

非遺伝子組換え微生物によるバイオレメディエーション

利用指針について

(案)

平成16年 月 日

第1 はじめに

バイオレメディエーションとは、微生物を用いて汚染物質を分解・無害化することによって、土壌、地下水等の環境修復を図る技術である。環境修復のための環境汚染浄化の技術的手法としては、物理的手法、化学的手法及び微生物機能の活用等の生物学的手法が存在するが、微生物を用いるバイオレメディエーションは、投入エネルギーが少なく、多様な汚染物質への適用可能性をもち、一般的に浄化コストも低いことから、主要技術の一つとなる可能性を有すると考えられている。バイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションについては、近年環境浄化技術としての注目度が高まっており、今後の利用拡大が期待されているところである。

この中で、微生物の開放系利用に際しては、周辺の生態系などへの影響評価を適切に実施する必要があり、その安全性確保が求められているところであるが、非遺伝子組換え微生物によるバイオオーグメンテーションに関する国の施策は、現状以下のように定められている。

通商産業省（当時）では、平成10年5月に、「組換えDNA技術工業化指針」の改訂を行い、生物的環境修復等の開放系利用を指針の対象に加え、非組換え微生物等についても、「当分の間、本指針を準用する」こととした。

また、環境庁（当時）では、平成11年3月に、揮発性有機化合物による地下水汚染を微生物を利用して浄化する際の環境影響を防止するため、「微生物を用いた環境浄化の実施に伴う環境影響防止のための指針」を策定した。

このように非遺伝子組換え微生物を利用したバイオレメディエーションに関しては、その安全性に係る指針が経済産業省と環境省に並立して存在するため、平成14年12月に策定された「バイオテクノロジー戦略大綱」において、一元化を含めた制度の検討を行う必要が指摘されているところである。

本報告書は、これらを受けて、経済産業省及び環境省が合同で検討会を設置し（産業構造審議会化学・バイオ部会組換えDNA技術小委員会開放系利用技術指針ワーキンググループ及び中央環境審議会水環境・土壌農薬合同部会バイオレメディエーション小委員会）非遺伝子組換え微生物によるバイオレメディエーションの中でも、特にバイオオーグメンテーションの利用指針についての考え方を検討し、とりまとめたものである。

なお、我が国においては、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」を締結するため、2003年6月、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（以下、カルタヘナ法）」を制定し、2004年2月19日に議定書が我が国について発効すると同時にカルタヘナ法が全面施行されたところであり、開放系におけるバイオオーグメンテーションに使用される遺伝子組換え微生物については、カルタヘナ法に基づき使用の承認が行われることになっている。このため、新たな制度の検討に当たっては、カルタヘナ法の枠組みを参考とした。

：非土着微生物を導入することによる環境修復をバイオオーグメンテーション、土着の微生物に栄養源

や酸素を加えて活性化することによる環境修復をバイオスティミュレーションという。

第2 バイオレメディエーション利用の現状

バイオレメディエーションには汚染土壌を掘削して処理する方式 (ex situ 又は on situ) と原位置で処理する方式 (in situ) とがある。また、微生物の利用方法により分類すると、土着微生物を活性化させるバイオスティミュレーションと非土着微生物を導入するバイオオーグメンテーションとがある。

土壌汚染修復におけるバイオレメディエーションは、海外では 1980 年代から実用化され、汚染サイトの浄化に適用されるようになった。バイオレメディエーションの先進国である米国では、1980 年代末から 1990 年代にかけてバイオレメディエーションが商業化された。1989 年の Exxon Valdez Spill (エクソン・バルディーズ号のアラスカ原油流出事故) の後、技術的進展が加速したとされる。

日本では、湾岸戦争で汚染されたクウェートの油汚染土壌をバイオレメディエーションにより浄化する実証試験を PEC ((財)石油産業活性化センター) が 1990 年代に実施した。また、有機塩素化合物による汚染については、1995 年に環境庁(当時)の調査の一環としてバイオスティミュレーションの実証試験が行われた。また通商産業省(当時)所管の RITE ((財)地球環境産業技術研究機構)は、1995 年から 2000 年の期間でバイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーションの実証試験を実施した。これらの取組により、日本においてもバイオレメディエーション技術が急速に進歩した。近年では、ダイオキシン類などの難分解性有機汚染物質の分解に対するバイオオーグメンテーション技術の適用に関する研究開発も行われている。

