

## 〈特集〉

## バイオアッセイの水環境管理への利用

清水 芳久

京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター  
(〒 520-0811 大津市由美浜 1-2 E-mail: shimizu@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp)

## 概要

現在、水環境の毒性検出・評価に利用されているバイオアッセイを、*in vitro* と *in vivo* の二つの系に大別して紹介する。また、水環境管理のために必要な科学技術の現状とその将来の進展を考慮して、バイオアッセイを利用した排水水質管理手法 WET (Whole Effluent Toxicity) を導入する意義について考える。

キーワード：バイオアッセイ、水環境管理、*in vitro*、*in vivo*、WET

原稿受付 2015.7.8

EICA: 20(1) 2-4

## 1. バイオアッセイ

バイオアッセイは、化学物質やそれを含む媒体の毒性を、生物応答を利用して試験・検出する方法である。おそらく最も古く、最も一般的に知られているバイオアッセイの例に、炭鉱で利用されていたカナリアがある。従来、石炭鉱山の労働者は、安全な空気の供給を確保するために、炭坑に入る際に籠に入れたカナリアを持っていった。カナリアは、無臭のメタンガスを人より早く敏感に検出することができる。カナリアは、石炭を採掘する時に放出されるメタンガスの濃度が危険なレベルに到達する前に警告を発するために利用されていた。カナリアが死んだ場合には、労働者は可能な限り迅速に炭坑を脱出しなければならないことを意味していた。

今日では、バイオアッセイは、薬剤やスキンケア製品等を使用される化学物質の効果や毒性を検出・評価するために利用されている。化学物質は、ヒトが使用するための製品の原料として使用することについての承認を受ける前に、実験動物等を利用して徹底的にテストする必要がある。

水環境を含む環境試料の場合には、バイオアッセイは、汚染サイト等から排出される水、底質、または土壌等のサンプルの包括的な毒性についての情報を提供してくれる。メダカを始めとする魚類、様々な水生無脊椎動物、ミミズ、原生動物および植物の種子等が、水環境試料のバイオアッセイのために使用されてきている<sup>1)</sup>。

2. *in vitro* と *in vivo*

多くの種類のバイオアッセイが、水環境試料の毒性を検出・評価するためのツールとして利用できる。特に、化学物質（例えば、微量汚染物質 (micro-pollutants)）に起因する毒性を検出・評価するためには、十分な感度を持つバイオアッセイを選択する必要がある。このためには、細胞への特定の影響を測定するための細胞試験から固体生物の反応を観察する試験を含む広範囲の多くのバイオアッセイの中から、その目的に応じて最適な方法を選択する必要がある。そして、適切なバイオアッセイを選択する際には、例えば次の様な選択基準を設定し、これらの選択基準の1つまたは複数に満足するバイオアッセイを選ぶことになる。

- ・水環境試料中に想定される化学物質の濃度範囲で、その化学物質を検出するための感度が十分であること。
- ・OECD (経済協力開発機構)、ISO (国際標準化機構)、DIN (ドイツ工業規格) 等によって認証された標準的な試験方法が存在すること。
- ・異なる食物連鎖の栄養段階 (細菌、藻類、水生植物、無脊椎動物、脊椎動物等) への影響を検討・評価することが可能であること。
- ・水環境試料そのものはもちろんのこと、これを希釈あるいは濃縮したサンプルの生物応答を検出・評価することが可能であること。
- ・水路等のフロールーシステムやマイクロコズム内の生物応答を検出・評価することが可能であること。

バイオアッセイは、*in vitro* バイオアッセイと *in vivo* バイオアッセイに大別することができる。*in vi-*

*tro* バイオアッセイでは、培養細胞や酵母を利用して、遺伝毒性や変異原性、内分泌攪乱性、または種々のシグナル伝達の阻害等を測定することが可能である。これらは、特定の細胞メカニズムや分子生物学的プロセスに基づいて細胞影響を測定する方法である。水環境試料に適用される *in vitro* バイオアッセイには、塩素処理や促進酸化処理等に伴って発生する DNA 損傷性を検出するための Ames 試験<sup>2)</sup> や umu 試験<sup>3)</sup>、内分泌攪乱（環境ホルモン）作用を検出するためのエストロゲン性をエストロゲン受容体との結合を利用して検出する YES 法<sup>4)</sup> や、アンドロゲン、エストロゲン、グルココルチコイド受容体の活性を検出する CALUX アッセイ<sup>5)</sup>、農薬等による光合成阻害作用を検出するために緑藻を利用する試験方法<sup>6)</sup> 等がある。

