生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査

渡部 春奈, 林 岳彦, 田村 生弥, 中村 中, 阿部 良子,
高信ひとみ, 荻野 仁子, 小塩 正朗, 鑑迫 典久

独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

[平成26年10月23日受付, 平成26年12月4日受理]

**Validation of a Draft Protocol of Bioassays for Effluent
Testing and a Toxicity Survey of Industrial Effluent**

Haruna WATANABE, Takehiko HAYASHI, Ikumi TAMURA, Ataru NAKAMURA,
Ryoko ABE, Hitomi TAKANOBU, Satoko OGINO,
Masaaki KOSHIO and Norihisa TATARAZAKO

Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506)

[Received October 23, 2014; Accepted December 4, 2014]

Summary

In view of developing a bioassay for use into effluent management system in Japan, short-term toxicity tests using fish, daphnids, and algae were selected as a battery of bioassays, which evaluate the integrated effect of effluent, and “a draft protocol of bioassays for effluent testing” has been prepared. To examine the robustness, sensitivity and reproducibility of the draft protocol, we conducted an inter-laboratory trial where the same effluent was tested by 9 laboratories in Japan. No observed effect concentrations (NOEC) of the test effluent in all the laboratories were within the median ± 1 dilutions, suggesting that the variability between laboratories was at acceptable level. Furthermore, testing of reference chemicals by 10 testing laboratories showed that the reproducibility of the bioassays was relatively higher than that exhibited in the inter-laboratory validation of similar bioassays conducted by US EPA. However, the percentage of minimum significant difference (PMSD) and control coefficient of variation (CV) in the almost all the Japanese laboratories were at acceptable levels (as appears in the US EPA report), indicating that the intra-laboratory precision and the sensitivity of each test was sufficient. We investigated the value of using IC_{20} for fish, IC_{25} for daphnids, and IC_5 for algae as an alternative to NOEC. With this approach, toxicity survey of 91 effluent samples conducted from 2008 to 2013 found that 36% of effluents were toxic to at least one of the three test species even after 10-fold dilution. The test species that demonstrated toxic effects were different in each sample; thus, we suggest that effluent toxicity evaluation should be based on more than one species due to different sensitivities.

Key words: Whole effluent toxicity (WET), inter-laboratory test, reproducibility, percentage of minimum significant difference (PMSD), industrial effluent

1. はじめに

事業場排水中の多種多様な化学物質のうち、規制・監視されている物質は限られており、新規化学物質や副生成物による影響や、複数物質による複合的な影響を把握することは難しい。1990年代より米国やカナダをはじめとした諸外国では水生生物を排水等に直接ばく露し、生死や繁殖、生長といった生物応答によって総体的な影響を評価する、いわゆるバイオアッセイを用いた排水・水環境管理手法が導入されている^{1,2)}。日本国内では平成21年度から環境省による導入検討が開始され、諸外国の導入事例を参考に、制度運用の在り方の検討やバイオアッセイ試験法の検討が行われてきた。

バイオアッセイを選択するに当たっては、日本の事業場排水の影響レベルに見合った試験であると同時に、国内の試験機関で実施可能な、国際標準の試験であることが重要である。そこで「排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会」では、米国環境保護庁 (US EPA) およびカナダ環境省 (Environment Canada) の試験法^{3,4)}や OECD テストガイドライン、ISO 規格を参考に、魚類、ミジンコ、藻類を用いた短期慢性毒性試験が排水評価のための生物応答試験として採用され、試験法案の作成が行われた。

試験法案は、国内試験機関による実効性や試験精度を検証し、実事業場排水に適用した際の課題に応じて、適宜、改訂される必要がある。そのため、平成23年度には試験排水を用いた複数試験機関に

よるリングテスト、平成24年度には、実事業場排水を用いた検証試験が行われ、それらの結果に基づいた改訂を経て、平成24年度末に「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（以下、試験法検討案）が公表された。その後も平成25年度に実施した検証試験を受けて改訂版が公表されている⁵⁾。本研究では、平成23年度に実施した試験排水を用いた複数試験機関によるリングテストの結果と、平成25年度に実施した事業場排水調査の参加試験機関から得た、標準物質の感受性試験結果を基に、試験機関間の再現性と試験検出力について解析した結果を報告する。

一方、排水管理の制度運用を検討する際は、国内の事業場排水の生物応答の実態を把握した上で、対象事業場や試験頻度、結果の解釈などを考慮する必要がある。筆者らは、平成20年度より様々な事業場の協力の下、事業場排水の実態調査を進めてきた。環境省請負業務として平成21、24、25年度に実施した調査結果と合わせると、延べ91試料、協力事業場は50か所に及ぶ。本研究では、これらのデータを取りまとめ、国内事業場排水の生物応答の傾向を明らかにする。

2. 方法

2. 1 試験機関

平成23年度に試験排水を用いたリングテストに参加した9機関および、平成25年度に事業場排水実態調査および感受性試験を実施した10機関をTable 1にまとめた。試験機関は化審法 GLP 機関の他、生物応答を用いた排水試験の実績を有する民間試験機関および大学研究室が選定された。事業場排水実態調査では、民間試験機関は各

1試料（計9試料）を担当し、その他の82試料は我々（国環研）が試験した。

2. 2 排水の採取と前処理、試験溶液の調製

平成20～25年度にかけて50か所の事業場から延べ91試料の事業場排水を採取した。一部の事業場は複数年調査を行った。各排水試料の産業分類（中分類）に基づく業種の内訳をTable 2に示す。事業場排水は、最終排水口で褐色ガラス製容器またはプラスチック製コンテナに6～10 L採取し、速やかに冷蔵宅配にて国環研または試験機関に輸送した。

到着した排水試料は夾雑物を除去するため、ろ過処理した。平成20～24年度に調査した72試料は、孔径0.45～0.70 μmのガラス繊維ろ紙（主にWhatman GF/F、一部ADVANTEC GB-140等）を用いて吸引ろ過を行った。夾雑物が多い場合は、ガラス繊維ろ紙を用いる前に、孔径3 μmの定性ろ紙（ADVANTEC No.131）を用いてろ過した。平成25年度に調査した19試料は、試験法検討案の改訂に伴い、目開き60 μmのナイロン製メッシュを用いて粗大な浮遊物のみ除去した。藻類試験用は、試験開始時にさらに孔径0.2～0.45 μmのメンブレンフィルターを用いて滅菌ろ過した。

