

(33) 水生生物を用いた各種のバイオアッセイの
下水試料に対する感受性の比較

Comparison of sensitivity of various bioassays
using aquatic organisms to sewage samples

松原正明*、原田新**、南山瑞彦***、田中宏明****

Masaaki MATSUBARA, Arata HARADA, Mizuhiko MINAMIYAMA, Hiroaki TANAKA

ABSTRACT ; The sensitivities of the bioassays using various aquatic organisms to sewage samples were compared. The sewage samples used here were the influent and the secondary effluent obtained from the sewage treatment plant that receives industrial effluent. The aquatic organisms used in this study were *Vibrio fischeri* (MICROTOX®), *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Daphnia carinata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa*, *Thamnocephalus platyurus* (TOXKIT®), *Paraty compressa improvisa*, *Tanichthys albonubes*, *Xenopus laevis*, and *Brachydanio rerio*. The 50 % effective concentration (EC50) values of influent were ranged from 5.6 % (48h-EC50 of *C. dubia*) to 38.0 % (48h-LC50 of *T. albonubes*), and the EC50 values of secondary effluent were ranged from 8.0 % (48h-EC50 of *C. dubia*) to 92.3% (5min-EC50 of MICROTOX®). Among the acute toxicity tests, the tests using *C. dubia*, *T. platyurus*, and frog embryo were relatively sensitive to the sewage samples. The toxicity values for the sewage samples obtained from reproduction tests using *D. magna*, *M. macrocopa*, and *C. dubia* were in the same level. Moreover, we examined the data variation of *D. magna* acute toxicity test. The coefficient of variation (C.V. value) of the data obtained from 4 different organizations (companies) were about 30 %.

KEYWORDS ; Bioassay, Toxicity, Aquatic organism, Sensitivity, Sewage, Effluent

1. はじめに

近年、化学物質の製造、使用は増加の一途をたどっており、それらの中には有害な物質も含まれるため、水域汚染が懸念される。また、下水道の普及が進むにつれ、放流先の水域に占める下水処理水量が増加しており、さらに下水処理水の再利用が積極的になされるようになってきた。このような状況下、平成5年に人の健康の保護に関する水質環境基準及び有害物質に係る排水基準が改訂され、規制対象物質が大幅に追加された¹⁾。これらは、物理化学的分析によって測定されるが、基準に定められている物質は、実際に環境中に存在する他種類の物質のごく一部であり、従来の方法では、定量分析が困難な物質や未知の有害物質には対

* (株) 神戸製鋼所化学環境研究所 (Chemical & Environmental Technology Lab., Kobe Steel, Ltd.)、旧所属****

** (株) 環境調査技術研究所環境部 (Environmental Engineering Div., Environmental Investigation and Technology Institute Co., Ltd.)、旧所属****

*** 環境庁企画調整局 (Planning and Coordination Bureau, Environment Agency)、旧所属****

**** 建設省土木研究所水質研究室 (Water Quality Div., Public Works Research Institute, Ministry of Construction)

応できない、複合影響を評価できないなどの問題がある。また、基準は人の健康に対するリスクに基づくものであり、日本の環境基準は生態系保全の観点からは定められていない。そこで、生物を用いて生物に対する影響そのものを評価する手法であるバイオアッセイ（生物検定）が、多種類の物質が含まれる排水や環境水の毒性を総合的に評価する手法として注目されつつある。バイオアッセイには細菌、藻類、甲殻類、魚類、両生類など様々な水生生物が用いられるが、これらのバイオアッセイを下水試料に適用するためには、それぞれの感受性を知ることが重要である。感受性比較の報告例として、9 種類のミジンコの殺虫剤に対する感受性を比較した報告²⁾、殺虫剤およびその分解物の毒性を種々のバイオアッセイで調べた報告³⁾、産業排水を種々のバイオアッセイで評価した報告⁴⁾などがある。しかしバイオアッセイの感受性を下水試料を用いて比較した例はほとんどない。そこで本研究では、発光細菌、緑藻、7 種類の甲殻類、2 種類の淡水魚、およびカエルを用いたバイオアッセイを下水試料に適用し、感受性の比較を行った。さらに、同一の試験を様々な試験機関で同時に行うことにより試験機関によるデータのばらつきについても検討を行った。

