全排水毒性試験における藻類生長阻害試験の小スケール法の検討

古閑 豊和, 柏原 学, 平川 周作, 志水 信弘, 石橋 融子

福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野39)

[2018年8月21日受付, 2019年3月6日受理]

Development of an Algal Growth Inhibition Test as Small-Scale Method for Testing Whole Effluent Toxicity

Toyokazu KOGA, Manabu KASHIWABARA, Shusaku HIRAKAWA,
Nobuhiro SHIMIZU and Yuko ISHIBASHI

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
(39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135)

[Received August 21, 2018; Accepted March 6, 2019]

Summary

Since 2009, Ministry of the Environment, Japan has discussed the issues in using “Whole Effluent Toxicity (WET) test” from both technical and legal standpoints. One of the issues is the current expensive cost of the WET test. Therefore, it is necessary to develop a simpler and cheaper toxicity test. In this study, we developed a small-scale algal growth inhibition test (small-scale method) to test for toxicity. Among several test vessel sizes and test medium volumes examined for the small-scale method, the growth rate using a 50 mL glass Erlenmeyer flask with 20 mL of test medium was found to be the most comparable to that of the existing draft protocol of the algal growth inhibition test (the existing method). The developed small-scale method was first evaluated by testing of potassium dichromate and 3, 5-dichlorophenol. In the testing of potassium dichromate, it was shown that the IC_{25} and control coefficient of variation (CV) of the growth rate were at acceptable levels compared with findings from the Japanese laboratory. Furthermore, the no observed effect concentration (NOEC), IC_{25} , and IC_{50} of the wastewater samples by the small-scale method were almost the same as those by the existing method, although the detection power of the small-scale method was somewhat lower. We investigated 25 effluent samples by the developed small-scale method. Algal growth inhibition was confirmed with 8 wastewater samples in the lowest concentration group (20% concentration group). Our results suggest that the developed small scale method is effective for identifying the tendency of algae growth inhibition.

In addition, the developed small-scale method was able to test multiple samples simultaneously. Therefore, it is possible that Toxicity Identification Evaluations (TIEs) can be performed efficiently by our new developed small-scale method.

Key words: whole effluent toxicity, algal growth inhibition, small-scale method

1. はじめに

産業活動で発生する事業場排水や下水処理水は、未処理のまま水環境中に排出されないように、排水規制に基づいて事業者による自主管理や行政による監視が行われている。この排水規制の取り組みの中でアメリカやカナダ、ヨーロッパ諸国では魚類や甲殻類、藻類を用いて生物個体の生死や生長、繁殖といった生物応答を活用した指標によって排水検査を行っている¹⁾。生物応答を活用した指標の利点は、従来の機器分析では把握することができない複数の化学物質による複合影響や未規制物質及び分解生成物の生物影響を評価できることにある²⁻⁵⁾。また、生物応答を活用した排水検査では魚やミジンコなどを用いるため、試験結果が一般市民にも理解しやすい⁶⁾。

日本では、2010年度より環境省において生物応答を用いた排水管理が技術面と制度面で検討されている⁷⁾。その検討の中で、「生物応答を用いた排水試験（以下、全排水毒性試験）」について「排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会」で議論され、「藻類、甲殻類、魚類の3種類の水生生物を用いた短期慢性毒性試験（試験期間は3日間から7日間程度）」が平成25年度に「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（以下、試験法）として公表されている⁸⁾。日本国内における全排水毒性試験による調査事例は複数報告⁹⁻¹³⁾されており、特に渡部¹²⁾は、50箇所の事業場を調査している。しかし、全排水毒性試験の導入にあたっては、1検体あたり100万円程度（平成27年度当時）とされている高額な試験コストが事業者にとって負担になることが指摘されており^{14, 15)}、試験コストの低減が期待できる簡易分析手法の開発が求められている¹⁶⁾。