ろ過後の試料は、できるだけ速やかに暗所（または遮光容器）にて冷蔵保存（0～6℃）した。平成24～25年度に実施した18試料については、試験期間中に換水が必要な魚類およびミジンコ試験用に、密栓できるガラス製容器に一日に使用する分量ずつ分注した。これによって排水の劣化を極力防いだ。

リングテストに用いた試験排水は、国環研で保管していた複数の

Table 1 Participating laboratories of inter-laboratory tests using test effluent and reference chemicals and toxicity survey of industrial effluent

Laboratory name	Test effluent	Reference chemicals and toxicity survey
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan	○	○
Chugai Technos Corporation		○
Ecogenomics, Inc. (currently, mizuki biotech. co., ltd) ¹	○	
Environmental Control Center Co., Ltd		○
FUJIFILM Corporation ²	○	
IDEA Consultants, Inc.	○	○
Kobelco Eco-Solutions Co., Ltd		○
Kureha Special Laboratory Co., Ltd.	○	
LSI Medience Corporation (previously, Mitsubishi Chemical Medience Corporation)	○	○
National Institute for Environmental Studies	○	○
Nisso Chemical Analysis Service Co., Ltd		○
Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology		○
Sumika Technoservice Corporation and Sumika Chemical Analysis Service, Ltd. ³	○	○
The University of Tokushima ⁴	○	

¹ Fish and Daphnids toxicity test only. ² Algal growth inhibition test only. ³ Sumika Technoservice Corporation performed the toxicity test and Sumika Chemical Analysis Service, Ltd contracted for the toxicity survey of industrial effluent. ⁴ Graduate School of Integrated Arts and Sciences (Dr. Hiroshi Yamamoto, associate professor)

排水試料を混合して調製し、5 L プラスチック製コンテナに分注して参加機関へ冷蔵宅配便にて輸送した。各試験機関に到着後に浮遊物が認められたため、再びガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、試験に供した。

前処理した無希釈の排水を濃度100%として、試験用水で段階的に希釈して試験に供した。対照区には試験用水を用いた。試験は最高濃度を80%として、公比2で適宜希釈した。平成25年度に実施した事業場排水実態調査では、試験法検討案を遵守し、各試験機関は排水採水後36時間以内に試験を開始した。その他の試験ではろ過処理後に冷蔵保管し、なるべく速やかに各生物応答試験を実施した。

2. 3 標準物質

各生物応答試験の感受性を確認するため、Table 1 の10機関において標準物質を用いた試験を実施した。魚類およびミジンコはNaCl (試薬特級レベル, 和光純薬, 関東化学等), 藻類は $K_2Cr_2O_7$ (試薬特級, 和光純薬, 関東化学等) を用いた。試験用水に標準物質を溶解して各濃度の試験溶液を調製し、試験に供した。標準物質の調達、試験濃度区数の設定は各試験機関で行い、試験結果は国環研でまとめて統計解析 (2.5) した。

2. 4 生物応答試験 (短期慢性影響試験) の実施

魚類, ミジンコ, 藻類を用いた各生物応答試験の主な試験条件をTable 3 にまとめた。試験の概要を下記に述べる。

Table 2 Industrial classification of 91 effluent samples (Japan Standard Industry Classification, middle classification)

Classification code	Classification name	No. of samples
9	Manufacture of Food	1
14	Manufacture of Pulp, Paper and Paper products	1
15	Printing and allied industries	4
16	Manufacture of Chemical and allied products	39
18	Manufacture of Plastic products	2
19	Manufacture of Rubber products	5
21	Manufacture of Ceramic, Stone and Clay products	1
24	Manufacture of Fabricated Metal products	2
25	Manufacture of General-purpose Machinery	2
28	Electronic Parts, Devices and Electronic Circuits	3
29	Manufacture of Electrical Machinery, Equipment and Supplies	10
31	Manufacture of Transportation Equipment	3
33	Production, Transmission and Distribution of Electricity	11
36	Collection, Purification and Distribution of Water, and Sewage Collection, Processing and Disposal (Sewerage)	3
71	Scientific and Development Research Institutes	2
88	Waste Disposal Business	2

2. 4. 1 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

魚類の胚を受精直後からふ化後の卵黄吸収完了の直前まで排水にばく露し、ふ化率やふ化後の生存率、発生異常などを調べ、対照区と比較することにより、胚期の魚類に対する致死影響 (急性毒性) および亜致死的影響 (亜慢性毒性) を明らかにする^{6,7)}。試験生物種としては、メダカ (*Oryzias latipes*) とゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) が認定されているが、すべての試験機関でゼブラフィッシュが用いられた。よってゼブラフィッシュを用いた試験操作について記述する。

実体顕微鏡下で適切な発生段階にある良質な受精卵を選別し、各濃度に調製した試験溶液 (対照区は試験用水) を分注した試験容器に、広口のガラス製ピペット等を用いて最低10粒 (推奨15粒, 一部機関は20粒) ずつ投入し、受精後4時間以内にばく露を開始した。試験用水として、活性炭等を用いて脱塩素処理した水道水を用いた。試験期間中は少なくとも週3日, 2日または3日ごとに換水を行い、毎日、生死およびふ化数のほか、形態・行動異常の有無を記録した。平成24年度までの試験では、ばく露期間を9日間としていたが、平成24年度の試験法検証試験を受けて、対照区の供試卵数の半数以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から5日後を試験終了日とする、に修正された。その結果、平成25年度に実施した試験では、10機関中9機関でふ化日が3日目であったため、8日目で試験終了可能となった。9日目までばく露を継続し、8日目と9日目で結果を比較したところ、差は認められなかった。評価指標 (エンドポイント) として、供試卵数に対する、最大ふ化所要日数 (ゼブラフィッシュの場合はばく露開始5日後) までにふ化した卵数の割合を示す「ふ化率」、ばく露期間にふ化したすべての仔魚数に対する、ばく露終了時に生存した仔魚数の割合を示す「ふ化後生存率」、供試卵数に対する、ばく露終了時に生存した卵または仔魚数の割合を示す「生存率」の3つに加えて、ふ化とふ化後生存の二つの影響を総合するために、両者の積を算出した「生存指標」を総合指標として用いた。