2. 材料および方法

2.1 下水試料

試料として、主に工場排水が流入する下水処理場において、流入水と処理水（塩素消毒前の終沈流出水）をスポットで採水した。採水した試料は、1 μ m のガラス繊維ろ紙（Whatman GF/B）でろ過した。各機関での保存中に流入水の揮発性有機物質（VOC）が揮発することにより、結果がばらつく可能性があった。そのため、流入水については、ガラスボールフィルターを通して試料に空気を送る方法で 2 時間の曝気処理を行い、VOC の除去を GC/MS で確認した後（例えば、クロロホルム 5.7 μ g/l $\rightarrow$ 0.0 μ g/l）、試料として用いた。流入水および処理水の pH はそれぞれ pH8.3、pH7.3 であった。また、COD はそれぞれ 112mg/l、32mg/l であり、全有機炭素（TOC）濃度はそれぞれ 104.6mg/l、30.7mg/l であった。

2.2 バイオアッセイの種類および試験機関

本研究で行ったバイオアッセイの種類および担当した試験機関の一覧を Table 1 に示す。試験機関の PWRI は土木研究所を表す。なお、*Daphnia magna* および *Moina macrocopa* の繁殖試験については、処理水のみを用いた。その他の試験については、流入水および処理水を用いた。

Table 1. Description of bioassays

Test Organism	Bioassay	Conducted by
<i>Daphnia magna</i>	Acute Immobilization Test	A, B, C, D
	TOXKIT®	PWRI
<i>Daphnia pulex</i>	Reproduction Test	A, C
	Acute Immobilization Test	B
<i>Daphnia carinata</i>	TOXKIT®	PWRI
	Acute Immobilization Test	B
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Acute Immobilization Test	D
	Reproduction Test	D
<i>Moina macrocopa</i>	Acute Immobilization Test	E
	Reproduction Test	E
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	TOXKIT®	PWRI
<i>Vibrio fischeri</i>	MICROTOX® Acute Toxicity Test	PWRI
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Growth Inhibition Test	PWRI
<i>Xenopus laevis</i>	Embryo Teratogenesis Assay	PWRI
<i>Tanichthys albonubes</i>	Acute Toxicity Test	F
<i>Paratya compressa improvisa</i>	Acute Toxicity Test	F
<i>Brachydanio rerio</i>	Early-Life Stage Toxicity Test	D

*PWRI, Public Works Research Institute

2.3 試験方法

(1) ミジンコ類を用いた試験

供試生物として、オオミジンコ (*Daphnia magna*)、ミジンコ (*Daphnia pulex*)、*Daphnia carinata*、ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*)、タマミジンコ (*Moina macrocopa*) を用いた。試験は OECD 化学品テストガイドライン⁹⁾に従い行った。ただし、*C. dubia* を用いた試験は米国環境保護庁 (USEPA) の方法⁷⁾に従った。*D. pulex* および *D. carinata* については、急性毒性試験のみを行い、その他については、急性遊泳阻害試験および慢性毒性試験 (繁殖試験) を行った。それぞれの試験から半数遊泳阻害濃度 (EC50) または、最小影響濃度 (LOEC)、無影響濃度 (NOEC) を求めた。NOEC は多重比較法 (Dunnett) を用いた有意差検定により算定した。

(2) MICROTOX®急性毒性試験

米国 AZUR ENVIRONMENTAL 社製の試験システムを用い、添付のプロトコールに従って試験を行った。供試菌として海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を用いた。暴露時間は、5 分および 15 分とし、それぞれについて、50%発光阻害濃度 (EC50) を求めた。

(3) 藻類増殖阻害試験

供試生物として緑藻セテナストラム (*Selenastrum capricornutum*) を用いた。ここでは、96 穴マイクロプレートを用いるカナダ環境省 (Environment Canada) の方法⁸⁾を一部改良した方法⁹⁾で行った。段階希釈した試料 (0.45 μm filter で除菌ろ過) に培地 (最終 N、P 濃度は通常の 4 倍) を添加し、対数増殖期の緑藻を 2×10^4 cells/ml となるように植種した。24°C、4,000Lux、120rpm で 72 時間培養した後、マイクロプレートリーダーを用いて 440nm における吸光度 (細胞濃度に比例) を測定した。I (阻害率%) = $100 \times (R_c - R) / R_c$ (R : 試験区における 72 時間の吸光度 (440nm) 変化、 R_c : 対照区における 72 時間の吸光度 (440nm) 変化) として阻害率 I を算出した後、横軸に試料濃度 (対数)、縦軸に阻害率 I をプロットし、グラフのほぼ直線となる部分のデータを用いて、回帰計算により 50%増殖阻害濃度 (IC50)、25%増殖阻害濃度 (IC25) を求めた。

