

<特集>

バイオアッセイを用いた環境分析・計測の動向

Environmental Instrumentation of Bioassay: a Comprehensive Review

○庄司 良¹, 迫田章義²¹ 東京工業高等専門学校*² 東京大学生産技術研究所○Ryo Shoji¹, Akiyoshi Sakoda²¹ Tokyo National College of Technology² Institute of Industrial Science, University of Tokyo

Abstract

Bioassay, directly based on evaluating toxicity effects on organisms, can reflect the cumulative and synergistic effects of all the chemicals including unknown in environment. Among various bioassays, rapid and simple bioassay for detecting toxicity must be developed in very near future. We expect them to be employed in the future in environmental risk management alongside chemical analysis. The Japanese Ministry of Environment has been supporting multi-center validation projects, aimed at assembling bioassay results based on over 20 kinds of bioassays. To examine the applicability of various bioassays in the practical use in environment, cost, simplicity, rapidity and sensitivity of each bioassay are also compared with each other. The feasibility of cost-effective bioassays to evaluate the toxicity of environmental water or waste material has been found. For evaluating the toxicity of solid materials, such as solid wastes and polluted soils, leaching test and chemical analysis, which aimed to decrease toxicity mainly in heavy metals, are conducted to estimate the impact on environment. From a view of whole toxic evaluation, no bioassay and leaching test were standardized for the waste management in Japan, and no system is available to evaluate the toxicity in order to reduce toxic substances. More detailed methodology and technology on bioassay should be developed to evaluate the toxicity of all the environment using bioassays.

Key Words : Bioassay, Environment, Monitoring, Waste

1 はじめに

今日、環境中には1万種類を凌駕する多種多様な化学物質が存在し、有害物質による環境汚染はヒトを含む生物、生態系に重篤な被害を与えることがある¹⁾。このような被害を未然に防ぐため現行の環境管理体系では、主に事前審査と事後審査という方法で対応している。事前審査は、化審法で定められている様に、新規化学物質が上市する前にその有害性を判定し、有害性が大きければその物質の販売、流通、使用に制限をかけることで有害性による環境汚染を事前に防止する方法であり、事後審

査は有害性が示されている化学物質について一定の環境基準値を設け、環境分析・計測手法でその濃度を測定し、基準値以上であれば水処理などの対策をとる方法である。しかし、新規化学物質の増加速度の早さのみならず、処理による副生成物の生成、微量有害物質、環境中変化体、未知物質、有害性未評価な物質の存在や複数の化学物質の相互作用による複合毒性の発現²⁾など、既存の環境分析・計測手法だけでは有害性の予測が困難になっている状況がある³⁾。加えて、環境中に存在する多種多様な化学物質のうち、化学分析によって特定できる物質の割合はわずかであり、例えば廃棄物処分場浸出水の場合、総有機炭素量のうち特定できた有機物の量は1%未満である⁴⁾。大部分の化学物質は未知物質ということになり、事

*〒193-0997 東京都八王子市櫛田町1220-2

TEL:0426-68-5076 FAX:0426-68-5099

E-mail:shoji@tokyo-ct.ac.jp

後審査として個別物質の濃度を規制する現行の環境管理では、ヒトを含む生物、生態系に対する被害を未然に防止することが困難な状況になってきている。特に、水環境汚染の一原因として挙げられる廃棄物最終処分場の適切かつ効率的なリスク管理のためには、有害な化学物質が処分場の浸出水となって環境中に放出される前に、事前に対策をとる必要性が叫ばれている。その対策として浸出水の水処理や遮水工の整備の他、処分場に搬入される廃棄物の質を評価し、有害性ポテンシャルが大きければ処分場への直接搬入を認めず、焼却などの中間処理を行うことが考えられる⁵⁾。しかし、廃棄物試料の有害性を評価する際に行われる溶出試験と重金属を主な対象とする化学分析では、適切に有害性を見積もることは困難である。