また、バイオレメディエーションの運転管理や安全性評価のため、微生物のモニタリング手法の研究開発も進んでおり、MPN 法、免疫学的手法、PCR-DGGE 法等の微生物解析技術の応用が試みられているところである。

以上のように、バイオレメディエーションは土壌・地下水等の環境修復において今後有望な技術の一つと位置づけられ、その更なる技術的進展が期待されているところである。

第3 検討の対象

環境汚染浄化の対象物質は、比較的分解しやすい油類、分解が遅い化学物質(トリクロロエチレン、長鎖炭化水素、多環芳香族等)及び金属類等であり、特に、分解が遅い化学物質の浄化への対応として、バイオレメディエーションのうちバイオオーグメンテーション技術が期待されている。

今回の検討においては、安全性の評価が適切に実施可能なもの、かつ、事業者のニーズの高いものを対象とするという考え方のもとに、最近の技術の進歩や利用動向を踏まえて、非遺伝子組換え微生物によるバイオオーグメンテーションを対象として検討した。なお、バイオスティミュレーションについては、今回の検討の対象としないが、開

放系における実施に当たり、本報告の適用が可能な部分は、その考え方にのっとって管理されることが必要と考える。

また、浄化場所としては、開放系利用を前提に、自然条件下の限定された区域の土壌や地下水等を対象とした。

利用される微生物に関しては、生態系等への影響（人への健康影響も含む。以下、同じ）を評価するためには、その特性についての知見が必要であることから、株レベル（不可能な場合は属又は種レベル）で同定された単一菌又は既知の複数菌（コンソーシア）を取り扱うこととした。

：「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」において、「セルフクローニング」、「ナチュラルオカレンス」に起因する生物は、遺伝子組換え生物等には含まれないと整理されていることから、本指針の対象とする。

第4 バイオレメディエーションの実施についての基本的な考え方

バイオレメディエーションについては、安全性の確保に万全を期すること及び住民等の科学的な安全性情報の理解を促進し、バイオレメディエーション事業の健全な育成を図り、環境修復を促進する観点から、国が安全性評価のガイドラインを示すことが必要である。

なお、このガイドラインの策定においては、昨年6月に定められた「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく開放系使用における生物多様性影響評価の枠組み、考え方は、非遺伝子組換え微生物のバイオレメディエーションの安全性評価を実施していく上でも基本的には同様な概念であることから、同法を参考とすることが適当である。ただし、この法律は遺伝子組換え生物等を対象としたものであることから、非遺伝子組換え微生物の利用に際しては、バイオレメディエーションを実施する者（以下、「事業者」という）の過度の負担とならないよう配慮する必要がある。

事業者がバイオレメディエーションを用いて浄化を実施するに当たっては、管理の徹底、安全性の確保のために、以下の手順で行うことが望ましい。各項目の詳細については、次項で記載する。

1. 「浄化事業計画」の策定
2. 生態系等への影響評価の実施
3. 浄化事業の実施
4. 浄化事業の終了

（参考）「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の概要

「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び

これに基づく省令、告示等では、開放系での組換え生物等の利用に当たって、利用する生物等の種類の名称、使用等の内容及び使用等の方法について定めた「使用規程」を作成し、主務大臣の承認を受けることとされている。また、承認を受ける場合には、生物多様性影響について評価を行い、その結果を記載した生物多様性影響評価書を提出することになっている。この生物多様性影響評価においては、分類学上の位置づけ等、使用等の歴史、生理学的・生態学的特性（生息可能な環境条件、寄生性等、繁殖・増殖の様式、病原性、有害物質の産生性等）について情報を収集した上で評価するとされている。さらに、事故時の措置等についても規定されている。

第5 手順の詳細

1. 浄化事業計画の策定

事業者は、次項に定める生態系等への影響評価とあわせて、浄化事業を行うに当たって、事業の内容を明確にし、定められた内容を確実に実施するために、以下の内容を含む「浄化事業計画」を作成し、これに従って事業を行うことが適当である。なお、土壤汚染対策法、水質汚濁防止法、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律等の関係する法令を遵守することは当然のことである。

