

（S2-10）土壌および土壌材料の生態毒性学的特性評価（ISO 15799）に関する検討

○神谷貴文^{1,2}・古川靖英¹・瀬口真理子¹・ISO/TC190 検討部会¹

¹土壌環境センター・²静岡県環境衛生科学研究所

1. 背景および目的

国際的に認められている生態毒性試験法（生物試験）の多くは、土壌・土壌材料に試験物質を添加した条件における生態毒性ポテンシャルを評価するために開発されたものである。毒性作用をもたらす物質を用いた生物試験は、従来の化学分析法を補完するものとして有効である。化学物質の網羅的な特定と定量化は現実的ではなく、複雑な土壌マトリックスとの間で考えられる相互作用（相乗効果/拮抗効果）は化学分析のみでは得ることはできない。そのため、土壌の生態毒性試験は、化学物質の混合物の潜在的な毒性を調査するために使用することができる。

今回取り上げる ISO15799:2019「地盤環境 - 土壌および土壌材料の生態毒性学的特性に関するガイダンス」¹⁾（以下、本規格）は、水生生物と土壌生物への影響に関連する、土壌と土壌材料（例えば、掘削・浄化された土壌、埋め戻し土壌、盛土など）の生態毒性ポテンシャルを評価するための試験方法の選択に関するガイダンスであり、土壌の生息環境と保持機能の維持に反映されるものである。本規格に記載された方法は、TRIADアプローチ、すなわち潜在的な汚染土壌の生態学的評価（ISO 19204²⁾を参照）における使用に適している。そこで本報告では、本規格の構成や考え方についてまとめ、我が国における適用性について考察する。

2. 本規格で扱う土壌機能と適用範囲

2.1 土壌機能

2.1.1 ハビタット機能

土壌／土壌材料が微生物、植物、土壌生物およびそれらの相互作用（biocenoses）のための生息場所として機能する働きをいう。

2.1.2 保持機能

土壌／土壌材料が汚染物質の水を介した移動により食物連鎖に移行しないよう物質を吸着する働きをいう。

- 生態系の構成要素としての物質およびエネルギー循環の制御
- 植物、動物、人間の生活の基盤
- 遺伝子貯蔵のための担体
- 農産物の生産基盤
- 水や汚染物質などの地下水への移動を抑制する緩衝材

2.2 適用分野

2.2.1 生態毒性試験を考慮すべき土壌と土壌利用分野

生態毒性試験は、以下のような土壌や土壌利用分野において検討することが推奨される。

- 自然の生物相互作用または農業を維持するための土壌の機能の評価
- 土壌または土壌材料に存在する生物影響可能性のあるすべての混入物質による複合的生態毒性の評価
- 土壌や土壌材料が地下水や地表水に影響を与える可能性がある場合、潜在的に有害な物質の生態毒性の評価
- 深さ 1m 以内の汚染度の低い土壌または土壌材料（埋立地、盛土）の特定（それ以上処理せずに敷地に残すことが可能）
- 化学分析で確認できなかった潜在的な生態毒性の確認
- 土壌処理の成否のモニタリングと管理（オフサイト、オンサイト／原位置）
- 除染された後地表に適用される土壌／土壌材料のモニタリングと管理

Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials (ISO 15799)

Takafumi Kamitani^{1,2}, Yasuhide Furukawa¹, Mariko Seguchi¹ and Study group on ISO/TC 190¹ (¹GEPC, ²Shizuoka Institute of Environment and Hygiene)

連絡先：〒102-0083 東京都千代田区麹町 4-5 KS ビル 3F （一社）土壌環境センター
TEL 03-5215-5955 FAX 03-5215-5954 E-mail: info@gepc.or.jp