2. 4. 2 ニセネコゼミジンコを用いる繁殖試験

甲殻類のニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) の生後24時間以内の幼体 (仔虫) を排水に7日前後ばく露し、産まれた仔虫の数 (産仔数) が対照区に対して減少することを指標として、ミジンコの繁殖に対する慢性毒性を明らかにする⁸⁾。

試験の約1週間前から個別飼育を行い、産仔条件を満たした親個体を選別し、その仔虫を用いた。各試験容器に各濃度に調製した試験溶液 (対照区は試験用水)、餌として適量の YCT (Yeast・Cerophyll・Trout Chow) および単細胞緑藻類 (クロレラ, ムレミカヅキモなど) を入れ、ガラスパスツール等を用いて幼体を1頭ずつ投入し、ばく露を開始した。試験用水として、活性炭を用いて脱塩素処理し、必要に応じて硬度調整した水道水、ミネラルウォーター, M4培地⁹⁾, USEPAの試験法に準じて調製した人工調製水³⁾等が用いられた。試験期間中は週3回, または隔日で換水を行い、毎日給餌と生死および産仔数を記録した。対照区において6割以上の個体が3回産仔した時点で終了し、最長でも8日間とした。エンドポイントは産仔数の合計と親個体の死亡率とした。

2. 4. 3 淡水藻類を用いる生長阻害試験

指数増殖期の藻類を排水に添加して72時間ばく露し、24時間ごとに生物量 (細胞濃度) を調べ、藻類の生長速度への影響を明らかにする^{10, 11)}。

試験藻類として、ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) が用いられた。各濃度に調製した試験溶液 (対照区は OECD 培地) を試験容器に分注し、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に調温した。2 ~ 4 日間の前培養によって指数増殖期になった藻類を、試験溶液中の細胞濃度が5000 cells/mL になるように添加し、ばく露を開始する。ばく露期間中は、

24時間ごとに粒子計数装置等を用いて細胞濃度を測定し、エンドポイントとして0～72時間生長速度を算出した。

2. 5 統計処理

各試験のエンドポイント（魚類：ふ化率，ふ化後生存率，生存率，生存指標，ミジンコ：産仔数，藻類：生長速度）について，最大無影響濃度 NOEC（No observed effect concentration）および x% 阻害濃度 IC_x（x% inhibition concentration）をフリーの統計解析ソフト R¹²⁾ を用いて算出した。NOEC の算出では，対照区に対して統計的に有意な差がない最大濃度を多重比較検定により求めた。藻類およびミジンコ試験の場合，まず Bartlett 法により等分散性を検定し，データが等分散の場合はパラメトリックの Dunnett 法，不等分散の場合はノンパラメトリックの順位和検定である Steel 法により多重比較検定を行った。魚類試験の場合は，0/1 データのため誤差

項が正規性を示さず，さらに対照区のデータの分散が極小になる（優秀な試験機関は 0 になる）ことが多いため等分散性を仮定できないことから，すべて Steel 法を使用した。

試験排水のリングテストおよび感受性試験データの解析では，対照区のエンドポイントに対し，x% の阻害を示す濃度 IC_x を対数ロジスティックモデル¹³⁾ により算出した。R による計算は drc 関数を用いて行われ，データの誤差分布に応じた解析オプションとして連続データである藻類（生長速度）では“type=continuous”，カウントデータであるミジンコ（産仔数）では“type=Poisson”，0/1 データである魚類（ふ化率等）では“type=binomial”を使用した¹⁴⁾。データは容器ごとに扱い，原則，対照区の平均値を切片とする 2 パラメーター法を用い，最小二乗法によりパラメーター推定を行った。

また，各試験時における Dunnett 法により検出可能な最小有意差 MSD（Minimum of significant difference）を式（1）により算出し，

Table 3 Test conditions of short-term chronic toxicity tests with fish, daphnids, and algae

Test conditions	Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages	<i>Ceriodaphnia dubia</i> reproduction test	Freshwater alga growth inhibition test
Test organism	<i>Danio rerio</i> : Fertilized egg within 4 h post fertilization, <i>Oryzias latipes</i> : Fertilized egg within 10 h post fertilization	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <24 h-old neonates	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , in the exponential growth phase prepared 2–4 days before the test
Exposure type	Static renewal	Static renewal	Static, continuous shaking at 100 rpm
Test duration	Hatching day ¹ + 5 days	Maximum 8 days ²	72 hours
Endpoints	Hatchability, Post-hatch survival, Survival, Total index ³	No. of neonates, Survival	Growth rate
Control/dilution water	Activated carbon filtrated tap water, ground -water, mineral water, reconstituted water etc.		OECD medium
No. of concentration	5 or more plus control (maximum effluent concentration: 80%, dilution factor: 0.5)		
Renewal of test solutions	At least three times a week, every second or third day	Three times a week or every second day	None
Test solution volume/vessel	50 mL	15 mL	100 mL
No. of organisms/vessel	10 (required min.), 15 (recommended)	1	5000 cells/mL
No. of replicates	4	10	6 (Control) 3 (Test concentration)
Temperature	25±1 °C	26±1 °C	23±2 °C
Lighting	12–16 h light: 12–8 h dark, ambient laboratory levels	16 h light: 8 h dark, ambient laboratory levels	Continuous light, 60–120 μmol/m ² /s
Feeding	None	Algae and YCT (Daily)	None
Test acceptability criteria (in the control)	<ul style="list-style-type: none"> • Hatchability ≥ 80% • Survival ≥ 70% • DO ≥ 60% throughout the test 	<ul style="list-style-type: none"> • Mortality of parent organisms ≤ 20% • At least 60% of the parent organism must produce three broods • Average number of neonates per the organism ≥ 15 • No ephippia observed 	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplication factor of biomass within the test period ≥ 16 • The mean CV for daily growth rate ≤ 35% • CV of 72 h growth rate in replicate control ≤ 7%