試験法では、藻類・甲殻類・魚類の3種類の水生生物を用いた毒性試験によって生物への影響を検知する。試験法のムレミカヅキモによる藻類生長阻害試験は OECD TG201に準拠されており、指数増殖期の藻類を対照区および排水希釈列に添加して72時間曝露し、24時間毎の細胞濃度を測定して生長速度を算出し、対照区と比較することで藻類の生長に対する影響を評価する試験である。この試験は、一般的に250～500 mLのガラス製三角フラスコを試験容器とするため、スペースの確保が必要であり、培養装置によっては一度に試験できる検体数が限られてしまう。また、試験法では、排水試料の量として、1 L程度は必要であり、水質分析も同時に行う場合には、多量の排水試料を必要とする。

そこで本研究では、効率化と操作性の向上を目指し、試験法に準拠した藻類生長阻害試験の小スケール化のために試験容器と容器あたりの試料量を減らせるかどうかの検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 供試藻類及び使用培地

藻類は国立環境研究所微生物系統保存施設から入手したムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35)) を用いた。これをC培地により継代培養し、試験にはC培地から OECD 培地に接種してから約3日後の細胞密度が $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mL に達したものを前培養液として使用した。OECD 培地は、希釈するだけで簡単に調整できる市販の OECD 培地濃縮液 (富士フィルム和光純薬株式会社製) を超純水で希釈して使用した。

2. 2 試験容器及び流量

試験法を従来法と定義し、従来法の試験容器は300 mL ガラス製フラスコを用い、培地容量は100 mL とした。

小スケール化した藻類生長阻害試験を小スケール法と定義した。小スケール法で検討した試験容器は10, 20, 30, 50 mL ガラス製三角フラスコであり、溶媒の蒸発や外部からの汚染を防ぐ目的でシリコ栓を使用できるよう首長フラスコを使用した。シリコ栓はバイオシリコ (信越ポリマー株式会社製) を用いた。培地容量の下限は、24時間毎に生物量測定として一定量 (0.1～1 mL 程度) の試験溶液を採取するため10 mL とし、培地容量の上限は振とう培養条件 (100 rpm) で搅拌均匀な量とした。

2. 3 試験容器の評価方法

小スケール法における試験容器について、従来法と生長速度を比較し、さらに試験有効性条件を満たすことが出来ているかどうかを評価した。生長速度の評価方法は、対照区と各試験について t 検定と従来法の結果を基準 (Standard method) として小スケール法の結果 (Small-scale method) から乖離率 [(Small-scale method - Standard method) / Standard method $\times$ 100] を算出して比較した。乖離率の目標値は $\pm 10\%$ とした。

1 試験あたりの繰返し数は6連 (対照区および10～50 mL 容器試験区) として、2 回試験 (試験容器の検討) を実施した。なお、OECD 培地濃度は、100%の条件で試験を実施した。試験期間は72時間とした。初期生物量は5000 cells/mL とし、培養条件は、水温が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光強度が $100 \pm 15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (連続照射) で振とう培養 (100 rpm) した。藻類培養装置は、温度調整可能な藻類培養チャンバーを製作し、振とう機 (オービタルシェイカー AS-MOR, As One 製) を3台設置して使用した¹⁷⁾。生物量は曝露24時間後に試験液を1 mL 採取し、48時間と72時間後にそれぞれ0.1 mL ずつ採取 (試験終了時を除く培養期間内に合計1.1 mL 採取) して粒子計測装置

(CDA-1000, シスメックス社製) にて細胞数を測定した。

2. 4 標準物質による藻類感受性試験

従来法と小スケール法について、化学物質の感受性を標準物質による感受性試験により評価した。感受性試験の標準物質は試験法に示されている重クロム酸カリウム ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 富士フィルム和光純薬株式会社製, 純度99.5%) 及び3,5-ジクロロフェノール (3,5-DCP, 富士フィルム和光純薬株式会社製, 純度98.0%) を用いた。3,5-ジクロロフェノールは、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF, 関東化学株式会社製, 高速液体クロマトグラフィー用) に溶解させた。