このような困難な状況に対し、有望な環境分析・計測手法としてバイオアッセイが注目されている。バイオアッセイとは生物を用いてその応答性から化学物質や環境試料の有害性を評価する手法である。バイオアッセイはヒトや生態系が被る有害性そのものを100%評価可能であると考えがちであるが、そういうことではない。人体実験によるバイオアッセイは不可能であるし、水環境生態系全体を使ってバイオアッセイするのであれば例えば川に評価したい化学物質を意図的に流すしかないがこれも不可能である。結局、バイオアッセイはヒト由来細胞^{6),7)}やげっ歯類による動物実験、生態系を構成する魚類や甲殻類、藻類などの動植物を使用する⁸⁾、すなわちヒトや生態系のごく一部を切り取って使用しているだけで、ヒトや生態系の全体の応答を再現することは不可能であるためである。バイオアッセイは万能ではないので、環境分析・計測にバイオアッセイを使う際には、その限界を知る必要がある。最近ではダイオキシン・PCBをはじめとする極微量濃度でも発現する内分泌攪乱作用に注目が集まっている⁹⁾。その毒性の概念は広いが、女性ホルモン受容体結合試験¹⁰⁾など極めて一部のメカニズムを代表するバイオアッセイが、先行して用いられている。このような手法は濃度の計測手法としての利用¹¹⁾にとどまるべきであり、生体に対する内分泌攪乱性作用の大きさを測定する手法として環境管理へ導入するには、科学的知見の収集が更に必要であるといわれる¹²⁾。

また、工場跡地土壌や廃止後の廃棄物処分場などが生体に与える有害性を事前に評価するためには、それらの汚染固体が降雨などによって溶出し、水溶液の状態になる前に、あらかじめそれらの固体試料の有害性を評価する必要がある⁵⁾。しかし、ほとんどのバイオアッセイは、その操作が簡便なことと生物を構成するのは主とし

て水であることから、主として試料は水溶液の状態であることが前提となっている。固形試料のバイオアッセイによる有害性評価を行う場合、溶出試験で水溶液の状態にする必要が出てくるが、溶出試験の条件によって評価の結果得られる有害性の大小は大きく異なる⁵⁾ため、溶出試験の条件の設定が難しい。どの生物がどれくらいの期間と量と濃度に曝露されるのかを明確に仮定した上で、実際の環境下において固形試料が生物に曝露される環境、すなわち曝露のシナリオ全体を考慮し、溶出試験の条件を設定する必要がある。このような問題点を検証可能な範囲で明らかにすることで、固形試料の有害性評価にバイオアッセイを適用することが可能になる。

わが国の環境管理においては、欧米と異なりヒト健康影響のみが重要視されてきた¹³⁾。しかし、生態系への影響はヒトへの影響の前触れとみなすこともでき¹⁴⁾、また次世代に快適かつ安全な環境を継承する必要性の観点からも生態系への影響を評価することの必要性が認められるようになってきている¹⁵⁾。そこで、本稿ではバイオアッセイの種類を生態系影響評価のためのバイオアッセイに限定して論点を絞り、環境汚染の生態系全体に対する有害性を評価するために、どのようなバイオアッセイをどのように組み合わせるべきかについて、最新の研究の動向を紹介するとともに、今後適用可能性が模索されつつある固形試料のバイオアッセイのあり方について議論する。

2 使えるバイオアッセイとは？

2002年1月、OECDによる対日環境保全成果レビュー¹⁶⁾において、化学物質規制の範囲に生態系保全を含むように勧告されたことを受け、化学物質審査規正法が2003年5月に改正され¹⁷⁾、2004年4月1日から施行された。これにより、環境中の生態系への影響を評価するため、新規化学物質については藻類成長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験を行うことが義務付けられた。加えて、OECDによる対日環境保全成果レビュー¹⁶⁾では、水環境における人の健康と生態系保存のための有害物質管理の強化及び生態系保全に係る水質目標の導入も勧告している。

このような背景から藻類成長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験¹⁸⁾は“OECD3点セット”として広く利用されつつある代表的なバイオアッセイ⁸⁾となっている。藻類、ミジンコ、魚類は食物連鎖のピラミッドを構成する関係にあるため、この3点セット

確認された。加えて、大雑把にまとめると生物個体や生態毒性試験系においては、有害性評価の結果に相関が見られたが、遺伝毒性試験や急性毒性、内分泌攪乱性の間ではほとんど相関が見られなかったことから、このプロジェクトにおいて用いられたバイオアッセイの妥当性を示すものとなった。同じようなバイオアッセイをいくつもやっては、各々のバイオアッセイの意味が相殺・半減するので有害性発現機序が独立したバイオアッセイを組み合わせて使用するのが妥当であるということである。