(4) カエル胚催奇形性試験

供試生物としてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いた。試験は ASTM (American Society for Testing and Materials) に記載されている胚に対する催奇形性試験 (FETAX : the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)¹⁰⁾に従って行った。段階希釈した試料に胞胚期になった胚を 25 個ずつ入れ、24°Cで 96 時間暴露した。ここで用いた試料では奇形は確認できなかったため、死亡をエンドポイントとした。横軸に対数で試料濃度を、縦軸に死亡率をプロットしてグラフを作成し、グラフのほぼ直線となる部分のデータを用いて、回帰計算により半数致死濃度 (LC50)、25%致死濃度 (LC25) を求めた。

(5) TOXKIT®

TOXKIT®はベルギーの Creasel 社より入手し、添付のプロトコールに従って試験を行った。使用したキットは *D. pulex* を用いた DAPHTOXKIT F PULEX®、*D. magna* を用いた DAPHTOXKIT F MAGNA®、ホウネンエビの一種 (*Thamnocephalus platyurus*) を用いた THAMNOTOXKIT F®の 3 種類である。段階希釈した試料に各生物を 24 時間および 48 時間 (*T. platyurus* は 24 時間のみ) 暴露した後、遊泳阻害を観察した。横軸に対数で試料濃度を、縦軸に阻害率をプロットしてグラフを作成し、グラフのほぼ直線となる部分のデータを用いて、回帰計算により半数阻害濃度 (EC50) を求めた。

(6) アカヒレ、ヌカエビを用いた試験

試験は、濃縮試料を用いた急性毒性試験である水族環境診断法 (AOD ; Aquatic Organisms environment Diagnostics)¹¹⁾に従い行った。ただし、試料の濃縮は行わなかった。供試生物として、アカヒレ (*Tanichthys albonubes*)、ヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) を用いた。段階希釈した試料に各生物を 48 時間暴露した後、死亡を観察し、Doudoroff の作図法により半数致死濃度 (LC50) を求めた。

(7) ゼブラフィッシュを用いた試験

供試生物としてゼブラフィッシュ (*Brachydanio rerio*) を用いた。試験は基本的に OECD 化学品テストガイドラインの魚類初期生活段階毒性試験¹²⁾に従って行った。暴露は卵から行い、試験期間は 7 日間とした。試験結果から半数致死濃度 (LC50) および 25% 致死濃度 (LC25) を求めた。

3. 結果

試験結果の例として、Fig. 1 に藻類増殖阻害試験で得られた濃度－影響曲線と回帰計算のための計算式を、Fig. 2 に *T. platyurus* を用いた THAMNOTOXKIT F® で得られた濃度－影響曲線と回帰計算のための計算式を示した。どちらの試験においても試料濃度が高くなるに従って影響が大きくなっており、50% 影響の前後 3～4 つのデータから回帰式を導いた。相関係数 R はいずれも 0.99 以上であり、非常に高い線形性を示した。これらの式を用いて、EC50 (LC50) を算出した。Table 2 に各種のバイオアッセイの試験結果を示した。急性毒性試験の結果、流入水の EC50 (LC50) は、最も小さい値が 5.6% (*C. dubia* の 48h-EC50) であり、最も大きい値が 38.0% (アカヒレの 48h-LC50) であった。また、処理水の EC50 (LC50) は、最も小さい値が 8.0% (*C. dubia* の 48h-EC50) であり、最も大きい値が 92.3% (MICROTOX® の 5min-EC50) であった。

