

水生生物を用いた水環境保全手法（仮称）の  
活用の手引き（仮題）  
（中間とりまとめ）（素案）

平成 年 月

生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会

※ 手法の名称及び本とりまとめの題名については、検討会において検討していくこととする。

## 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きており、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」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●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等について検討を行った。

本検討会では、この手法の名称を、「水生生物を用いた水環境保全手法」（仮称）と名付け、今般、これまでに得られた知見をもとに、特に事業場において本手法を活用することを自ら考える事業者等に向けた活用の手引き（仮題）として、中間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 . . .
2. 基本的な用語について . . .

#### 第1章 水生生物を用いた水環境保全手法（仮称）の概要と意義

1. 手法の概要 . . .
2. 手法の活用意義 . . .

#### 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） . . .
2. 生物応答試験の精度 . . .
3. 排水変動の考慮 . . .
4. 生物応答試験の結果の評価・解釈 . . .
5. 生物影響低減対策の検討と生物応答試験活用の有効性 . . .

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

1. パイロット事業の概要 . . .
2. パイロット事業における活用方法と課題・留意点 . . .

#### 第4章 課題と展望 . . .

[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について
2. 生物応答試験の精度について
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. 生物影響低減対策の検討と生物応答試験活用の有効性

(別添)

1. 関係資料集
2. パイロット事業事例集

## 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「水生生物を用いた水環境保全手法（仮称）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活用することを考える事業者（事業場）にとって、実際に本手法を活用する際に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「パイロット事業における活用事例・考えられる活用方法と主な留意点」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、第2章に記載した内容に関する知見等は、その概要を本資料の参考資料として記載し、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. 基本的な用語について

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。

#### 【水生生物を用いた水環境保全手法（仮称）】

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、多種多様な物質を含む事業場排水や環境水の水生生物に対する影響を総体として評価し、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手法。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、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。

#### 【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、事業場から排出される排水や環境水に対して水生生物を用いて行うも

のを指し、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、その上で更に進んだ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 水生生物を用いた水環境保全手法（仮称）の概要と意義

### 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、事業場から排出される排水や環境水といった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、一般には結果に信頼性（精度）が得られる試験生物種が用いられ、その際、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や環境水の水質を適切に把握したり、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う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。

#### 【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、多種多様な物質を含む事業場排水や環境水の水生生物に対する影響を総体として評価し、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手法である（詳細は第2章、第3章（予定）参照）。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等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。



なお、環境水（公共用水域）に対して用いる場合については課題と展望として第4章に記載し、以降の本章から第3章では事業場排水に対して本手法を用いる場合について整理した。

## 2. 手法の活用意義

### (1) 手法の活用意義について

#### 【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、これにより排水基準等の法令を遵守する事業者の取組を補完。
- 事業者にとっては、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等に気づくきっかけとなる場合がある。また、化学物質管理推進の観点から本手法を実施し、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。

##### 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。
- 事業者にとっては、生物多様性・水生生物保全等の環境保全の取組の一つとして本手法を実施し、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。

(注)「事業場における化学物質管理推進」は、関連度合いは事例により様々でもひいては「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】

公共用水域の水質指標としては、環境基本法に基づく水質環境基準（以下単に「水質環境基準」という。）が設定されており、その達成率は全国的には改善傾向にある。

一方で、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生息状況、その保全に対するニーズ等に十分に答えられない場合もあると考えられる。

このようなニーズ等がある場合、本手法を活用し、排水に対して生物応答試験を用いることで、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自主評価し、必要に応じ評価結果を踏まえた排水等の自主改善を図る取組を行うことは、一つの手段になる場合があると考えられる。この場合におけ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2通りが考えられる。また、これらの意義と「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排水等の自主改善」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」※1	
	生物応答試験の結果の自主評価	評価結果を踏まえた排水等の自主改善
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 など</li> </ul>	<p>○自主改善目標とした試験結果の影響評価値を目安に、排水総体の生態毒性値の改善を図る。</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。</p> <p style="text-align: right;">など</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。※2</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 など</li> </ul>	<p>○自主改善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態毒性値を改善を図る。</p> <p style="text-align: right;">など</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「自主改善」については様々な取組が考えられ、上記（生態毒性値の改善等）はあくまで一例である。なお、留意点は第2章参照。