¹ The day when more than half of control organisms have hatched. ² Test must end as soon as 60% (or more) of control organisms have three broods. ³ Total index = Hatchability (No. of larvae on Day 5 / Total No. of organisms) × Post-hatch survival (No. of alive larvae at the end of the test / (Total No. of organisms – dead or unhatched organisms))

これを対照区の平均値で割った PMSD (Percent of MSD) により、試験内のばらつきと検出力 (感受性) を検証した³⁾。

$$\text{MSD} = d\sqrt{\text{MSw}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n}} \quad \text{式 (1)}$$

d: Dunnett の棄却値 (片側検定, 有意水準 5 %), MSw: 群内平方平均, n_1 : 対照区の数, n : 濃度区の数

3. 結果と考察

3. 1 試験排水を用いたリングテスト

3. 1. 1 試験機関変動

Table 4 に各試験の各エンドポイントにおける NOEC, IC₂₅ をまとめた。なお、全ての試験において試験の有効性条件を満たしていた。試験機関間のばらつきの許容範囲は、一般的に平均値 ± 標準偏差 × 2 を用いて検証するが、NOEC は設定濃度に応じた離散値であるため、標準偏差 (以下, SD) の使用は適していない。そのため、中央値 ± 1 濃度区以内であれば、試験機関間のばらつきは、許容できる範囲内であるとする¹⁵⁾。試験排水の魚類に対する影響は小さく、特にふ化後の生存に対する影響は、すべての試験機関において最高濃度 80% でも観察されなかった。したがって各エンドポイントに対する NOEC は排水濃度 40% あるいは 80% であり、すべての試験機関の NOEC は中央値 ± 1 濃度区以内であったことから、試験機関間の変動は十分小さいと判断できる。同様に、ニセネコゼミジンコに対する NOEC はすべての機関において中央値 30% の 1/2 ~ 2 倍以内 (20%, 40%), 藻類に対する NOEC も中央値 20% の 1/2 ~ 2 倍以内 (10%, 20%, 40%) であった。

US EPA のリングテスト報告書^{16, 17)} と比較するため、IC₂₅ の算出を試みたが、魚類に対する影響が弱く、全く影響のないふ化後生存率以外の、ふ化率、生存率、生存指標も約半数の機関で算出できなかった。生存指標の 8 機関中 5 機関による変動係数 (以下, CV) は 42% であった。US EPA ではファットヘッドミノーの仔魚の成長をエンドポイントとした試験について、NaCl を用いた感受性デー

タが収集されており、6 機関による試験機関間の CV は 17% であった。生物種、エンドポイント等が異なるため、直接的な比較はできないが、本試験の結果の方がややばらつきが大きい。これは試験排水の魚類に対する影響が小さかったことも影響したと考えられる。ミジンコに対する IC₂₅ の CV は 36% であり、US EPA が実施した同試験のリングテストにおける IC₂₅ の CV = 35% と同程度であった。藻類に対する IC₂₅ の CV は 20% であった。US EPA ではムレミカヅキモを用いた 96 時間生長阻害試験 (エンドポイントは生長速度ではなく、生物量) を実施しており、排水を用いたリングテストでは、IC₂₅ の試験機関内の CV は 39.5%, 試験機関間の CV は 8.5%, 総合 CV は 40% であった¹⁷⁾。本試験では同一試験内の繰り返し試験は実施していないが、全体的な試験再現性は米国試験機関より高いことが示された。

3. 1. 2 試験内変動および試験検出力

次に、試験内のばらつきと、試験の検出力 (感受性) を評価する指標として最小有意差の影響値 PMSD を求めた (Table 5)。これは Dunnett の多重比較検定において、検出可能な最小阻害率に相当する。2.5 で前述したとおり、魚類試験では Dunnett 法を用いると検出力が過大評価になる可能性があるため、PMSD の値は検出力の目安として考察する。生存指標の PMSD は 5 ~ 32%, 平均値は 16% であり、ふ化率、生存率の PMSD もほぼ同じであった。ふ化後生存率の PMSD は他エンドポイントに比べて小さいが、これはふ化後生存率の感受性が高いわけではなく、今回の試験排水では影響がほとんど見られなかったために分散が極小になり、等分散性を仮定した検定では検出力が過大評価になったことを示している。

US EPA では PMSD の 10% 点を試験の統計学的有意差あるいは感受性の下限値、90% 点を上限値として扱い、PMSD の上限値を超えたデータについては再試験を推奨している。US EPA ではファットヘッドミノーの仔魚成長試験について、様々な標準物質を用いた 205 試験を解析した結果、PMSD の 10% 点は 9%, 90% 点は 35% であった¹⁶⁾。魚種およびエンドポイントは異なるが、本試験では上限値 35% を超えた試験機関はなかった。すなわち、国内試験機関の試験内のばらつきは、米国の試験機関と同程度であり、ゼブラフィッ

Table 4 NOEC and IC₂₅ of the test effluent in inter-laboratory test

Lab ID	NOEC (%)						IC ₂₅ (%)					
	Fish				Daphnids	Algae	Fish				Daphnids	Algae
	H	P	S	T			H	P	S	T		
T1	80	80	80	80	40	40	NA	NA	NA	NA	49	90
T2	40	80	40	40	20	20	55	NA	59	59	14	78
T3/T4 ^a	80	80	80	80	40	20	NA	NA	NA	NA	41	55
T5	40	80	40	40	20	20	63	NA	NA	61	33	56
T6	80	80	80	80	40	10	NA	NA	NA	NA	54	59
T7	80	80	80	80	40	40	84	NA	92	82	40	79
T8	40	80	40	40	20	20	30	NA	26	26	64	60
T9	80	80	80	80	20	40	NA	NA	NA	99	38	83
Mean	65	80	65	65	30	26	58	NA	59	65	42	70
Median	80	80	80	80	30	20	-	-	-	-	40	69
SD	21	0	21	21	11	12	22	NA	33	28	15	14
CV	32%	0%	32%	32%	36%	45%	38%	NA	56%	42%	36%	20%

H: Hatchability, P: Post-hatch survival, S: Survival, T: Total index, a: T3 for Alga, T4 for Fish and Daphnids. NA: Not available (>100%)