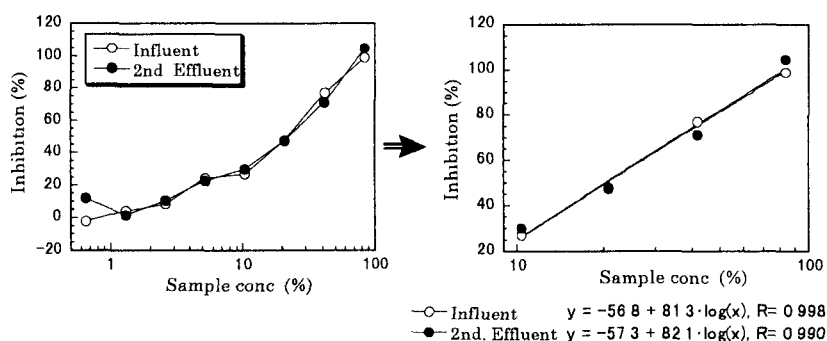


Fig. 1 Dose-response curve for algal growth inhibition test

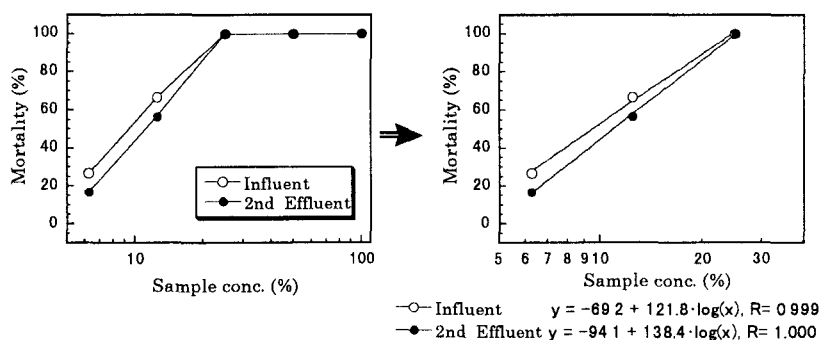


Fig. 2 Dose-response curve for THAMNOTOXKIT F^R

4. 考察

4.1 暴露時間の影響

ミジンコ類を用いた試験は 24 時間および 48 時間の 2 種類の暴露時間で行い、MICROTOX® は 5 分およ

Table 2. Results of bioassays

Test Organism	Bioassay	Conducted by	Sample	Toxicity Value (%)	
<i>Daphnia magna</i>	Acute Immobilization Test	A	Influent	24h-EC50	35.5
				48h-EC50	33.1
			2nd. Effluent	24h-EC50	33.0
				48h-EC50	31.6
		B	Influent	24h-EC50	21.1
				48h-EC50	14.0
			2nd Effluent	24h-EC50	38.2
				48h-EC50	35.1
		C	Influent	24h-EC50	27.2
				48h-EC50	27.2
			2nd Effluent	24h-EC50	23.8
				48h-EC50	19.9
		D	Influent	24h-EC50	22.9
				48h-EC50	22.4
			2nd Effluent	24h-EC50	19.4
				48h-EC50	19.4
	Acute Immobilization Test (TOXKIT®)	PWRI	Influent	24h-EC50	28.1
			2nd. Effluent	24h-EC50	25.0
	Reproduction Test	C	2nd Effluent	NOEC	3.2
				LOEC	8.0
		A	2nd. Effluent	NOEC	< 5.0
<i>Daphnia pulex</i>	Acute Immobilization Test	B	Influent	24h-EC50	30.1
				48h-EC50	19.2
			2nd. Effluent	24h-EC50	30.1
				48h-EC50	22.7
	Acute Immobilization Test (TOXKIT®)	PWRI	Influent	24h-EC50	16.5
			2nd Effluent	24h-EC50	15.1
<i>Daphnia carinata</i>	Acute Immobilization Test	B	Influent	48h-EC50	8.6
				24h-EC50	31.5
			2nd Effluent	48h-EC50	27.5
				24h-EC50	31.2
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Acute Immobilization Test	D	Influent	24h-EC50	7.0
				48h-EC50	5.6
			2nd Effluent	24h-EC50	9.3
				48h-EC50	8.0
	Reproduction Test	D	Influent	7d-EC50	1.0
				7d-EC25	0.7
<i>Moina macrocopa</i>	Acute Immobilization Test	E	Influent	24h-EC50	31.0
				48h-EC50	31.0
			2nd. Effluent	24h-EC50	36.0
				48h-EC50	31.7
	Reproduction Test	E	2nd. Effluent	NOEC	6.3
				LOEC	12.5
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Acute Immobilization Test (TOXKIT®)	PWRI	Influent	24h-LC50	9.5
			2nd. Effluent	24h-LC50	11.0
<i>Vibrio fischeri</i>	MICROTOX® Acute Toxicity Test	PWRI	Influent	5min-EC50	23.7
				15min-EC50	29.8
			2nd Effluent	5min-EC50	92.3
				15min-EC50	91.5
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Growth Inhibition Test	PWRI	Influent	72h-IC50	20.5
				72h-IC25	10.1
			2nd Effluent	72h-IC50	20.3
				72h-IC25	10.1
<i>Xenopus laevis</i>	Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)	PWRI	Influent	96h-LC50	7.3
				96h-LC25	4.1
			2nd. Effluent	96h-LC50	15.0
				96h-LC25	13.0
<i>Tanichthys albonubes</i>	Acute Toxicity Test	F	Influent	48h-LC50	38.0
			2nd Effluent	48h-LC50	44.0
<i>Paratya compressa improvisa</i>	Acute Toxicity Test	F	Influent	48h-LC50	34.0
			2nd Effluent	48h-LC50	67.0
<i>Brachydanio rerio</i>	Early-Life Stage Toxicity Test	D	Influent	7d-LC50	42.0
				7d-LC25	38.0
			2nd. Effluent	7d-LC50	44.0
				7d-LC25	39.4