OECD 培地のみの試験区を対照区とし、重クロム酸カリウムの濃度区を6濃度区 (設定濃度: $0.08 \sim 2.56 \text{ mg/L}$, 公比2) 設定した。対照区は6連、その他濃度区は3連で実施した。3,5-ジクロロフェノールの濃度区は5濃度区 (設定濃度: $0.64 \sim 4.19 \text{ mg/L}$, 公比1.6) 設定した。3,5-ジクロロフェノールは、DMF を添加した助剤対照区を6連 (対照区は3連)、その他濃度区は3連で実施した。濃度測定は、重クロム酸カリウムについてクロムとして JISK 0102, 65.2.5, ICP 質量分析法¹⁸⁾ にて測定し重クロム酸カリウム濃度に換算した。測定機器は ICP-MS (Agilent: 7900) を用いた。3,5-ジクロロフェノールは、LC/MS/MS (Waters: Quattro micro) にて測定した。分析カラムは InertSustain C18 (ジエールサイエンス株式会社製, 内径2.1 mm 長さ100 mm, 粒子径 $3 \mu\text{m}$) を使用し、移動相はA液にアセトニトリル (富士フィルム和光純薬株式会社製, LC/MS 用) をB液に精製水 (関東化学株式会社製, LC/MS 用) に5 mmol/L となるように酢酸アンモニウム (富士フィルム和光純薬株式会社製, 高速液体クロマトグラフ用) を添加したものを使用した。標準物質濃度について試験開始前と試験終了後の測定濃度を幾何平均値として算出し、結果を解析した。試験期間や培養条件は2.3 試験容器の評価方法と同様に実施した。なお、OECD 培地濃度は、100%の条件で試験を実施した。

2. 5 事業場排水における従来法と小スケール法の比較方法

事業場排水について従来法と小スケール法を比較するため、2017年度に事業場 AA 及び AB の排水水を1 L ポリエチレン製容器に採水した排水試料を使用した。排水試料は60 μm のナイロンフィルター (メルク社製) でろ過し、生物試験に使用するまで 4°C にて保存した。なお、事業場 AA および AB の排水は後述する2.6 小スケール法による事業場排水の評価方法で用いた排水試料 (A～Y) とは異なる排水試料を用いた。

濃度区は無希釈の排水試料を100%と定義した。濃度区は対照区 + 5濃度区 (5～80%, 公比2) を設定した。培養条件について OECD 培地濃度以外は、2.3 試験容器の評価方法及び2.4 標準物質による藻類感受性試験を踏まえて決定した小スケール法の条件に従った。OECD 培地濃度は対照区及び各濃度区で一定となるように通常の20%相当 (濃度区80%の培地濃度に統一) に調整し、従来法は300 mL フラスコに培地100 mL を、小スケール法は50 mL 容器に培地20 mL を添加した。

2. 6 小スケール法による事業場排水の評価方法

2017年度に福岡県内の25の事業場排水 (事業場名: A～Y) を褐色ガラス瓶または、ポリエチレン製容器に500～1000 mL 採水した。事業場の業種は平成25年10月改訂の日本産業分類 (中分類) の区分で13業種を選択した。内訳を Table 1 に示す。排水試料は60 μm のナイロンネットフィルター (メルク社製) でろ過し、原則として36時間以内に生物試験に供したが、事業場 (M～O) は、36時間以内に試験できなかった。試験できなかった排水試料は、生物試験に使

Table 1 Industrial classification of 25 samples

Industrial classification	No. of Sample
Manufacture of food	4
Manufacture of beverages, tobacco and feed	1
Manufacture of chemical and allied products	4
Manufacture of ceramic, stone and clay products	1
Manufacture of iron and steel	1
Manufacture of fabricated metal products	3
Electronic parts, devices and electronic circuits	1
Manufacture of electrical machinery, equipment and supplies	1
Manufacture of transportation equipment	2
Collection, purification and distribution of water, and sewage collection, processing and disposal	2
Scientific and development research institutes	2
Medical and other health services	2
Waste disposal business	1