※2 放流先水域の水生生物の生息状況調査などと組み合わせてもよい。

また、本手法活用の社会的意義としては、化学物質管理推進の観点や生物多様性・水生生物保全等の環境保全の観点から本手法を実施し、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。

## 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、実際の手法の使い方を本手法の活用を自ら考える事業者が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】

- 排水に対して生物応答試験を用いる際には、複数の種類（試験法）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】

生物応答試験には、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に大別され、これらはいずれも事業場排水に対して生物応答試験を適用する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使う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】

- 生物応答試験法の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】

生物応答試験を含めた生態毒性試験は、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、藻類はムレミカツ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態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）に対してどの程度統計学的に有意な差のある試験結果が得られるのかを意味する。各試験機関における対照区の試験結果のばらつきの管理状況等が影響する。

### 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対策を行う取組も、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。

(パイロット事業の取り組みを踏まえ、有用な例を適宜追記)



#### 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、排水に対して用い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「排水中の化学物質管理」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>*1,2</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 <sup>*1</sup> 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 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、 $TU = 100/NOEC$  により算出される量。TU が大きいほど慢性毒性が強い結果として表される。

※2 この場合、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、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。

## 5. 生物影響低減対策の検討と生物応答試験活用の有効性

### 【ポイント】

- 生物応答試験の結果を踏まえて自主的な影響低減対策を検討するかどうかは、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。
- 事業者が、試験の結果によって自主的な影響低減対策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
  - ・生物応答試験の活用のみで排水の生物影響性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（第1章参照）
  - ・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】

事業者が、生物応答試験の結果をどのように評価・解釈するのは、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、生物応答試験の結果を踏まえて自主的な影響低減対策を検討するかどうかについても、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対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生じた場合、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) の特定を試みるの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。そのため、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、TRE/TIE 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2．参照）。これらは限られた事例であり、継続中の取組もあるため、引き続き、広く共有可能な知見が得られるようフォローアップを行う必要がある。

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。

*（パイロット事業の取り組みを踏まえ、適宜内容を更新）*

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

(事業の進捗、参加(協力)事業者の意向等を踏まえ、記載を検討。事業者のご意向によるものの、本章全体で5～10ページ程度を想定。)

本章では、実際の手法の使い方を本手法の活用を自ら考える事業者がより具体的にイメージしやすくなるように、環境省が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. パイロット事業の概要

#### 2. パイロット事業における活用方法と課題・留意点

## 第4章 課題と展望

(今後の議論も踏まえて追記。2ページ程度を想定。)

[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について

### (1) 対象毒性

#### 1) 慢性毒性と急性毒性

生物応答試験には、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、事業場排水に対して生物応答試験を適用する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いく)。



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試験を含め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以外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。

(パイロット事業で得られた知見などを踏まえ、適宜修正・追記)

#### (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 μm 程度のプランクトンネットをろ過する。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（0.2-0.4μm）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℃）
- ・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°C (ゼブラフィッシュ) 25±1°C (メダカ)	25±1°C	23±2°C
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と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 とする。NOEC の逆数を  $TU (=100/NOEC (\%))$  として算出する。

## 2. 生物応答試験の精度について

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（No observed effect concentration、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）

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について

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事業者による自主的な改善等に係る取組は、現時点では実施例が少ない状況にある。

*(試験実施のタイミング等パイロット事業で得られた有用な知見を適宜追記)*

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 年目に生態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に運用されており、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、生態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・解釈について

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。

また、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. 生物影響低減対策の検討と生物応答試験活用の有効性について