シュの胚仔魚試験は、ファットヘッドミノーの仔魚試験と同等の試験精度があることが示唆される。

同じく、試験内精度を検証する上で、PMSD と共に対照区の CV が適正な範囲にあることも重要である。ふ化率の CV は 0 % から 9 %、ふ化後生存率の CV は 0 % から 8 % であり、両者を掛け算した生存指標はばらつきが増幅するため 0 % から 12 % とやや CV が大きくなった。しかし、US EPA のファットヘッドミノーの結果と比べると、対照区の CV の上限値（90 % 点）20 % を超過した試験機関はなかったことから、対照区におけるばらつきも許容範囲であるといえる。

ニセネコゼミジンコ繁殖試験に対する PMSD は平均値 27 %、最大値は機関 T7 の 48 % であり、US EPA が収集した同試験の、393

試験による PMSD の上限値（90 % 点）37 %¹⁶⁾ を超過していた。PMSD が 48 % ということは、産仔数が対照区の約半分に減少しないと統計学的な有意差が示されないことを意味しており、試験精度の向上が望まれる。機関 T7 では対照区の CV が 54 % と大きいことが PMSD の増加にもつながっていると考えられる。全体としては、US EPA の PMSD (10 % 点 11 %, 90 % 点 37 %) および対照区の CV (10 % 点 9 %, 90 % 点 42 %) と同程度であったことから、国内試験機関の試験精度は米国試験機関と同程度であり、試験の感受性も許容範囲内であるといえる。ただし、魚類試験に比べると、対照区の CV が大きいことから、供試する幼体の準備において、個体差を減らす努力が望まれる。具体的な留意事項については 3.2.2 で後述する。

ムレミカツキモ生長期阻害試験における PMSD は 2 ~ 6 % で平均

Table 5 PMSD and Control CV in inter-laboratory test using the test effluent

Lab ID	PMSD (%)						Control CV (%)					
	Fish				Daphnids	Algae	Fish				Daphnids	Algae
	H	P	S	T			H	P	S	T		
T1	8%	2%	8%	7%	24%	3%	7%	0%	7%	7%	28%	1%
T2	27%	5%	28%	28%	32%	3%	3%	4%	4%	7%	39%	1%
T3/T4 ^a	10%	3%	10%	11%	35%	5%	7%	0%	7%	7%	30%	2%
T5	3%	4%	7%	5%	17%	2%	0%	0%	0%	0%	28%	1%
T6	16%	4%	14%	15%	27%	4%	9%	0%	9%	9%	29%	2%
T7	10%	3%	7%	11%	48%	6%	0%	0%	0%	0%	54%	4%
T8	30%	14%	32%	32%	24%	3%	7%	8%	12%	12%	10%	2%
T9	12%	5%	10%	14%	10%	3%	3%	3%	5%	5%	8%	2%
Mean	15%	5%	15%	16%	27%	4%	4%	2%	5%	6%	28%	2%

H: Hatchability, P: Post-hatch survival, S: Survival, T: Total index, a: T3 for Alga, T4 for Fish and Daphnids.

Table 6 IC₂₅ of NaCl (g/L) for fish and daphnids and K₂Cr₂O₇ (mg/L) for algae in inter-laboratory test

Lab ID	IC ₂₅ (Fish, Daphnids: g/L, Algae: mg/L)					
	Fish				Daphnids	Algae
	H	P	S	T		
L1	4.60	5.95	4.10	4.10	1.03	0.55
L2	2.95	5.03	5.02	2.84	0.61	0.55
L3	8.29 ^a	4.05	3.97	3.95	1.39	0.85
L4	1.21	1.62	0.67	0.72	0.54	0.70
L5	2.31	2.04	1.73	1.48	0.48	0.45
L6	5.72 ^a	1.55	1.53	1.53	0.47	0.56
L7	1.87	1.95	1.87	1.62	0.75	0.52
L8	3.82	2.54	1.97	1.91	1.48 ^b	0.50
L9	NA ^c	1.91	1.81	2.00	1.29	0.71
L10	4.55	2.74	2.43	2.38	0.68	1.01
Mean	3.92	2.94	2.51	2.25	0.87	0.64
SD	2.19	1.54	1.38	1.09	0.39	0.18
CV	56%	53%	55%	48%	45%	28%

a: Extrapolated values, b: 3 parameters log-logistic method was used because the model using 3 parameters method fitted the data better than that using 2 parameters method. c: NA (IC₂₅ was not available because the data did not fit the model.)

値は4%, 対照区のCVも1~4%と非常に小さく、すべての試験機関において試験内のばらつきが小さく、試験検出力が高いことが示された。US EPAの96時間生長阻害試験について標準物質を用いて実施した85試験における10%点は9%, 90%点は23%であり¹⁶⁾、本試験のPMSDはすべての試験機関で下限値を下回っていた。これは生長量をエンドポイントとした96時間試験と比べ、生長速度をエンドポイントとした72時間試験の方が、試験感受性が高いことを示唆している。ただしこれは、対照区に対する相対的な検出力であり、その大きさの持つ意味は生物・エンドポイント間で異なることに注意する必要がある。

また、試験検出力が高すぎるものが逆に問題となる場合がある。例えば藻類試験のPMSDが最も小さいT5では、生長速度が対照区に対してわずかに2%減少するだけで、統計的に有意な差がつくことを意味しており、NOECが過剰に小さくなる可能性がある（実際にはデータが不等分散であったため、Steel法によりNOECはDunnett法より1濃度高くなった）。NOECを求めた際は、その濃度における阻害率あるいはPMSDを確認し、その阻害率が真に藻類に対し意味のある影響であるのかを考慮する必要があるだろう。

3. 2 標準物質を用いた感受性試験

3. 2. 1 試験機関間変動

Table 6に各試験の各エンドポイントにおける標準物質のIC₂₅を示した。なお、各機関で濃度設定が異なるため、NOECによる比較は行わない。NaClを用いた魚類試験では、生存指標に対するIC₂₅は0.72~4.10 g/Lで平均値は2.25 g/L、SDは1.09 g/L、CVは48%であった。模擬排水の結果と比較して、各エンドポイントにほとんど差はなく、NaClは胚期と仔魚期の両者に影響を及ぼしていることがわかる。US EPAのファットヘッドミノの仔魚成長試験ではNaClに対するIC₂₅は2.6 g/L、6試験機関間のCVは17%であったことと比較すると、本試験では試験機関間CVが大きく、試験機関間の再現性に課題が残る。