一方、*in vivo* バイオアッセイは、細菌、藻類、浮草、甲殻類、ミミズ類、貝類、魚類等の生物固体への総合的な影響を検出・評価するためのものであり、様々な栄養段階の生物種が利用されている。*in vivo* バイオアッセイには、生物固体の特異的なエンドポイントとして、成長、繁殖、摂食活動や死亡率等への影響や、魚類体内のビテロジェニンの誘導や子孫の出現数の様な特定のエンドポイントへの影響を検出することが可能な系も存在する。

これらの *in vitro* と *in vivo* のバイオアッセイはそれぞれ異なる目的で利用される。*in vitro* バイオアッセイは、特定の細胞メカニズムに基づいたものである。水環境試料中の目的とする化学物質を選択的に濃縮して暴露することが可能であり、内分泌攪乱物質や農薬等の化学物質による特定の応答を高感度に検出することができる。しかし、*in vitro* バイオアッセイは、生物固体はもとより生態系全体への影響を直接推定することは困難である。

一方、*in vivo* バイオアッセイでは、その利用目的から水環境試料を濃縮せずにそのまま暴露することになる。これにより、水環境試料そのものによる生物固体の成長、生殖や死亡率等への影響についての情報を提供されることになる。しかしながら、これらの生物固体への影響は、水環境試料中に含まれる多くの化学物質、栄養塩類等の全てによる包括的な影響によるものである。したがって、*in vivo* バイオアッセイでは、その影響をもたらす原因物質や関連する分子生物学的プロセスについての情報を得ることは難しい。また、*in vivo* バイオアッセイで更に考慮すべきことは、その感度が必ずしも十分ではないという点である。これは、*in vivo* バイオアッセイに使用される生物の感度そのものが十分に高くないこと、また試験のための暴露時間が制限されていること等に起因すると考えられる。

排水の生態系への影響を検出・評価するための *in*

*vivo* バイオアッセイには、生態系の一次生産者である緑藻や水生植物の成長阻害試験<sup>7,8)</sup> がある。これらの一次生産者は、甲殻類、貝類や他の残骸捕食者である無脊椎・脊椎動物のような次の栄養段階にある一次消費者の食料となる。また、水生植物は一次消費者に捕食されるという意味で生態系構造に重要な役割を果たすのみならず、様々な生物種の生息場を提供するといった役割も果たしている。

生態系の一次消費者であるミジンコは、生態系の中では主として緑藻を餌とする一方で、仔魚や他の水生生物のための重要な食料源として機能している。排水や地表水の評価するための *in vivo* バイオアッセイでは、一次消費者としてミジンコが最も頻繁に利用されている<sup>9,10)</sup>。ミジンコ以外の一次消費者としては、底質の貧毛類<sup>11)</sup>、岩場のタニシ類<sup>12)</sup>、流れのある生態系に生息する海老類等<sup>13,14)</sup> も利用されている。

水環境生態系の二次消費者として最も重要な生物は魚類である。*in vivo* バイオアッセイでは、ゼブラフィッシュ<sup>15)</sup> やニジマス<sup>16)</sup> 等が利用されている。またこれら魚類の胚や仔魚は、化学物質への感受性が特に高いと考えられている<sup>17)</sup>。*in vivo* バイオアッセイでは、これらの水環境中に生息する異なる栄養段階の生物を単独であるいは併せて利用することにより、水環境試料の毒性を検出・評価することが可能である。

### 3. 水環境管理とバイオアッセイの利用

分析化学の急速な進展は、科学、工学、医学等の様々な分野で多くの功績をもたらしてきている。しかしその一方で、これによってもたらされる多量の分析データに圧倒され、それに埋もれてしまい、真に必要な情報や課題を見落としてしまうことがある<sup>18)</sup>。このままでは、最終的に情報過多のままとなってしまう可能性があることは否めない。

バイオアッセイによるアプローチは、ヒトや他の生物種への複雑な化学物質の影響、さらには生態系への影響について貴重な情報を提供してくれる。しかしながら、前述の様に、水環境にバイオアッセイを適用する際には、水環境が多くの化学物質の混在する複雑系であることから、特に *in vivo* バイオアッセイによって観察された効果や影響の原因を、特定の化学物質(群)に帰属させることが困難であることが多い。ビッグデータの数学的解析によりこの課題を解決しようとする動きもあるが、明白な因果関係を確立するためには、分析化学と分子生化学の様な直接的な分野の更なる発展と、これらの融合が必要であると考えられる。