用するまで最長1週間4℃にて保存した。

試験法において、試験濃度は5濃度区となっているが、本研究では、藻類生長阻害の有無を確認する試験として活用させるため、濃度区を20%, 40%, 80%の3段階として多検体同時測定できるようにした。使用した培養装置¹⁷⁾は、50 mL フラスコが105個入る大きさである。そのため対照区に用いるフラスコが6個と1検体あたり使用するフラスコが9個(3濃度区×フラスコ3個)と考えると、11検体が同時に測定できる。培養条件について OECD 培地濃度以外は、2.3 試験容器の評価方法及び2.4 標準物質による藻類感受性試験を踏まえて決定した小スケール法の条件に従った。OECD 培地濃度は対照区及び各濃度区で一定となるように通常の20%相当(濃度区80%の培地濃度に統一)に調整し、50 mL 容器に培地20 mL を添加した。

2. 7 事業場排水の水質測定

試験に使用した事業場排水の水質を調査するため、pH, EC, BOD, COD, T-N, T-P を測定した。検査方法は、JISK 0102工場排水試験法に従った¹⁹⁾。pH 及び EC は、JIS K0102 12.1 ガラス電極

法で行った。EC 測定は、JISK 0102 13. 電気伝導率にて行った。pH 及び EC の測定機器は pH/EC メーター (MM-60R, TOADKK 製) を用いた。BOD は、JISK 0102 21. 生物化学的酸素消費量 (BOD) に従い溶存酸素計 (YSI Model 57 Dissolved Analog Oxygen Meter, YSI 社製) にて測定した。COD は、JIS K 0102 17. 100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量(COD_{Mn})で実施した。T-N は、JISK 0102 45.2 紫外線吸光度法にて測定した。T-P は、JISK 0102 46.3.1 ペルオキシ二硫酸カリウム分解法にて行った。T-N 及び T-P の測定機器は、分光光度計 (UVmini-1240, 株式会社島津製作所製) を用いた。

2. 8 統計処理

試験のエンドポイント(生長速度)について最大無影響濃度 NOEC (No observed effect concentration) 及び x% 阻害濃度 IC_x (x% inhibition concentration) を統計解析ソフト R²⁰⁾ を用いて算出した。統計処理の手法に関しては試験法に従った。R の計算に用いる関数等は渡部ら¹²⁾の方法に従った。さらに、排水試料の毒性値については、NOEC の逆数である毒性単位 TU (Toxic Unit, TU = 100/NOEC) を算出した^{12, 13)}。また、小スケール法の試験の検出力を評価するため最小有意差の影響値である PMSD (Percent of MSD)^{21, 22)} を算出し従来法と比較した。t 検定と相関分析についても統計ソフト R を用いて解析した。

3. 実験結果及び考察

3. 1 小スケール法の条件検討

3. 1. 1 従来法と小スケール法の生長速度の比較

各試験容器における藻類の生長速度の結果を Table 2-1 と Table 2-2 に示す。1 回目と 2 回目の試験容器の検討において従来法の生長速度は、それぞれ 1.84, 2.03 となり、他の試験容器と比較して最も高かった。なお、試験有効性条件である対照区の毎日の生長速度の変動係数の平均値 (35% を超えないこと) 及び繰り返し間の生長速度の変動係数 (7% を超えないこと) について 1 回目の検討では各試験・条件で達成していたが、2 回目の試験容器の検討では 50 mL フラスコに培地 10 mL を添加した場合と 30 mL フラスコに培地 10 mL を添加した場合及び 20 mL フラスコに培地 10 mL を添加した場合で試験有効性条件を達成しなかった。