(1) 利用する微生物の種類の名称

(2) 浄化作業等の内容

浄化対象物質及び想定される濃度

浄化対象物質の浄化目標濃度（以下、「浄化目標」という。）

浄化技術の内容（詳細は2. . (2) 参照）

浄化事業期間

・浄化作業期間（浄化準備開始から浄化目標達成時までをいう。）

・モニタリング期間

(3) 浄化作業等の方法

作業区域の設定（詳細は2. . (3) 参照）

浄化場所の情報

微生物の作業区域への導入

・微生物の導入方法

・利用微生物と同時に導入する物質（詳細は2. . (2) 参照）

安全管理方法

・利用微生物の拡散防止対策

・添加物の拡散防止対策

・浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む）の拡散防止対策

・その他安全管理の方法

モニタリング方法

・浄化事業の終了方法とその手順

・事業に関する記録の方法

(4) 緊急時の措置

偶発的事故対策

その他安全管理の方法

2. 生態系等への影響評価の実施

生態系等への影響評価について、以下に掲げる情報を収集した上で、これらの情報を用いて行う。個々の評価の結果を踏まえ、生態系等への影響があるか否かを総合的に判断することとなる。また、評価に用いる情報は最新の科学的知見によることが必要であり、評価項目や評価に用いる情報等については、今後の科学的知見の充実、影響評価に関する国際的動向等を踏まえて、必要に応じて見直しを行うことが適当である。

なお、評価に当たり収集した情報の出典及び評価を行うに当たり用いられた情報の出典(当該情報が学識経験者又は評価を行う者の有する知識又は経験に基づくものである場合はその旨)が明らかになるように記載する。

・評価に必要とされる情報

(1) 利用微生物の情報

分類学上の位置付け及び自然環境における分離源、分布状況

使用等の歴史及び現状

生理学的及び生態学的特性

- ・基本的特性
- ・生息又は生育可能な環境の条件 (微生物の生存が有利になる条件、生存を制限する条件等)
- ・寄生性又は共生性
- ・繁殖又は増殖の様式
- ・病原性、毒性 (人及び主要な動植物等に対する影響)
- ・有害物質の産生性
- ・その他の情報

利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

なお、既存情報が全く無い場合又は既存情報において疑いのある情報がある場合は、人や主要な動植物への影響に関する情報について、必要に応じて動植物試験等を実施する。

(2) 浄化技術の情報

浄化技術の内容

計画しているバイオレメディエーション技術について、利用微生物の土壌・地下水等への導入方法、条件等の基本的な技術的原理を説明する。

分解生成物及び分解経路

バイオレメディエーションを実施した場合に生成することが考えられる分解生成物及び想定される分解経路について、既存資料の調査や事前実験（後述）により有害性の有無を確認する。

対象場所における利用微生物の挙動等

- ・生存・増殖能力及び生残性
- ・拡散の特性
- ・自然生息域（あるいは周辺の非汚染地域の生息環境）と作業区域の生息環境の比較、選択圧
- ・他の微生物群の変化

栄養物質等を添加する場合は、その内容

- ・添加剤の名称（CAS 番号）、化学構造式、分子量
- ・性状及び分解性、毒性等安全性
- ・導入の目的
- ・導入量
- ・導入濃度・頻度
- ・環境基準等の規制値に関する情報
- ・二次汚染の可能性がある物質を用いる場合は、その情報（物質名、有害性、導入時の濃度、導入量、残留性及び作業区域での拡散性）
- ・その他副次的な影響

(3) 浄化場所の情報

場所の情報

利用しようとする微生物を導入する場所について、以下のような情報を収集する。作業区域を特定しない場合においては、利用環境を具体的に想定する。

作業区域等の特徴

- ・位置
作業区域の位置・周辺状況等
- ・現場における汚染原因等
汚染原因及び現在の状況等

- ・ 水文地質学的特性
作業区域の地質条件、帯水層の分布、地下水の水位等水理地質学的特性
- ・ 生息する主要な動植物
作業区域内及び作業を実施する場所に生息している主要な動植物。特に、保護の対象となる生物種や利用する微生物の病原性、毒性によって、影響を受けやすいことが知られている生物種については詳細に情報収集する。
- ・ 土地利用の状況
作業区域の土地利用の状況について、工業地域、商業地、住宅地等の別を明確にする。また、作業区域が住宅地にある場合には、在住人口、工業地域等の場合には労働人口等について情報を収集する。さらに河川水及び地下水の飲料用水や工業用水、灌漑用水等としての利用の状況についても情報を収集する。
- ・ 作業区域周辺の特徴
必要に応じ、上記を参考に情報を収集する。