NaClを用いたミジンコ繁殖試験ではIC₂₅は0.47~1.48 g/Lであり、平均値は0.87 g/L、CVは45%であった。US EPAが収集した23機関292試験によるNaClのIC₂₅は平均0.92 g/L、試験機関内のCVは32%、試験機関間のCVは29%であった¹⁶⁾。CVは本試験結果の方が大きいですが、平均値がほとんど同じなので全体的な試験感受性は良好である。10機関中5機関が、試験実施経験が1年未満であるこ

とを考慮すると、十分な試験精度を示したと考えられる。米国においてもWET導入当初(1991年)に行われたKClを用いたリングテスト(155機関、物質名を伏せて実施)でのCVは73%と高い³⁾。また、1999年に実施されたリングテストにおいても、参加した34機関中、10機関が試験の有効性条件を満たさなかった¹⁷⁾。対して、本試験ではすべての試験機関が有効性条件を満たしていることから、ニセネコゼミジンコを用いる繁殖試験は日本国内でも十分実施可能であると考えられる。

K₂Cr₂O₇を用いたムレミカツキモ成長阻害試験のIC₂₅は0.45~1.01 mg/Lであり、平均値は0.64 mg/L、CVは28%であった。1999年にUS EPAが実施した標準物質を用いた物質を用いたリングテストでは¹⁷⁾、21試験中の試験機関間のCVは21%であり、本試験のCVはこれよりやや高いが、米国では全体の4割の試験が試験有効性条件を満たしていなかったことを考慮すると、良好な結果であると言える。化審法の同試験ではK₂Cr₂O₇に対するIC₅₀が精度管理に用いられており、あるGLP機関において実施された試験機関内試験では平均1.1 mg/L、SDは0.2であり、平均±2SDは0.7~1.5 mg/Lであった¹⁸⁾。本試験ではIC₅₀は0.78~1.53 mg/Lと、ほぼ平均±2SD以内であったため、試験感受性に問題はないといえる。

3. 2. 2 試験内変動と試験検出力

Table 7に各試験のPMSDと対照区におけるCVをまとめた。魚類感受性試験のPMSDは、US EPAの同等試験のファットヘッドミノの仔魚成長試験のデータを参考に上限値を30%とすると、L1のふ化後生存率、L5のふ化後生存率、生存率、生存指標、L9のふ化率および生存指標において上限値を超過していた。L5とL9については、対照区におけるCVも他の機関に比べて大きかったことが、検出力の低下に影響したと考えられる。ただし、これらの機関を除外してもIC₂₅のCVはほとんど変わらないことから、試験内のばらつきだけではなく、各試験機関で用いているゼブラフィッシュの系統や飼育・試験用水の差が試験機関間の差に影響したと考えられる。

ミジンコ感受性試験の検出力については、PMSDは14~35%で平均22%であり、US EPAによる下限値(10%点)の11%および上限値(90%点)の37%を超過した試験機関はなかった。すなわち、すべての機関の試験内のばらつきと試験の検出力は許容範囲内であるとみなせる。対照区のCVは、機関L5のCVが47%と、US EPAによる上限値(90%点)の42%をやや超過していた。ただし、L5

Table 7 PMSD and Control CV in inter-laboratory test using reference chemicals

Lab ID	PMSD (%)						Control CV (%)					
	Fish				Daphnids	Algae	Fish				Daphnids	Algae
	H	P	S	T			H	P	S	T		
L1	5%	37%	14%	14%	14%	3%	0%	3%	3%	3%	22%	1%
L2	16%	21%	17%	19%	35%	3%	4%	4%	4%	4%	40%	1%
L3	13%	20%	22%	21%	32%	5%	3%	3%	4%	4%	42%	2%
L4	13%	22%	13%	11%	17%	2%	4%	4%	7%	7%	29%	1%
L5	28%	34%	35%	34%	27%	4%	14%	3%	7%	10%	47%	2%
L6	17%	11%	18%	18%	24%	7%	6%	0%	6%	6%	37%	4%
L7	17%	17%	17%	21%	17%	3%	8%	0%	8%	8%	25%	2%
L8	23%	17%	22%	20%	14%	3%	4%	0%	4%	4%	14%	2%
L9	46%	16%	15%	37%	21%	6%	16%	0%	0%	16%	24%	0.4%
L10	23%	16%	9%	9%	18%	2%	0%	0%	0%	0%	9%	1%
Mean	20%	21%	18%	21%	22%	4%	6%	2%	4%	6%	29%	2%

H: Hatchability, P: Post-hatch survival, S: Survival, T: Total index

のPMSDは27%と許容範囲内であるため、検出力に問題ないといえる。

ミジンコ試験では試験内のばらつきの原因となる個体差を減らすために、試験の約1週間前から個別飼育を開始し、産仔状態の良好な親個体を選別し、その仔虫を用いている。良好な産仔状態を維持するためには、まず試験用水の種類（硬度など）や餌の量に配慮する必要がある。しかし、試験機関T1～T9も含めた全試験機関における対照区のCVと、試験用水の硬度および餌の試験容器中の藻類濃度との間には相関はみられなかった（Fig. 1）。したがって、試験用水の硬度以外の水質や、親個体や供試仔虫の選別などの試験操作が機関間差に影響していると考えられる。なお、試験用水の硬度および藻類濃度と、NaClのIC₂₅との相関も示されなかった。Conney らによる試験条件検討によると、試験用水の硬度や餌の量の他に、換水頻度や水温、試験用水の種類、光条件（明暗周期、強度）、餌の種類などが、ニセネコゼミジンコの生存や産仔数に影響する要因として挙げられている^{19, 20}。試験機関によって確保できる試験用水や藻類の種類は異なるため、試験法検討案において、これらの条件は1つに指定されていない（Table 3）。今回参加した15機関では、試験用水は活性炭ろ過水道水またはミネラルウォーター、藻類はク

ロレラまたはムレミカヅキモが主に用いられていたが、各試験機関で最適な条件を検討し、その他の環境条件の維持管理について努めることが重要である。

藻類感受性試験のPMSDは2～7%で平均4%であり、試験排水試験時と同様に、検出力が高いことが分かった。対照区のCVも0.4～4%と他の生物試験と比べても低く、試験内精度の面では3試験中最も安定しているといえる。