以上のような機関横断型の比較的大きなプロジェクトの進行によって、環境分析・計測手法として“使えるバイオアッセイ”が具備すべき条件に関する知見が集まり、環境中に存在する化学物質の生態系全体に対する影響の評価に最低限加えるべき生態影響試験が明らかになりつつある。結局、“使えるバイオアッセイ”とは、環境分析・計測手法として①現場において適用可能であること、②コストが安いこと、③迅速・簡便であること、以上の3つの条件を満たすバイオアッセイである、とまとめられ、各バイオアッセイのマニュアルの整備、コストの削減、簡便化や迅速化が急がれる。

3 固形試料のバイオアッセイ

近年、廃棄物最終処分場浸出水の水圏生態系に対する汚染が深刻な問題となっており³⁾、前述の環境省廃棄物処理等科学研究費補助金による「最終処分場管理における化学物質リスクの早期警戒システムの構築」などの研究プロジェクト²²⁾によって徐々にその汚染の実態が明らかになりつつある。今後、廃棄物最終処分場の適切なリスク管理のためには、処分場浸出水の処理や遮水工などに加えて、搬入される廃棄物の有害性ポテンシャルを埋め立てる前に事前に評価することが求められるようになる⁵⁾が、現状では廃棄物試料の有害性を評価するのに際し、溶出試験と重金属を主な対象とする化学分析しか行われておらず、溶出化学物質量の情報だけでは、前述のように生態系に対する影響を見積もることは困難である。このような背景から、今後固形試料の有害性を評価するためのバイオアッセイと前処理方法の確立が望まれている。

水圏生態系の生態影響評価としては、前述のように使えるバイオアッセイとその組み合わせによるシステムとしての生態影響評価が可能になりつつあるが、陸圏生態系の生態影響評価に関しては、環境分析・計測手法としてのバイオアッセイ自体がいまだに確立されたとはいえ

ない状況にある。生態影響評価のプロトコールが最もよくまとまっているOECDのテストガイドライン(TG)⁸⁾においても、陸圏生態系を構成する生物を用いた生態影響評価試験として、両生類、鳥類、土壌微生物、ミミズ、陸生植物による試験などが定められているが、そもそもOECDのテストガイドラインは単一化学物質の生態影響を評価するプロトコールとなっており、環境試料に対する生態影響を行う際には、プロトコールの多少の変更が必要となることが多い。また、ほとんどのバイオアッセイは対象試料としては水溶液の状態であることが前提になっているため、特に環境試料が水溶液試料ではなく固形試料である場合、直接有害性を評価することが困難になる。プロトコールから判断して、TG205、206において鳥類毒性試験、TG207、220においてミミズの急性または繁殖毒性試験、TG208において陸生植物生長試験、TG216、217において土壌微生物などが固形試料にも直接対応できるバイオアッセイであると考えられる。培養器内への給水の条件を実際の環境における降雨の量と頻度に合わせることで、かなり実際環境に近い曝露状態が再現できるため、これらのバイオアッセイは固形試料の有害性評価に優れていると考えられる。

これら以外のバイオアッセイに固形試料を供する場合、通常固形試料を溶出試験によって水溶液の状態にして、試験に供することになるが、溶出試験の条件によって評価の結果得られる有害性の大小は大きく異なるため、溶出試験の条件の設定が難しい。例えば、固形試料に対して溶出試験を行う際に、重要な実験条件の一つとして液固比がある。固形試料1gに対して、何gの水を加えて溶出させるかということである。これは何十年先の浸出水を想定するのかということに依存し、長い期間を想定するのであれば累積降雨量が大きくなるため液固比を大きく取り、逆に短い期間を想定するのであれば小さく取るようにするのが一般的である²³⁾。従って、液固比は曝露される生物の世代時間が大きく関与する。バイオアッセイのエンドポイントとして急性毒性を評価するのか、あるいは繁殖試験の様な比較的長期間の毒性を評価するのかによっても、設定すべき液固比は変化するべきである。溶出試験に際しては、廃棄物試料や土壌試料についてはそれぞれ環境庁告示法13号法と46号法による溶出試験が規定されているが、有害性評価のためにバイオアッセイを行使する際の前処理法として規定されている液固比10で溶出試験を行うことが妥当なのか否か、今後の研究結果を待ちたい。