*PWRI: Public Works Research Institute

び 15 分の 2 種類の暴露時間で行った。そこで、これらの試験について暴露時間の影響について考察するため、毒性単位 TU¹³を $TU=100/EC50$ として求め、処理水、流入水のそれぞれについてグラフを作成した (Fig. 3)。ミジンコ類を用いたバイオアッセイでは、流入水および処理水ともに、24 時間暴露と比較して 48 時間暴露のほうが若干毒性影響が大きい結果が得られた。しかしその差は暴露時間に比例して 2 倍になるということではなく、暴露時間は感受性と手間・時間を考慮して決定すべきであろうと考えられた。MICROTOX®の結果では、処理水のデータは 2 種類の暴露時間でほぼ同一であり、流入水の毒性影響は 5 分暴露のほうが少し大きい結果となったが、差はわずかでありほぼ同程度とみなすことができる。従って、本研究で用いた下水試料は、*V. fischeri* に対して非常に短時間で影響を与え、その後、影響は頭打ちとなる特性を有していることが分かった。

4.2 *D. magna* 急性毒性試験の試験機関間のデータのばらつき

同一の試験を様々な試験機関で行った場合のデータのばらつきについて検討するため、*D. magna* の急性毒性試験を A、B、C、D の 4 つの試験機関で行った (Fig. 3)。流入水を用いた試験の変動係数 (C.V.値) は、24 時間暴露のデータで 21.7%、48 時間暴露のデータで 39.6%であった。また、処理水を用いた試験の変動係数は、24 時間暴露のデータで 30.7%、48 時間暴露のデータで 29.9%であった。従って、試験機関間で 20~40%程度の変動があることが分かった。

4.3 TOXKIT®と標準方法の比較

TOXKIT®で得られた結果を標準方法と比較すると、*D. magna* を用いた試験では、OECD の方法に準じて行ったデータ (A、B、C、D) と近い値が得られたが、*D. pulex* を用いた試験では、TOXKIT®の方が毒性影響が約 2 倍大きい結果となった (Fig. 3)。従って、TOXKIT®は、簡便に毒性評価を行うことができる点において非常に有用であり、十分な感受性があることが分かった。しかし、標準法と比較してデータに若干のずれが生じる可能性があることを考慮しておく必要があると考えられた。

4.4 流入水と処理水の毒性比較及び各種バイオアッセイの感受性の比較

結果の比較を容易にするため、毒性単位 TU を $TU=100/EC50$ (LC50) として求めた。EC50 (LC50) 値として暴露時間が長いほうのデータを用いた。すなわち、ミジンコ類については 48 時間のデータ、MICROTOX®については 15 分のデータ、その他の試験については、暴露時間が 1 種類であるためそれらのデータをそれぞれ用いた。得られた TU の値をグラフ化し、Fig. 4 に示した。それぞれの試験において流入水と処理水の毒性を比較すると、ほとんどの試験で両試料の毒性は同程度であった。過去に報告した他の下水処理場 (生活系排水主体) の結果⁹⁾では、流入水でみられた毒性が処理水では認められなくなっており、本研究で採水した処理場とは異なっていた。本研究で用いた流入水は試験前に実験室で曝気処理を行い、VOC の除去を確認した後に用いており、また処理水は生物処理後の水であるにもかかわらず残留性のある物質が存在することがこの下水処理場の特徴であると考えられる。カエル胚を用いた試験や MICROTOX®