浄化対象物質の情報

対象物質の化学構造式、分子量、CAS 登録番号等、性状及び分解性、毒性等安全性等を明確にする。

また、既存の法規等により当該物質に関係する規制がある場合には、その基準値等参考となる情報を収集する。

以上の情報について、根拠となる文献等を明確にする。

汚染状況

利用微生物の導入予定場所に存在する浄化対象物質の状況について、水平分布、垂直分布に関する情報を収集する。複合汚染が見られる場合はその状況についても情報を収集する。

- (4) 実験室等での使用等又は開放系での使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果及び国内外における使用等に関する情報
- (5) 上記の情報の一部を用いる必要がないと考える合理的な理由がある場合には、それらの情報を収集しなくてもよい。ただし、その理由を示すこととする。
- (6) 上記以外の情報を収集する必要が生じた場合には、当該情報を追加して収集する。

・評価の実施

事業者は、収集した情報及び浄化事業計画の案に基づき、以下の項目ごとの評価結果の概要及びこれらの評価結果を踏まえた総合的な判断の結果によって、浄化事業に伴う生態系等への影響を評価する。なお、評価を行う者が行った判断については、その判断の根拠を明らかにする。

- ・ 微生物群集の組成変化（利用微生物が増殖することにより他の微生物を有意に減少させる性質）
- ・ 利用微生物が作業区域及びその周辺における主要な動植物（人を含む）に対する病原性、毒性の有無並びに作業区域及びその周辺の生態系にその他の有害な影響を及ぼす可能性。
- ・ 利用微生物が浄化作業終了後（注）に増殖する可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した措置。
- ・ 浄化作業終了後の有害な分解生成物の有意な残留可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した措置。
- ・ 浄化に当たって栄養物質等を添加する場合は、浄化作業終了後の当該物質の有意な残留可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した措置。
- ・ 浄化作業に伴う浄化対象物質（必要に応じ中間生成物を含む）の拡散の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した措置。
- ・ 浄化作業の実施に係る生態系等への影響の防止の措置が講じられていること。
- ・ 浄化作業の実施中における緊急時の措置が明らかにされていること。

（注）浄化作業終了後とは、設定目標達成後をいう。以下同じ。

3. 浄化事業の実施

浄化作業は浄化事業計画に従って、行われることとなる。

4. 浄化事業の終了

浄化作業終了後、浄化対象物質、利用微生物、分解生成物、添加栄養分等の濃度等が終了基準に達したことを確認して浄化事業終了とする。浄化事業終了の基準は、以下に定める。

- ・ 浄化対象物質が、浄化事業計画に定めた基準に達したこと
- ・ 利用微生物が、浄化作業終了後に増殖、又は高濃度に残留しないこと
- ・ 分解生成物が、浄化作業終了後に有意に残留しないこと
- ・ 添加栄養分等が、浄化作業終了後に有意に残留しないこと
- ・ この他、浄化事業計画に定めた事項が遵守されていること

第6 国による確認

浄化事業が実施されるサイトでは周辺住民の理解(パブリックアクセプタンス)が必要であるが、バイオレメディエーション事業は、安全性についての理解が得られにくいことがあることから、科学的知見に基づく住民の理解をより促進するための一助として、浄化事業計画がガイドラインに適合していることについて、国の確認を受けることができる制度を設けることが望ましい。

事業者は、国の確認を受ける場合には、生態系等への影響評価についてこのガイドラインに定めるところにより評価を行い、その結果を記載した書類(以下「生態系等への影響評価書」という)とともに、浄化事業計画を盛り込んだ申請書を国に提出する。国は、以下の観点から、提出された浄化事業計画の確認を行うこととなる。