また、環境庁告示法13号法と46号法による溶出試験では溶出時間を6時間と規定されている。しかし、例え

ば廃棄物が搬入されてくる処分場の入り口監視の現場において、6時間の溶出試験を行いさらにバイオアッセイまで行うとなると多大な労力が必要になる。筆者らの最新の研究⁵⁾では、溶出時間は必ずしも6時間でなくても、例えば1時間程度であっても6時間の場合とほとんど同程度の有機物溶出量と有害性を示すことが明らかとなっており、また溶出時間6時間という数字そのものにはあまり大きな意味を持っていない²⁴⁾こともあり、筆者らはより迅速な溶出試験の開発の必要性を訴えている²⁵⁾。溶出時間を短縮し、迅速なバイオアッセイを用いて6時間以内で有害性評価まで行えるような迅速な溶出試験とバイオアッセイの組み合わせ利用によって、時間的には労力を増大させずに、廃棄物の入り口監視に際してバイオアッセイによる有害性評価指標を加えることが可能になるという利点が生じうる。

少なくとも固形試料のバイオアッセイによる有害性評価に際しては、種々の溶出実験条件のうち液固比や溶出時間など考慮されるべき点が山ほどにあり、どの生物がどれくらいの期間と量と濃度に曝露されるのかを明確に仮定した上で、実際の環境下において固形試料が生物に曝露される環境、すなわち曝露のシナリオ全体を考慮し、溶出試験の条件を設定する必要がある。このような問題点を検証可能な範囲で明らかにすることで、固形試料の有害性の評価にバイオアッセイを適用することが可能になる。

4 おわりに

本稿では、環境分析・計測手法としてのバイオアッセイが有する一定の限界、すなわち生物全体または生態系全体のシステムとしての応答を再現することの難しさについて述べ、これを補完することを目的として、環境分析・計測手法として適用可能で有害性発現機構として独立した複数のバイオアッセイの組み合わせによる環境分析・計測が有効であることを述べた。また、バイオアッセイが今後適用されていくと考えられる固形試料の有害性評価に際して、考慮するべき問題点を述べた。いずれにせよ、環境分析・計測に用いられるバイオアッセイが具備する条件としては、簡便かつ迅速であることが第一に挙げられる。これには生物反応の計測システムの迅速化・簡便化がまず必要となり、有望な方法がいくつか提案されている^{26)–29)}が、決定的なものはなく、環境試料に対する適用事例に不足している。汚染土壌や廃棄物試料の有害性評価に至っては、バイオアッセイのための前処理方法すら確立されていない状況にある。しかし、水

環境の評価から始まった環境分析・計測手法としてのバイオアッセイは、今後汚染土壌や廃棄物試料などの固形試料に加えて、大気汚染や室内大気汚染などの有害性評価手法として、気体状試料へもその応用が検討されはじめている³⁰⁾。バイオアッセイは化学分析を主体とする環境分析・計測手法を補完する有力な方法として大きな可能性を秘めており、その簡便化・迅速化が大きな課題である。

[参考文献]

- 1) 鈴木基之・内海英雄：バイオアッセイ 水環境のリスク管理，講談社サイエンティフィック (1998)。
- 2) 庄司良・迫田章義・酒井康行・内海英雄・鈴木基之：バイオアッセイで評価した化学物質および環境水の複合的な毒性の定量的記述，水環境学会誌，23 (8)，487-494 (2000)。
- 3) 庄司良・酒井康行・迫田章義・山田正人・毛利紫乃・安原昭夫・井上雄三：バイオアッセイを活用する廃棄物最終処分場浸出水の毒性原因物質の推定，水環境学会誌，26 (10)，643-648 (2003)。
- 4) Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nishikawa, M., Yamamoto, T., Nakasugi, O., Okumura, T., Kenmotsu, K., Fukui, H., Nagase, M., and Kawagoshi, Y.: *Organic components in leachates from hazardous waste disposal sites*, Waste Management Research, 17, 186-197 (1999)。
- 5) 庄司良・中山秀謹・Nguyen Phuong Anh Thi・毛利紫乃・山田正人・工藤宏紀・酒井康行・迫田章義：廃棄物中の有機物の溶出試験とバイオアッセイによる有害性評価，環境科学学会誌，16 (6)，475-484 (2003)。
- 6) 酒井康行・庄司良・迫田章義：培養細胞を用いたバイオアッセイ (1) —水質評価への利用と課題—，ファインケミカル，32 (10)，5-12 (2003)。
- 7) 酒井康行・庄司良・迫田章義：培養細胞を用いたバイオアッセイ (2) —水質管理への利用と課題—，ファインケミカル，32 (11)，12-19 (2003)。
- 8) 日本環境毒性学会編：生態影響試験ハンドブック，朝倉書店 (2003)。
- 9) 例えば，鈴木祐麻・佐藤圭輔・高松正嗣・清水芳久・中村昌文・藤野潤子・藪下尚智：バイオアッセイ法による琵琶湖流入一河川のダイオキシン類汚染状況の把握，学会誌「EICA」，7 (2)，277-280 (2002)。
- 10) 例えば，竹田誠・鎌田素之・大野浩一・亀井翼・真柄泰基・寺尾良保：塩素処理によるビスフェノール A および塩素処理副生成物のエストロゲン様活性低減に関する研究，水環境学会誌，26 (11)，743-749 (2003)。
- 11) 例えば，清水芳久：ダイオキシン類の簡易測定・オンラインモニタリング技術の動向，学会誌「EICA」，8 (3)，2-5 (2003)。
- 12) 酒井康行・迫田章義：総括的指標としてのバイオアッセイ—その環境管理への利用—，化学工学，66 (6)，345-347 (2002)。
- 13) 庄司良：ヒト細胞を用いるバイオアッセイの水質管理への応用，安全工学，40 (4)，230-235 (2001)。