試験有効性条件を達成した小スケール法の各試験・条件と従来法の生長速度を比較すると、小スケール法の全ての試験・条件において従来法より減少していた。50 mL フラスコでは、培地を 20 mL 及び 30 mL 添加した場合に 1 回目と 2 回目の試験容器の検討で目標乖離度 (±10%) を満たし、1 回目及び 2 回目の検討を通じて培地 20 mL を添加した場合に乖離度が -6.5% と -5.4% となり最も良好な結果となった。30 mL フラスコでは、培地を 15 mL 及び 20 mL 添加した場合に 1 回目と 2 回目の試験容器の検討で目標乖離度 (±10%) を満たし、1 回目及び 2 回目の検討を通じて培地 15 mL を添加した場合に乖離度が -7.6% と -3.4% となり最も良好な結果となった。次に従来法と小スケール法の各試験・条件を統計解析 (t 検定) した結果は 1 回目の検討では各試験・条件で $p < 0.05$ で有意であった。一方、2 回目の試験容器の検討では 30 mL フラスコに培地 15 mL を添加した場合に従来法と比較して統計的な差は認められなかった ($p < 0.05$)。さらに、試験有効性条件を達成した小スケール法の試験・条件において 1 回目の試験容器の検討で 50 mL フラスコに培地 10 mL を添加した場合に生長速度が 1.38 となり他の試験・条件と比較して最も低くなった。藻類の増殖は、温度や光強度、培地の容量に依存するとされる⁸⁾。また、松原ら²³⁾のマイクロプレー

Table 2-1 Results for average growth rate and pH values of 10-300 mL flask (Test No.1)

Test No.1									
Flask volume (mL)	Medium volume (mL)	Average growth rate (0-72 hour)	S.D.	Average growth rate C.V. (%)		t-test p-value	Deviation rate* (%)	pH	
				CV of 72h growth rate in control	Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control			0 hour	72 hour
300 (Standard method)	100	1.84	0.0508	2.8	12	-	-	7.9	7.7
50 (Small-scale method)	10	1.38	0.0294	2.1	20	<0.001	-25	7.9	7.9
	20	1.72	0.0506	2.9	16	0.002	-6.5	7.9	8.2
	30	1.70	0.0345	2.0	4.2	<0.001	-7.6	7.9	8.1
30 (Small-scale method)	10	1.59	0.0465	2.9	13	<0.001	-14	7.9	8.1
	15	1.70	0.0223	1.3	16	<0.001	-7.6	7.9	8.1
	20	1.69	0.0415	2.4	16	<0.001	-8.2	7.9	8.3
20 (Small-scale method)	10	1.57	0.0436	2.8	18	<0.001	-15	7.9	8.2
10 (Small-scale method)	10	1.60	0.0368	2.3	14	<0.001	-13	7.9	8.1

* : [(Small-scale method - Standard method) / Standard method] × 100

Table 2-2 Results for average growth rate and pH values of 10-300 mL flask (Test No.2)

Test No.2									
Flask volume (mL)	Medium volume (mL)	Average growth rate (0-72 hour)	S.D.	Average growth rate C.V. (%)		t-test p-value	Deviation rate* (%)	pH	
				CV of 72h growth rate in control	Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control			0 hour	72 hour
300 (Standard method)	100	2.03	0.0585	2.9	2.2	-	-	8.2	8.1
50 (Small-scale method)	10**	1.43	0.1120	7.8	15	<0.001	-30	8.2	8.1
	20	1.92	0.1030	5.4	12	0.041	-5.4	8.2	8.9
	30	1.89	0.0268	1.4	8.4	<0.001	-6.9	8.2	9.6
30 (Small-scale method)	10**	1.79	0.3620	20	16	0.159	-12	8.2	8.1
	15	1.96	0.0793	4.0	19	0.093	-3.4	8.2	9.2
	20	1.92	0.0334	1.7	4.3	0.002	-5.4	8.2	9.5
20 (Small-scale method)	10**	1.88	0.2150	11	22	0.137	-7.4	8.2	8.8
10 (Small-scale method)	10	1.90	0.0646	3.4	7	0.003	-6.4	8.2	9.0