分析化学の分野では、質量分析計で代表される様な精密な高度分析装置の更なる進展はもちろんのこと、

水環境の様な複雑系試料の場合には、それ以上に、目的とする化学物質(群)を精密に分画・分離するための前処理操作の方法を進展させる必要がある。一方、分子生化学の分野では、一種類のタンパク質による影響の研究から、一つの細胞へ、一つの生物固体へ、そして生態系へとその領域を拡大させる必要があると考えられる。

日々増大する多くの化学物質やそれらが混在する水環境を適切に管理していくためには、長いタイムスパンで考慮した場合には、上述の様な分析化学と分子生物学の進展と融合が必要となるであろう。理想的には、3つの分野(分析化学と分子生物学、そしてバイオアッセイ)が進展・融合し、そしてこれらに数学的アプローチも含めて、より良い水環境管理が可能となると考えられる。現状をそのままにしてこれらの分野の進展を待っていることはできない。バイオアッセイを利用しての管理を考える必要がある。水環境に放出される排水そのものにバイオアッセイを適用し、その異常を検出した場合には上流側に遡って改善を検討・実施していく排水水質管理手法 WET (Whole Effluent Toxicity) は、現状の科学技術の進展に沿った方法であると言える。

#### 参考文献

- 1) C. J. Keddy, J. C. Greene and M. A. Bonnell: Review of Whole-organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 30, pp. 221-251 (1995)
- 2) International Organization for Standardization, Water Quality — Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water — Salmonella/microsome Test (Ames Test), ISO 16240 (2005)
- 3) International Organization for Standardization, Water Quality — Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water using the umu-test, EN ISO 13829 (2000) and 38415-3 (1996)
- 4) E. J. Routledge and J. P. Sumpter, Estrogenic Activity of Surfactants and some of their Degradation Products Assessed using a Recombinant Yeast Screen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15, pp. 241-248 (1996)
- 5) S. C. Van der Linden, M. B. Heringa, H. Y. Man, E. Sonneveld, L. M. Puijker, A. Brouwer and B. Van der Burg, Detection of Multiple Hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, using a Panel of Steroid Receptor CALUX Bioassays. *Environmental Science and Technology*, 42: 5814-5820 (2008)
- 6) U. Schreiber, J. Müller, A. Haugg and R. Gademann, New Type of Dual-channel PAM Chlorophyll Fluorometer for Highly Sensitive Water Toxicity Biotests, *Photosynthesis Research*, Vol. 74, pp. 317-330 (2002)
- 7) International Organization for Standardization, Water Quality — Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae. ISO 8692 (2004)
- 8) International Organization for Standardization, Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water on Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test. ISO 20079 (2005)
- 9) U. S. Environmental Protection Agency, Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, Fourth Edition ed., Washington, DC (2002)
- 10) International Organization for Standardization, Water Quality — Determination of Chronic Toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. ISO 20665 (2008)
- 11) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 225: Sediment-Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment (2007)
- 12) M. Duft, M. Tillmann, U. Schulte-Oehlmann, B. Markert and J. Oehlmann, Entwicklung eines Sedimentbiotests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda: Prosobranchia). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, Vol. 14, pp. 12-17 (2002)
- 13) P. Y. Kunz, C. Kienle and A. Gerhardt, *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. In: Albert L. A., Gerba C. P., Giesy J., Hutzinger O., Knaak J. B., Stevens J. T., Tjeerdema R. S., Voogt P., Ware G. W, editors, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, New York, pp. 1-76 (2010)
- 14) M. Bundschuh, R. Schulz, Population Response to Ozone Application in Wastewater: An Onsite Microcosm Study with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda), *Ecotoxicology*, Vol. 20, pp. 466-473 (2011)
- 15) R. Nagel, The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* — A General Model in Ecotoxicology and Toxicology, Alternatives to Animal Experimentation-ALTEX, Vol. 19, pp. 38-48 (2002)
- 16) D. Stalter, A. Magdeburg, M. Weil, T. Knacker and J. Oehlmann, Toxication or Detoxication? *In vivo* Toxicity Assessment of Ozonation as Advanced Wastewater Treatment with the Rainbow Trout, *Water Research*, Vol. 44, pp. 439-448 (2010)
- 17) D. Pascoe and A. A. M. Shazili, Episodic Pollution — A Comparison of Brief and Continuous Exposure of Rainbow Trout to Cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 12, pp. 189-198 (1986)
- 18) A. Toffler, *Future Shock*, Random House, New York (1970)