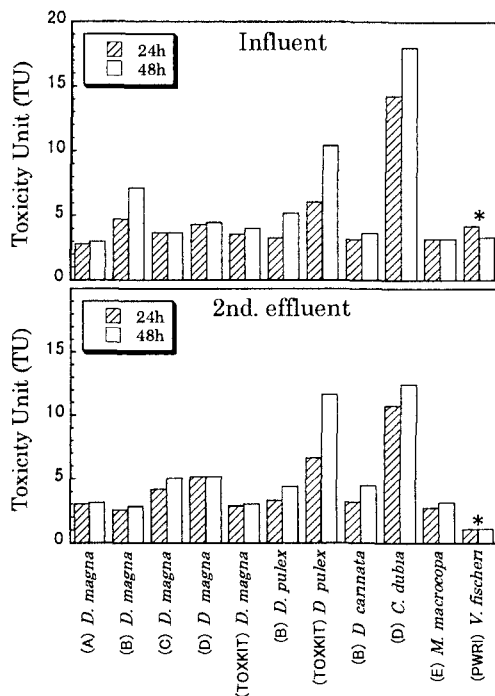


Fig.3 Effect of exposure time on the results of various bioassays

**V. fischeri*, ▨5min, □15min

では、流入水の毒性が処理水と比較して 2 倍以上強いという結果が得られており、試験の種類によってそれぞれの試料に対する感受性が異なることが明らかとなった。

次に、各試験の感受性を調べるため TU の比較を行った (Fig. 4)。Fig. 4 の試験は、ほとんどが急性毒性試験であるが、藻類増殖阻害試験は慢性毒性を調べる試験であり、カエル胚を用いた試験とゼブラフィッシュの卵を用いた試験は亜急性毒性を調べる試験である。また、それぞれの試験は暴露時間が異なっているため単純に比較はできないが、TU を横並びで比較すると、*D. pulex* (TOXKIT®)、*C. dubia*、*T. platyurus*、カエル胚を用いた試験が、今回用いた下水試料に対して比較的感受性が高いことが分かった。

4.5 繁殖試験の比較

処理水を用いた繁殖試験については、*D. magna* の NOEC は、試験機関 C では 3.2%、試験機関 A では <5.0% (5.0% でわずかに影響がみられた) であった。*M. macrocopa* の NOEC は 6.3% であり、*C. dubia* の EC25 (ほぼ NOEC に相当) は 5.6% であった。従って、繁殖試験ではこれら 3 種類のミジンコの感受性は同程度であった。ただし、*C. dubia* の場合は、急性毒性試験の EC50 の方が繁殖試験の EC50 より小さい値となっていた。両者の試験方法の違いは、繁殖試験にのみ、餌 (*Selenastrum capricornutum*+YCT (mixture of yeast, cerophyl, and trout chow)) を添加している点であり、このような結果となったのは、繁殖試験における YCT による毒性物質の吸着や良好な栄養状態による耐性の上昇が原因であろうと考えられた。

5. まとめ

工場排水が主に流入する下水処理場の流入水および処理水を用いて、様々なバイオアッセイを複数の試験機関で行い、試験間の感受性比較および試験機関間のばらつきを検討した結果、以下の知見が得られた。

①急性毒性試験の結果、流入水の EC50 (LC50) は、最も小さい値が 5.6% (*C. dubia* の 48h-EC50) であり、最も大きい値が 38.0% (アカヒレの 48h-LC50) であった。また、処理水の EC50 (LC50) は、最も小さい値が 8.0% (*C. dubia* の 48h-EC50) であり、最も大きい値が 92.3% (MICROTOX®の 5min-EC50) であった。

②暴露時間の影響について調べた結果、ミジンコ類を用いたバイオアッセイでは、流入水および処理水ともに、24 時間暴露よりも 48 時間暴露の方が若干毒性影響が大きい結果が得られた。MICROTOX®の結果では、毒性影響は 2 種類の暴露時間でほぼ同一であった。