* : [(Small-scale method - Standard method) / Standard method] × 100

** : Validity of test was not met

トを用いた藻類増殖阻害試験に関する報告では、藻類の増殖量を上げるために培地中の藻類細胞の分散と気体の置換効率を高める方法で培養を行っている。本研究では、試験容器の容量と培地量が異なることで攪拌具合と培地が気相と接触する面積が変わることにより生長速度の差となったことが推測された。また、今回の試験容器の検討において pH の変動は基準である 1.5 以内であったものの、試験終了時（72 時間後）の pH について従来法及び小スケール法の各試験・条件を比較すると、培地量が容器容量の 40% 以上となると pH が増加する傾向にあった。これは、試験容器の密閉度が関係していると考えられ、藻類の光合成に必要な二酸化炭素の交換率が減少したためと推測される。

次に、細胞濃度測定時の培地分取量が増加することで残存培地量が減少し、細胞濃度に対して栄養が不足している可能性が示唆される。そのため、24 時間毎の培地減少率が藻類生長速度へ与える影響を従来法の結果と比較した（Table 2-3 及び Table 2-4）。培養開始から 24 時間後（0～24h）は、1 回目の試験容器の検討では 50 mL フラスコで培地 20 mL 及び培地 30 mL を添加した場合に、10 mL フ

ラスコでは培地 10 mL を添加した場合に従来法と比較して統計的な差は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。2 回目の試験容器の検討では 30 mL フラスコに培地 20 mL を添加した場合に従来法と比較して統計的な差は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。培養開始から 24 時間後までは、培地分取による影響はないため、前述したように試験容器の違いによる攪拌具合等が、強く生長速度に影響を与えていると考えられる。一方、試験開始から 48 時間後（0～48h）及び 72 時間後（0～72h）では、1 回目の試験容器の検討において従来法と比較して全ての試験・条件において生長速度に差が認められた（ $p < 0.05$ ）。2 回目の検討では試験開始から 48 時間後（0～48h）では、50 mL フラスコに培地 30 mL を添加した場合と 30 mL フラスコに培地 20 mL を添加した場合で従来法と比較して統計的な差は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。さらに、72 時間後（0～72h）では、30 mL フラスコに培地 15 mL を添加した場合で従来法と比較して統計的な差は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。これは、試験容器の違いによる攪拌具合と培地分取による影響と推測される。培養開始から 48 時間までの生長速度結果より、小スケール法における培地の減少率が 5.0%

Table 2-3 Results for reduction rate of medium and average growth rate of 10–300 mL flask in test period (Test No.1).

Flask volume (mL)	Medium volume (mL)		Culture time					
			24h	t-test p-value	48h	t-test p-value	72h	t-test p-value
300 (Standard method)	100	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	1.0	-	1.1	-
		Average growth rate	1.60	-	1.82	-	1.84	-
50 (Small-scale method)	10	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.10	<0.001	1.26	<0.001	1.38	<0.001
	20	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	5.0	-	5.5	-
		Average growth rate	1.49	0.056	1.57	<0.001	1.72	0.002
	30	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	3.3	-	3.7	-
		Average growth rate	1.62	0.78	1.70	0.003	1.70	<0.001
30 (Small-scale method)	10	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.35	<0.001	1.53	<0.001	1.59	<0.001
	15	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	6.7	-	7.3	-
		Average growth rate	1.40	<0.001	1.65	<0.001	1.70	<0.001
	20	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	5.0	-	5.5	-
		Average growth rate	1.46	0.013	1.72	0.009	1.69	<0.001
20 (Small-scale method)	10	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.26	<0.001	1.47	<0.001	1.57	<0.001
10 (Small-scale method)	10	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.49	0.57	1.48	<0.001	1.60	<0.001

Table 2-4 Results for reduction rate of medium and average growth rate of 10-300 mL flask in test period (Test No.2).