3. 2. 3 NOEC と IC_x の検討

PMSDは最小有意差の影響値を意味するため、NOECの同等指標としてIC_xを用いる場合、xをいくつにするべきかについて参考になる。魚類試験の生存指標のPMSDの平均は21%であったため、NOECとIC₂₀を比較してみると（Fig. 2）、PMSDの大きいL5、L9と、NOEC近辺の回帰曲線の傾きが大きかったL3を除いて、ほぼ同程度であり、NOECの同等指標としてIC₂₀が有効である可能性が示された。

同様にミジンコ試験においては、PMSDの平均は22%であったことから、米国およびカナダのガイドラインで用いられているIC₂₅が適当ではないかと考えられる。NOEC、LOECとIC₂₅を比較してみると（Fig. 3）、試験機関によって傾向は異なるが、平均値をとる

Fig. 1 Correlation between Control CV and (a) Hardness of control water, (b) Concentration of food algae in test vessel (cells/mL) in daphnids reproduction test by T1, T2, T4-T9 and L1-L10 laboratories

Fig. 2 Comparison of NOEC and IC₂₀ of NaCl in inter-laboratory test for fish embryo-larva toxicity test. (NOEC for L4 was lower than test concentration, 0.5 g/L. Dunnett test was used for L4 because the number of concentration was too large for Steel test. ※ NOEC for L9 was also invalid because of the limited number of replicates (n=3).)

Fig. 3 Comparison of NOEC, LOEC and IC₂₅ of NaCl in inter-laboratory test for daphnid reproduction test (NOEC for L6 was lower than test concentration, 0.5 g/L)

と、NOEC (0.60 g/L, L6 は LOEC の半値とする) < IC₂₅ (0.87 g/L) < LOEC (1.00 g/L) になった。

藻類試験では、PMSD が平均 4 % であったことから IC₅ を算出し、NOEC は設定濃度未満となった機関が多かったため LOEC と比較してみると (Fig. 4), PMSD が小さい (検出力が高い) L4 と、PMSD が大きい (検出力の低い) L6 を除いて、同程度であった。NOEC が算出できなかった機関の NOEC を LOEC の半値として、10 機関の平均値を算出すると、NOEC (0.20 mg/L) < IC₅ (0.29 mg/L) < LOEC (0.30 mg/L) となった。一方、IC_x の推定は、影響値 x (ここでは阻害率) が低いほど使用した回帰モデルに依存し、影響値 5 % 以下では信頼区間が非常に大きくなる可能性が指摘されている²¹⁾。さらに本試験の場合、生物学的に有意な阻害率は 5 % でも十分に低すぎることを考慮すると、NOEC の同等指標としては IC₅ 程度が妥当と考えられる。

濃度設定や連数、試験内のばらつきが異なる、すなわち試験機関間で検出力 (PMSD) が異なる結果を比較する際は、NOEC より IC_x の使用が有効であるが、PMSD が大きいデータは IC_x の推定精度も悪くなることに留意するべきである。また、今回検証した IC_x は、本試験の PMSD の結果から導き出したものであり、試験精度の異なるすべての結果に当てはまるものではない。統計学的有意差と生物学的有意差の違いをよく理解し、IC_x をどのような目的で用いるかによって慎重に議論することが望まれる。

3. 3 事業場排水実態調査

延べ91の排水試料について、魚類は生存指標、ミジンコは産仔数、藻類は72時間生長速度をエンドポイントとして NOEC を算出し、NOEC の逆数である毒性単位 TU (=100/NOEC%) を算出した。TU は排水を無影響濃度にするために必要な希釈倍率に相当する。Fig. 5 に各生物試験に対する91試料の TU の分布を総数に対する割合 (%) とともに示した。魚類は58%, ミジンコは29%, 藻類は35%の試料が、最高濃度80 ~ 100%でも影響を示さなかった。ミジンコに対する TU の最大値は10,000であり、同試料は藻類に対しても TU の最大値160を示したが、魚類に対しては TU = 2.5 と影響が小さかった。魚類に対する TU の最大値は40で、同試料はミジンコと藻類に対しても TU = 40 を示した。10倍希釈しても影響 (TU > 10) のあった試料数 (カッコ内は総数に対する割合) は、藻類14 (16%), 甲殻類26 (30%), 魚類 7 (8%) であった。いずれかの

生物試験が TU > 10 となったのは33試料で全体の36%に相当した。TU の中央値は、藻類2.5, 甲殻類5, 魚類1.25, 上位10%点は魚類10, ミジンコ38, 藻類20であり、各試料について最も大きい TU を用いて並び替えた場合、上位10%点は40であった。

最も影響を示した生物は各試料で異なっていた。いずれかの生物において TU > 10 となった33試料の内訳をみると (Fig. 6), 1種の生物にのみ影響があった試料数は、魚類2, 藻類4に対し、ミジンコは15と最も多かった。3生物すべてに影響を示したのは4試料のみで、藻類とミジンコの2種に影響したのは6試料、魚類とミジンコに影響したのは2試料、魚類と藻類に影響した試料はなかった。すなわち、感受性の高い1種の生物応答試験を実施するのではなく、感受性の異なる複数の生物を用いて評価する必要性が示された。これらの結果は、平成20 ~ 23年度までの延べ54試料 (27事業場) の結果の傾向とはほぼ変わらなかった²²⁾。

米国では排水が受水域に流入し、ある程度希釈を受けた地点 (Mixing zone 末端) において、生物影響が示されないことが求められている²³⁾ が、日本では排水基準の健康項目が、環境基準の10倍に設定されていることを鑑み、TU > 10 で「排水を改善すべき影響がある」と判定する目安とすると、91試料中の36%が排水改善対象となる。TU > 20 では14%, TU > 40 では4%の試料が該当した。ただし、今回対象とした91試料は50事業場のみのデータであり、同一事業場において経年調査を行っている試料^{24, 25)} も含み、業種 (産業分類中分類) も16種類と限られているため、今後はさらに幅広い業種・事業場を対象としたデータを収集する必要があるだろう。

Fig. 5 Frequency distribution graph of TU of 91 effluent samples using short-term chronic toxicity tests with fish, daphnid, and algae

Fig. 4 Comparison of LOEC and IC₅ of K₂Cr₂O₇ in inter-laboratory test for algal growth inhibition test (* Dunnett test was used for L9 because of limited number of replicates for Steel test even though the data did not show homoscedasticity.)