③*D. magna* の急性毒性試験について 4 つの試験機関で得られたデータを比較すると、流入水を用いた試験の変動係数 (C.V. 値) は、24 時間暴露のデータで 21.7%、48 時間暴露のデータで 39.6% であった。また、処理水を用いた試験の変動係数は、24 時間暴露のデータで 30.7%、48 時間暴露のデータで 29.9% であり、20~40% の試験機関間誤差があることが分かった。

④試験結果を TU で表して比較した結果、流入水に対する感受性と処理水に対する感受性の差が試験の種

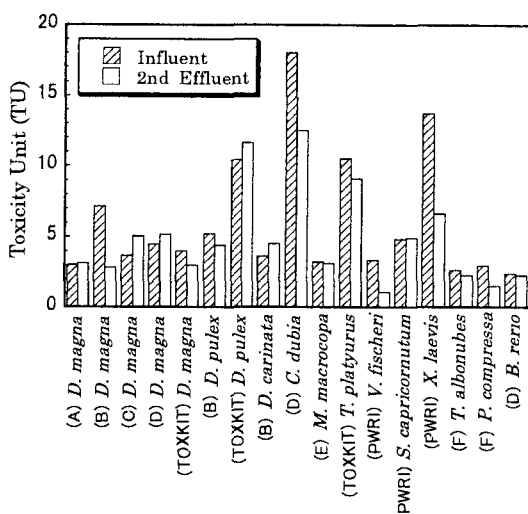


Fig. 4 Toxicity units of various bioassays for the sewage samples

Exposure times. *T. platyurus*; 24h, *V. fischeri*; 15min, *S. capricornutum*; 72h, *X. laevis*; 96h, *B. rerio*; 7d, the others, 48h

類によって異なっていた。

⑤各試験の結果をTUにより比較すると、ミジンコ類の中では *C. dubia*、*D. pulex* (TOXKIT®) を用いた試験が、またその他に *T. platyurus* やカエル胚を用いた試験が、今回用いた下水試料に対して比較的感受性が高いことが分かった。

⑥慢性毒性試験（繁殖試験）では3種類のミジンコ (*D. magna*、*M. macrocopa*、*C. dubia*) の感受性は同程度であった。

本研究では、工場排水が主体の処理場において採水した試料を用いて試験を行ったが、今後、他の排水についても同様の試験を行い、さらに検討を行っていく必要がある。

なお、本論文中の A、B、C、E は民間の試験機関であり、土木研究所から委託を行ったものである。また、F 試験機関は「水域における毒性物質把握手法の開発に関する共同研究」を実施している社団法人茨城県公害防止協会であり、土木研究所と共同研究を実施した成果の一部である。さらに、D 試験機関は株式会社日本紙パルプ研究所であり、*D. magna*、*C. dubia* およびゼブラフィッシュを用いた試験にあたってご協力を頂いたことに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 環境庁監修：新しい排水基準とその分析法，環境化学会（1994）
- 2) 小神野豊，石塚房枝，畠山成久：ミジンコの殺虫剤に対する感受性の種間差について，第3回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集，29-30（1997）
- 3) 田中明男，岡村秀雄，羅栄，青山勲：殺虫剤 Imidacloprid とその光分解物に関する毒性の影響，第31回日本水環境学会年会講演集，562（1997）
- 4) 楠井隆史，Christian Blaise，佐藤美和子，清水宏裕，田嶋美樹，筒井孝次：富山県内の産業排水の生態毒性評価，環境工学論文集，33，215-226（1996）
- 5) OECD: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, 202 “*Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test”（1984）
- 6) OECD: proposal for update guideline 211 “*Daphnia magna* Reproduction Test”（1997）
- 7) U.S.EPA: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th ed.（1993）
- 8) Environmental Protection, Conservation and Protection, Environment Canada: Biological test method: Growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*, Report EPS 1/RM/25（1992）
- 9) 松原正明，原田新，田中宏明：藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試料への適用，水環境学会誌，20(11)，768-775（1997）
- 10) ASTM: Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax), Annual Book of ASTM Standards, E1439-91（1993）
- 11) 玉井信行，水野信彦，中村俊六編：河川生態環境工学（魚類生態と河川計画），東京大学出版会（1993）
- 12) OECD: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, 210. “Fish, Early-Life Stage Toxicity Test”（1993）
- 13) USEPA: Technical support document for water quality-based toxics control, EPA/440/4-85/032（1985）