2.2.2 生態毒性試験が不要な土壌および土壌利用分野

地下水汚染を除外できるのであれば、以下の場合、生態毒性試験は必要ない。

- 有害廃棄物として分類される汚染土壌、または化学的／分析パラメーターで明確に特徴付けることができる汚染土壌。ただし、生態毒性試験は浄化後の最終調査や生物学的浄化のプロセス管理に有効な場合がある。
- 商業的／工業的に利用され、園芸的／農業的利用の見込みがない地域
- 建築物やコンクリート、タールマカダム、アスファルトなどの低透水性の覆いで効果的に密閉される予定区域の土壌材料または埋め戻し材

3. 土壌および土壌材料の利用／再利用と土壌機能による試験の選択

3.1 生態毒性試験の使用

毒性物質は、生態系内に存在する異なる種（場合によっては遺伝子型）に異なる濃度で影響を与える可能性がある。そのため、土壌の正確な生態毒性評価には、異なる分類群や栄養段階に属する複数の種を用いた一連の試験を行うことが理想的である。なお、コストがかかる可能性があるフィールドまたはセミフィールド調査による研究はほとんど行われていない。

単純な試験を行い、得られた結果に安全係数を適用することで、より実用的なものにすることは可能であるが、単独種または機能のみで試験を行う場合、高い不確実性を持つ場合がある。したがって、少なくとも微生物プロセス、植物界から各1種、動物界から1種（通常は腐植食性）を試験することが推奨される。複数の生物種を試験する場合、捕食性種を含めるべきである。試験対象となる最小限の生物種の数は、試験法によって異なる。

3.2 試験の選択に関する一般的基準

生態毒性試験の選択には、科学的妥当性、生態学的重要性、実施可能性、許容性が考慮される。また、試験プロトコルが満たすべき基本的な要件として、再現性、統計的妥当性、一般的な受容性、実績などがある。

基準の重要性は状況に応じて変わるものであり、室内で試験生物を容易に培養できることなど、実務的な事象を考慮して決定されるべきである。

本規格で推奨する試験法（表2（本規格の附属書Aに該当）に掲載）は、もともと化学物質の有害性評価のために設計されており、多くはOECD、EU又はISOなどによって国際的に認められている。ほとんどの場合、本規格に示される目的に適合しており、それに加えて土壌／土壌材料の評価のための生態毒性試験の選択では、その利用／再利用の意図と保全すべき土壌機能、特に保持機能とハビタット機能を十分考慮すべきである。表1は、関連する機能に基づく決定スキームの一例を示している。

表1 生態毒性試験と土壌の再利用目的との関連性の一例

土壌の再利用	土壌の機能		
	保持機能	ハビタット機能	
	水生生物	植物生育	生物間相互作用
	生物影響の検出		
密閉された地域	低 ^a	低	低
商業的および工業的に利用されている 非密閉区域	高	低	低
埋立地の被覆	高	高	低
緑地、公園、レクリエーションエリア	高	高	高
園芸または農業に使用される地域	高	高	高

a: 不飽和帯の土壌にのみ適用

表2 参考となる推奨試験システム（本規格附属書 A より抜粋）(1)