Fig. 6 The number of samples which showed TU > 10 to all the three species (4 samples), two of them (fish & daphnid: 2 samples, fish & alga: none, daphnid & alga: 6 samples), and only each species (fish: 2, daphnid: 15, alga: 4 samples)

結 論

生物応答を用いた排水試験法検討案について、延べ15機関によって試験排水および標準物質を用いた試験を行い、試験法の実効性や精度について検証した結果、魚類、ミジンコ、藻類を用いた各生物応答試験は、国内の試験機関によって実施可能であり、魚類およびミジンコを用いた試験では、機関間変動がやや大きかったが、試験内精度および試験感受性は、US EPA の事例と比べて十分許容範囲内にあることが示された。また、91試料の事業場排水を調査した結果、10倍希釈してもいずれかの生物に影響のある試料は36%に上った。ミジンコに対して影響を示した排水が最も多いが、試料によって影響のある生物種は異なり、感受性の異なる複数の生物を用いて評価する必要性が示された。

謝 辞

本研究の大部分は平成21年度環境省請負業務「WET 手法を活用した水環境管理手法検討調査」、平成23～25年度環境省請負業務「生物応答を利用した水環境管理手法検討調査」の一環として実施した。事業場排水の調査では、多くの事業場関係者の方々にご協力いただいた。リングテストや感受性試験などの試験法検討案の検証は、14の諸機関の尽力により実現できた。環境省、事業場関係者、および試験参加機関に対し、ここに謝意を表する。

要 約

生物応答を用いた排水管理手法の国内導入に向け、排水の総合的な影響を評価する生物応答試験として、魚類、ミジンコ、藻類を用いた短期慢性毒性試験が採用され、「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」が作成された。試験法案の国内試験機関による実効性や試験精度を検証するため、試験排水を用いて9の試験機関によるリングテストを実施した結果、各試験機関によるNOECはすべて中央値±1濃度以内であり、試験機関間の変動は許容範囲内であることが示された。10の試験機関による標準物質を用いた感受性試験では、US EPAの実施した類似の生物応答試験と比べて、試験機関間変動がやや大きかったが、ほとんどの機関において最小有意差の影響値（PMSD）および対照区のCVは許容範囲内であり、十分な試験内精度および試験感受性が示された。また、NOECの同等指標は、魚類はIC₂₀、ミジンコはIC₂₅、藻類はIC₅である可能性が示された。平成20～25年度にかけて事業場排水91試料の生物応答を調査した結果、10倍希釈してもいずれかの生物に影響のある試料は36%に上った。試料によって影響のある生物種が異なるため、1種の生物応答試験を実施するのではなく、複数の生物を用いて評価する必要性が示された。

文 献

- 1) Power, E.A. and Boumpherey R.S.: International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, **13**, 377-398 (2004)
- 2) Chapman P.M.: Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 3-13 (2000)
- 3) US EPA: Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition. EPA-821-R-02-013, (2002).
- 4) Environment Canada: 2010 Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document (2010)

- 5) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答手法を用いた排水試験（検討案）（2013）
- 6) OECD: OECD Guideline for testing of chemicals 212, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. (1998)
- 7) ISO: International Standard 15088, Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). (2007)
- 8) Environment Canada: Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, EPS1/RM/21, Second Edition. (2007)
- 9) OECD: OECD Guideline for testing of chemicals 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. (2006)
- 10) OECD: OECD Guideline for testing of chemicals 211, *Daphnia magna* Reproduction Test. (2011)
- 11) 経済産業省、厚生労働省、環境省：新規化学物質等に係る試験の方法について、藻類生長阻害試験、環境企発第110331009号（2006）
- 12) R Core Team: R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org/> (2012)
- 13) Ritz C.: Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 220-229 (2010)
- 14) Ritz C.: Package 'drc'. Available at <http://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>, (2013)
- 15) Hall J., Moore T., Hall W. and Shermer S.: Fundamental flaws in EPA's WET validation approach revealed: WET test variability is far worse than chemical methods. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 5415-5426 (2005)
- 16) US EPA: Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System, EPA 833-R-00-003 (2000)
- 17) US EPA: Final Report: Interlaboratory Variability Study of EPA Short-term Chronic and Acute Whole Effluent Toxicity Test Methods, Vol.1, EPA 821-B-01-004 (2001).
- 18) 独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター：藻類生長阻害試験（平成18年11月版）、平成15年度生態影響試験セミナー資料平成18年度差し替え版、http://www.nies.go.jp/risk/seminar_kashin.html#H15（2014/10/1確認）
- 19) Cooney, J.D.C., Pollock, T.L., Degraeve, G.M., Moore, E.L. and Palmer, W.D.: Effects of food and water quality on culturing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 823-837 (1992)
- 20) Cooney, J.D., Lenoble, B.J., Pollock, T.L., Smith, G.J., Degraeve, G.M. and Moore, E.L.: Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 839-850 (1992)
- 21) Moore, D.R.J. and Caux, P.-Y.: Estimating low toxic effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 794-801 (1997) 鍾迫典久、岡 知宏、渡部春奈、阿部良子、高信ひとみ、小塩正朗：生物応答を用いた新しい排水管理手法の検討（1）．日本水環境学会第46回年会、第46回日本水環境学会年会講演集、p.89（2012）
- 22) US EPA: Technical support document for water quality-based toxics control, EPA/505/2-90-001 (1991)
- 23) 渡部春奈、岡 知宏、阿部良子、高信ひとみ、小塩正朗、鍾迫典久：生物応答を用いた新しい排水管理手法の検討（2）．日本水環境学会第46回年会、第46回日本水環境学会年会講演集、p.90（2012）

- 24) 富川恵子, 入江俊行, 内田弘美, 野中祥之, 鍾迫典久: WET
法による事業所排水負荷低減への取り組み, 第22回環境化学討

論会講演要旨集, 25-26 (2013)