	〃	100	100	100	1	1	1
平成 22 年度 : 3 業種 11 事業場	17	17	化学工業	40	20	10	2.5	5	10
	18	18	〃	40	10	5	2.5	10	20
	19	19	〃	>80	5	20	1.25	20	5

17 試料	20	20	〃	>80	10	>80	1.25	10	1.25
	21	21	〃	>80	20	40	1.25	5	2.5
	21	22	〃	>80	40	40	1.25	2.5	2.5
	21	23	〃	>80	20	20	1.25	5	5
	21	24	〃	>80	80	>80	1.25	1.25	1.25
	21	25	〃	>80	80	40	1.25	1.25	2.5
	21	26	〃	20	2.5	40	5	40	2.5
	21	27	〃	>80	10	20	1.25	10	5
	22	28	ゴム製品製造業	>80	80	>80	1.25	1.25	1.25
	23	29	電気機械器具製造業	40	10	20	2.5	10	5
	24	30	〃	10	10	>80	10	10	1.25
	25	31	〃	2.5	5	>80	40	20	1.25
	26	32	〃	>80	>80	80	1.25	1.25	1.25
	27	33	〃	>80	10	>80	1.25	10	1.25
平成 24 年度 :	28	34	化学工業	5	5	5	20	20	20
3 業種	29	35	金属製品製造業	5	<5	>80	20	>20	1.25
3 事業場	30	36	電気機械器具製造業	>80	5	>80	1.25	20	1.25
3 試料									
平成 25 年度 :	31	37	食料品製造業	10	10	80	10	10	1.25
9 業種	32	38	パルプ・紙・紙加工品製造業	40	<5	80	2.5	>20	1.25
15 事業場	33	39	化学工業	80	80	80	1.25	1.25	1.25
15 試料	34	40	〃	80	80	80	1.25	1.25	1.25

	35	41	〃	40	80	10	2.5	1.25	10
	36	42	窯業・土石製品製造業	<5	40	80	>20	2.5	1.25
	37	43	はん用機械器具製造業	80	<5(<1.25)	80	1.25	>80	1.25
	38	44	〃	40	80	80	2.5	1.25	1.25
	39	45	電子部品・デバイス・電子回路製造業	80	10	80	1.25	10	1.25
	40	46	輸送用機械器具製造業	5	<5 (2.5)	80	20	40	1.25
	41	47	〃	10	<5	80	10	>20	1.25
	42	48	下水道業	80	40	40	1.25	2.5	2.5
	43	49	〃	80	<5	80	1.25	>20	1.25
	44	50	〃	80	80	80	1.25	1.25	1.25
	45	51	廃棄物処分量	40	10	80	2.5	10	1.25
平成 26 年度 :	46	52	化学工業	20	<5	80	5	>20	1.25
3 業種	46	53	〃	20	<5	80	5	>20	1.25
5 事業場	47	54	〃	20	<5	10	5	>20	10
8 試料	48	55	〃	40	<5	80	2.5	>20	1.25
	49	56	はん用機械器具製造業	40	80	80	2.5	1.25	1.25
	49	57	〃	40	80	80	2.5	1.25	1.25
	50	58	電子部品・デバイス・電子回路製造業	40	<5	40	2.5	>20	2.5
	50	59	〃	40	5	80	2.5	20	1.25
平成 27 年度 :	51	60	医薬品製造業	40	80	80	2.5	1.25	1.25

5 業種	52	61	飲料・たばこ・飼料製造業	10	10	40	10	10	2.5
6 事業場	53	62	化学工業	40	80	80	2.5	1.25	1.25
6 試料	54	63	その他の製造業	<5	<5	80	>20	>20	1.25
	55	64	プラスチック製品製造業	<5	20	<5	>20	5	>20
	56	65	化学工業	<5	<5	20	>20	>20	5

※事業場番号は年度毎にカウントしているため、同一の事業場であっても年度が異なっていれば別々にカウントしている。