1. 陸上試験方法		
1.1 土壌動物相		
内容	規格	タイトル
トビムシ-繁殖影響	ISO 11267	Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola (<i>Folsomia candida</i>) by soil contaminants
ミミズ - 急性毒性	ISO 11268-1	Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 1: Determination of acute toxicity to <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>
ミミズ - 繁殖影響	ISO 11268-2	Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction of <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>
ヒメミミズ - 繁殖影響	ISO 16387	Soil quality — Effects of contaminants on Enchytraeidae (<i>Enchytraeus</i> sp.) — Determination of effects on reproduction
センチュウ - 成長、生殖能力、繁殖への影響	ISO 10872	Water quality and soil quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of <i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda)
カタツムリ - 成長への影響	ISO 15952	Soil quality — Effects of pollutants on juvenile land snails (<i>Helicidae</i>) — Determination of the effects on growth by soil contamination
ベイトラミナ - 急性影響	ISO 18311	Soil quality — Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms — Bait-lamina test
1.2 土壌植物相		
内容	規格	タイトル
根の生育の阻害	ISO 11269-1	Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth
出芽と生長への影響	ISO 11269-2	Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 2: Effects of contaminated soils on the emergence and growth of higher plants
出芽と生長への影響	ISO 22030	Soil quality — Chronic toxicity in higher plants
ソラマメ 小核試験	ISO 29200	Soil quality — Assessment of genotoxic effects on higher plants — <i>Vicia faba</i> micronucleus test
高等植物の発芽と初期生長	ISO 18763	Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants
1.3 土壌微生物		
内容	規格	タイトル
無機化・硝化作用	ISO 14238	Soil quality — Biological methods — Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
アンモニウム酸化 - 迅速試験	ISO 15685	Soil quality — Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification — Rapid test by ammonium oxidation
土壌呼吸量	ISO 17155	Soil quality — Determination of the activity of the soil microflora using respiration curves
マイクロプレート法による酵素活性測定	ISO/TS 22939	Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates
デヒドロゲナーゼ活性の測定	ISO 23753-1	Soil quality — Determination of dehydrogenase activity in soils — Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)
デヒドロゲナーゼ活性の測定	ISO 23753-2	Soil quality — Determination of dehydrogenase activity in soils — Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)

表2 参考となる推奨試験システム（本規格附属書 A より抜粋）(2)

1.3 土壌微生物（続き）		
内容	規格	タイトル
デヒドロゲナーゼ活性を利用した固形物接触試験	ISO 18187	Soil quality — Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of <i>Arthrobacter globiformis</i>
バイオマス-SIR 法	ISO 14240-1	Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate induced respiration method
バイオマス-FE 法	ISO 14240-2	Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation – extraction method
PLFA および PLEL 分析	ISO/TS 29843-1,	Soil quality — Determination of soil microbial diversity — Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis
	ISO/TS 29843-2	Soil quality — Determination of soil microbial diversity — Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the simple PLFA
定量 PCR による土壌中の微生物群の存在比の決定	ISO 11063,	Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples
	ISO 17601 (quantitative PCR)	Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil
2. 水域試験方法		
内容	規格	タイトル
ミジンコ- 遊泳阻害	ISO 6341	Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)
淡水藻類生育阻害試験	ISO 8692	Water quality — Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
淡水魚急性毒性試験	ISO 7346	Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [<i>Brachydanio rerio</i> Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]
魚卵試験	ISO 15088	Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>)
海洋藻類生育阻害試験	ISO 10253	Water quality — Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema costatum</i> and <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .
ミジンコ繁殖試験	ISO 10706	Determination of long term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera crustacea)
ミジンコ慢性毒性試験	ISO 20665	Water quality — Determination of chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i>
ワムシ慢性毒性試験	ISO 20666	Water quality — Determination of chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h
海洋性発光細菌- 発光性細菌試験	ISO 11348	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) (Parts 1,2,3)
海洋性カイアシ類 - 急性毒性試験	ISO 14669	Water quality — determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, crustacea)
コウキグサ- 生長阻害試験	ISO 20079	Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (<i>Lemna minor</i>) — Duckweed growth inhibition
umu 試験	ISO 13829	Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test
サルモネラ菌/ミクロソーム試験	ISO 11350	Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water — Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)

3.3 土壤機能試験における留意点

3.3.1 保持機能

汚染物質が混入した土壤のリスク評価では、水溶性、コロイド状、粒子状物質の水による輸送が大きな役割を担っている。これは、水が混入物質を移動させるだけでなく、液相に含まれる混入物質や代謝物が、微生物、植物、土壤動物に深刻な影響を与える可能性があるためである。溶出液は、水を介した輸送に曝露される生物に対する生態毒性試験に有用である。水を介して移動した物質は、地下水中および地表水中へ移動する際に、代謝や加水分解など様々な変化を受ける可能性があり、希釈により濃度が減少することも考慮する必要がある。さらに、環境変化（pH、化学的・生物学的変化など）により、時間の経過とともに物質が移動する可能性もある。溶出液は、表流水や飲料水に曝露される前の、間隙水や地下水への異物混入の早期指標となる。このような観点から、土壤の用途にかかわらず、地下水と溶出液の調査は最も重要となる。