- ・ 生態系等への影響評価の結果及び学識経験者から聴取した意見の内容に照らし、当該計画に従って浄化事業を行った場合に生態系等に悪影響を及ぼすおそれがないと認められる計画であること
- ・ 利用微生物の特性又は当該計画の内容及び方法に応じ、実験室等での使用等又は浄化事業が予定されている環境と類似の環境での使用等を行うことにより、生態系等への影響を評価するための情報が得られていること。
- ・ 利用微生物の特性又は当該計画の内容及び方法に応じ、生態系等への影響の効果的な防止に資する措置が確実に講じられるものであること。

また、確認に当たっては、微生物や土壌、地下水等についての広範かつ専門的な知見を必要とすることから、学識経験者から意見を聴取した上で判断されることが適当である。

また、国は、確認の日以降の科学的知見の充実により、確認を受けた浄化事業計画に従って浄化事業が行われる場合においてもなお生態系等への影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、学識経験者からの意見を聴取した上で確認を取り消すとともに、必要に応じ、その知見について関係者へ周知する必要がある。

第7 浄化事業の実施に当たっての留意事項

浄化の実施にあたって留意すべき事項について、以下に記述する。

1. モニタリング

事業者は、浄化事業計画に基づき、浄化事業期間(浄化事業計画に定めた期間)内のモニタリングを実施することとする。モニタリングについては、以下の項目において行うこととする。

- ・ 浄化対象物質
- ・ 利用微生物及び他の微生物の変化
- ・ 分解生成物(必要に応じ中間生成物を含む)

- ・添加栄養分等
- ・その他必要な項目

2．緊急時の対応

作業の実施中に、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた場合や事故が発生した場合には、事業者は、環境影響を防止するために必要な措置を講じる必要がある。また、第6項の国による確認を受けた事業者は、その旨を速やかに国に連絡することとする。

3．実施体制

バイオレメディエーションの安全で的確な実施を確保するため、実施体制を整備することが必要である。このため、事業所の長は、浄化事業ごとに全体の管理を行う者及びそのものを補佐する者を任命し、安全管理業務を遂行させ、さらに、安全・環境管理について助言を行う委員会を設置することが適当である。

4．地域の理解

本指針にしたがって汚染浄化を実施しようとする者は、事業を円滑に実施する観点から、必要に応じ、作業に関する情報を提供すること等により、地域住民等に説明し、理解を得ることが適当である。

(用語)

MPN法：MPN法は、培養法の一つで、Most Probable Number法の略である。液体の選択培地等に、希釈した試料を接種し、特定の微生物を選択的に培養する方法である。希釈率および増殖が認められたチューブの数から、統計学的に菌数を推定することができる。特定微生物の検出や定量には有効であるが、培養不可能な微生物には適用できない。

免疫学的方法：タンパク質を利用したモニタリング法の一つであり、目的の微生物が産生する特異的なタンパク質を免疫学的に検出する方法である。モノクローナル抗体やポリクローナル抗体が用いられる。免疫学的方法の一つであるELISA法(Enzyme-linked Immunosorbent assay法)は、抗体または抗原を酵素で標識化することにより対象を高感度に検出することができる。ただし、抗体を得るには、目的の微生物の単離培養が不可欠であり、また、近縁な微生物との特異性のチェックが必要である。なお、同じく免疫学的手法としては、蛍光標識した抗体を用い抗原との結合を蛍光顕微鏡によって観察する、蛍光抗体法がある。

PCR-DGGE法：PCR-DGGE法は、核酸を利用したモニタリング法の一つで、Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis法の略である。環境中の微生物群集について、PCRで遺伝子を増幅し、それぞれの塩基配列の違い(微生物種の違い)により電気泳動度が異なることを利用して、変性剤の濃度勾配を形成させたゲル上で微生物群集を分離する方法である。微生物を単離培養しなくても、微生物群集を再現性よくプロファイリングすることが可能である。さらに、DGGEで得られたバンドを切り出して塩基配列を決定することにより、微生物の系統関係を明らかにすることができる。ただし、PCRを用いて遺伝子増幅を行っているため、定量性に欠けることに注意を要する。

その他の微生物モニタリング手法としては、以下の方法が挙げられる。

T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法

PCR-サザンプロット解析法

リアルタイムPCR法