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として検討しているため、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対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）について発行した影響低減対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対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、排水の生態毒性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）が進められている。また、これまでに、参加 9 事業場のうち平成 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整理したところ、これまでに具体的な影響低減対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、関係者に広く共有される形では、これまで知られていない状況である。

*（パイロット事業の取り組みを踏まえ、適宜内容を更新）*

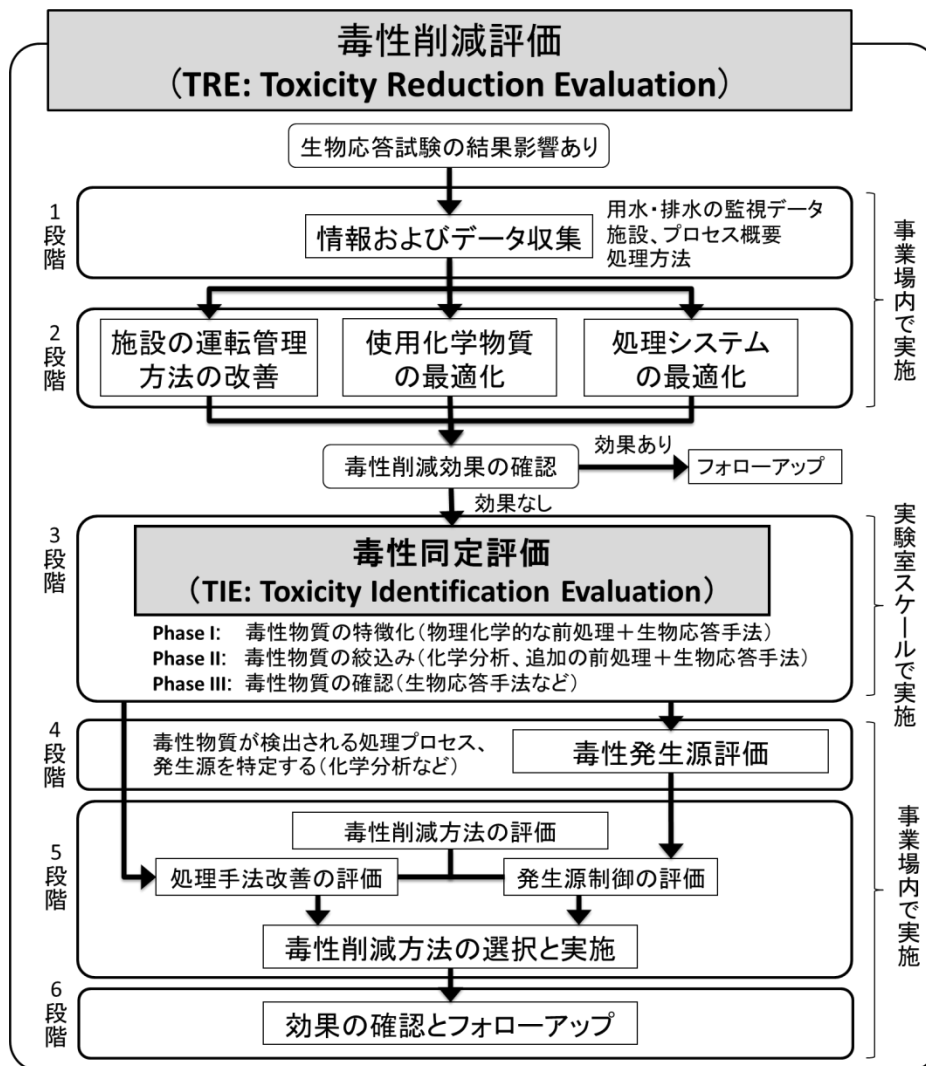


図 毒性削減評価 (TRE) の概要と手順

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: No observed effect concentration) 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不可欠である。

- Phase III（確認）では、Phase II で推定された原因物質（群）候補が、本当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、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重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、最適な手順で行ってよい。TRE/TIEの本事業における適用事例については別添2. パイロット事業事例集に取りまとめた。