土壤抽出物を水生試験生物に用いた生態毒性試験では、栄養となるイオンや化合物は水に溶けやすく（少なくとも疎水性の汚染物質よりも）、試験において干渉する可能性がある。

3.3.2 ハビタット機能

1) 生物試験の対照として使用する土壤材料

生態毒性試験では、ある処理で測定されたあらゆるエンドポイントは、対照材料で測定されたものと比較されるのが一般的な原則である。

土壤生物に対する土壤の適合性を評価するためには、異物が混入した土壤または土壤材料と対照材料を比較することが前提となっており、異物混入試料の希釈系列を作成するためにも対照材料が使用されることもある。

対照材料には、いくつかの種類がある。

- 異物が混入していない土壤で試験サンプルと同等の土壤学的特性を持つもの
- 不活性物質（例：珪砂）
- 認証された自然土壤（例：標準土壤）
- 標準化された人工土壤（表2に掲載する ISO 11268-1 および ISO 11268-2、ISO 11267 に記載）

これらの対照材料の選択は、生態毒性評価の目的、実施される生物学的試験の種類、試験生物の要件に依存し、すべての生物学的試験について一般化することはできない。土壤や土壤材料に砂を加えると、多くの生物の成長と発達に不適合な混合物を作ることになる（例：植物成長試験）。たとえ汚染物質と相互作用する可能性があるとしても、生物の自然の生育環境をより忠実に再現できる利点がある、より複雑な対照材料（人工土壤など）を希釈に使用することが望ましい。生物を、その自然な生息環境における主要な特徴と一致しない媒体で培養することにより、ストレスの原因となることがある。

対照材料の要件は、異なる土壤の用途、土壤の種類と起源（例：未攪乱土壤、再充填材、掘削土、浄化土）を考慮しなければならない。栄養不足は、物理的条件と同様に、植物の生長や生物の行動に違いを生じさせることがある。

2) 土壤微生物にとっての基質（培地）としての土壤

土壤微生物叢は、土壤に生息する生物量の約80%を占めている。微生物叢の主な機能は、複雑な有機物を分解し、利用しやすい栄養素に変えることで、炭素、窒素、リン、硫黄の物質循環を維持することである。

- 基質呼吸は、微生物の生息密度を示す指標となる。
- 硝化細菌は、アンモニウムを亜硝酸に、亜硝酸を硝酸塩に酸化する役割を担っており、非常に繊細な微生物群である。硝化の減少は必ずしも生態系に大きな変化をもたらすものではないが、本質的な土壤プロセスの阻害を示す敏感な指標として用いることができる。

土壤中の微生物バイオマスやその他の微生物プロセスを測定する目的は、土壤の肥沃度の持続的な維持、有機化合物を分解する潜在的な能力、および土壤微生物に対する添加物質の影響を評価できるようにすることである。

3) 植物生長の基質としての土壤

植物の根は、微生物に次いで土壤中で最大の生物学的な表面積を有している。根毛や菌根菌（栽培植物ではVA菌根菌（アーバスキュラー菌根菌）、木本植物では外生菌根菌）の存在により、土壤粒子との接触面積は増加する。

他の生物試験と同様に、高等植物を用いた試験は、化学分析で検出された、あるいは検出されなかった汚染物質の生物影響可能性と影響をそれぞれ評価するために設計されている。試験期間を少なくとも14日間とすることで、試験植物自身による土壤の短期的な変化も含まれることになる。

植物への汚染物質の蓄積、代謝、消費者への影響については、これらの試験では対象とならない。また、土壌の肥沃度や生産性の評価には適用されない。

4) 土壌に生息する動物の基質としての土壌

土壌動物は、一般的に以下の4つの機能を果たしている。

- 物理的活動（排水、通気、混合、力学的粉砕）
- 化学的変化（基質が腸を通過した後、排泄物から硝酸塩とリン酸塩の利用が促進され、粘土-腐植複合体の形成が加速される）
- 生物学的変化（土壌マトリックス中の微生物の分布、微生物活性と有機物分解の相乗効果）
- 食物網における重要なつながり