- 14) 鈴木基之・酒井康行：工学から見たバイオアッセイの有用性，*アニテックス*，7, 27-31 (1995).
- 15) 若林明子：わが国での生態系保全に向けた新たな動き，*水環境学会誌*，26 (4), 183-187 (2003).
- 16) OECD： *Environmental Performance Reviews: Japan* (2002).
- 17) 厚生労働省・経済産業省・環境省令第3号：新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令 (2003).
- 18) OECD： *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, 201-204 (1981).
- 19) OECD: *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, 209, 216-219 (1981).
- 20) 例えば，高松良江・稲盛悠平・須藤隆一・栗原康・松村正利：マイクロコズムを用いた陰イオン界面活性剤の水圏生態系に及ぼす影響評価，*水環境学会誌*，20 (11), 710-715 (1997).
- 21) Utsumi, H., Nakasugi, O., Nishimura, T., Sakoda, A., Oguri, R. and Higuchi, R.: *Development of bioassays to evaluate human and ecological impacts of pollutants*, Proc. Asian Waterqual. '99, Taipei, 275-280 (1999).
- 22) 廃棄物処理等科学研究費補助金“最終処分場管理における化学物質リスクの早期警戒システムの構築”平成14年度報告書 (2003).
- 23) 酒井伸一・水谷聡・高月紘：溶出試験の基本的考え方，*廃棄物学会誌*，7, 383-393 (1996).
- 24) 肴倉宏史：わが国の廃棄物最終処分における有害性評価—現状と課題—，*岡山大学最終処分場の安全性の評価法セミナー講演概要集*, 61-67 (2004).
- 25) 中山秀謹・上之門健太・宮崎誉教・庄司良・毛利紫乃・山田正人・酒井康行・迫田章義：固形廃棄物試料の迅速溶出試験と有害性評価，第14回廃棄物学会研究発表会講演論文集Ⅱ, 1250-1252 (2003).
- 26) 鈴木基之・庄司良・酒井康行・迫田章義：低密度リポタンパク質の取り込みを指標とした迅速簡便な細胞毒性評価手法，*水環境学会誌*，20 (11), 746-751 (1997).
- 27) 田中良春・田口和之・大戸時善雄・星川寛・佐々木弘・三森祐司・斎藤芳雄・鹿志村修：バイオセンサを用いた急性毒性物質の連続自動監視装置の開発，*学会誌「EICA」*，1 (2), 250-253 (1996).
- 28) 宮代明・渡辺昭二・矢萩捷夫・相馬憲一・原直樹：ヤマトヌマエビの個体差に着目した毒性物質検知感度評価，*学会誌「EICA」*，3 (2), 173-177 (1998).
- 29) 宮代明・馬場研二・圓佛伊智朗・原直樹・早稲田邦夫・矢萩捷夫：水質危機管理のための高感度バイオアッセイシステムの研究，*学会誌「EICA」*，1 (2), 246-249 (1996).
- 30) 清水啓右・富田賢吾・鶴達郎・酒井康行・迫田章義：気液界面培養を用いた浮遊粒子状物質のバイオアッセイ手法の開発，*環境科学会誌*，15 (6), 425-431 (2002).