土壌動物に対する汚染物質の影響を調べるために、短期および長期の試験が可能である。ハビタット機能の試験については、亜致死試験パラメーターによる特性評価が特に推奨される。

多様な無脊椎動物を単一の試験方法だけで適切に表現することはできないため、いくつかの試験を組み合わせる必要がある。個々の試験種を選択する際には、以下の基準を考慮する必要がある。

- 栄養段階：例えば、腐植食性種と捕食性種が含まれるべきである。
- 分類群／生理学的グループ：土壌生物群集の生物多様性をカバーするため、少なくとも環形動物と節足動物の代表種を選択しなければならない。
- サイズ／曝露経路：小型、中型、大型土壌生物は、サイズが異なるだけでなく、ライフスタイルも異なるため、曝露経路（例えば、間隙水と食物摂取の違い）も異なる。
- 生態学的役割：少なくとも土壌に生息する種とリターに生息する種は、考慮すべき重要な種である。

4. 我が国における本規格の適用性について

人為的な汚染による土壌機能の劣化が近年世界各国で重要な課題となっており、欧米では、土壌汚染の影響について土壌生物も取り入れた評価手法が検討されている。近年欧州を中心に展開されている TRIAD アプローチ (ISO 19204²⁾) は、汚染土壌のリスク評価において3つのエビデンス (化学、生態毒性学、生態学) を提示することで、効率的かつ生態学的な裏付けを強化する実用的な手法であり、今回紹介した本規格はそのうち生態毒性学的な評価手法の技術面を支援する内容となっている。一方、我が国の土壌汚染対策法は人の健康被害の防止が主目的となっており、土壌生態系を含む生物影響には言及されていない。また、汚染物質の化学的な濃度が重視されており、土壌生物を対象としたような毒性試験はほとんど適用されていないのが現状である。

我が国において土壌生態系への影響が未だ考慮されていない要因の一つとして、在来の土壌動物への毒性影響に関する基礎的な知見が不足していることが挙げられる。例えば表2に挙げられるように、ISO規格で対象となるミミズはツリミミズ科がほとんどであり (ISO 11268-1, 11268-2)、我が国に優占するフトミミズ科に関する記述は少ない。また、カタツムリの成長影響試験 (ISO 15952) ではヒメリンゴマイマイが用いられるが、我が国では農業上、有害な陸貝となっており適用は難しい。我が国の在来種に関する毒性情報に関する知見の集積には大きな労力と時間がかかることに加え、そもそも、土壌動物はパンダやクジラのような環境保護のシンボリックな存在とはなりえないため、土壌動物を土壌汚染に対する指標生物の一つとして設定すること自体、多くの議論があるだろう。

しかし、本規格のように土壌動物を含む土壌生態系全体がもつ機能に注目するのであれば、我が国でも受け入れられやすいのかもしれない。例えば表2にある植物生育に関する内容 (ISO 11269-1, ISO 11269-2, ISO 22030 など) や栄養循環に関する内容 (ISO 14238, ISO 17155 など) などは、人間生活に有益となる土壌機能であると理解され、指標とするにあたりコンセンサスを得やすいと考えられる。ただしその場合も、表1に示された、評価対象となる土地の用途毎に注目すべき土壌機能を整理し、必要性の有無をあらかじめ考えておくことが重要である。我が国においても、将来の法制度化を見据えたデータの収集とともに、欧州を中心とした TRIAD アプローチにみられる site specific な評価手法の進展には今後も注視していく必要がある。

参考文献

- 1) ISO (2019) : ISO 15799:2019 Soil quality — Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials, 50p.
- 2) ISO (2017) : ISO 19204:2017 Soil quality- Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach), 27p.