Flask volume (mL)	Medium volume (mL)		Culture time					
			24h	t-test p-value	48h	t-test p-value	72h	t-test p-value
300 (Standard method)	100	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	1.0	-	1.1	-
		Average growth rate	1.99	-	2.01	-	2.03	-
50 (Small-scale method)	10*	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.18	<0.001	1.36	<0.001	1.43	<0.001
	20	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	5.0	-	5.5	-
		Average growth rate	1.76	0.031	1.79	0.017	1.92	0.041
	30	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	3.3	-	3.7	-
		Average growth rate	1.82	0.026	1.94	0.093	1.89	<0.001
30 (Small-scale method)	10*	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.46	0.027	1.67	0.044	1.79	0.159
	15	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	6.7	-	7.3	-
		Average growth rate	1.80	0.038	1.74	<0.001	1.96	0.093
	20	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	5.0	-	5.5	-
		Average growth rate	1.92	0.399	1.96	0.188	1.92	0.002
20 (Small-scale method)	10*	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.77	0.039	1.65	0.004	1.88	0.137
10 (Small-scale method)	10	Reduction rate of medium (%)	0.0	-	10	-	11	-
		Average growth rate	1.80	0.003	1.82	0.001	1.90	0.003

* : Validity of test was not met

を超える」と従来法と比較して生長速度に差が認められることが分かった。さらに、1回目の試験容器の検討結果より各試験容器において、培地の減少率が10%を超えている培地10 mLを添加した場合は、生長速度が1.26~1.53となり、培地を15~30 mL添加した他の試験と比較して低くなった。本研究で使用した細胞測定器(CDA-1000)の測定条件では低濃度(0.5×10^3 cells/mL~ 2.0×10^4 cells/mL程度)の藻類細胞を精度よく測定するために培地採取量は1回の測定につき1 mLとする必要がある。そのため、小スケール法の試験期間内における培地減少率の許容範囲は10%未満とした。

従来法と小スケール法の生長速度の比較より、次項の感受性試験の検討には、試験容器に50 mL フラスコと30 mL フラスコを採用した。また、培地容量については生長速度の良好だった50 mL フラスコに培地20 mLを添加した場合と30 mL フラスコに培地15 mLを添加した場合を試験・条件として採用した。

3. 1. 2 標準物質による感受性試験

感受性試験に用いた標準物質濃度の測定値を Table 3-1及び Table

3-2に示す。容器の違いによる測定値の変動はなかった。

感受性試験結果を Table 4-1及び Table 4-2に示す。重クロム酸カリウムを用いた試験の NOEC について、50 mL フラスコを用いた小スケール法では、従来法と同じ濃度区 (0.160 mg/L) であったが、30 mL フラスコを用いた小スケール法では、1濃度区高い0.320 mg/Lとなった。従来法による重クロム酸カリウムを用いた国内試験機関 (10機関) の感受性試験結果は、 IC_{25} が0.45~1.01 mg/Lである¹²⁾。従来法では標準物質を用いた感受性試験の許容範囲として IC_x の場合に平均 $\pm 2SD$ の範囲にデータが収まることを規定しているため⁸⁾、従来法と小スケール法の比較においても、国内試験機関 (10機関) における結果の平均 $\pm 2SD$ (0.28~1.00 mg/L) を許容範囲とした。従来法と小スケール法である50 mL フラスコを用いた IC_{25} は、それぞれ0.773 mg/Lと0.949 mg/Lであり許容範囲内であった。一方、30 mL フラスコを用いた小スケール化の場合は、1.09 mg/Lとなりわずかに許容範囲外となった。PMSDについて従来法と50 mL及び30 mL フラスコを用いた小スケール法ではそれぞれ

Table 3-1 Analysis results for concentrations of $K_2Cr_2O_7$ in sensitivity test

Nominal conc. (mg/L)	Standard method (300 mL flask)		Small-scale method 1 (50 mL flask)		Small-scale method 2 (30 mL flask)	
	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)
0.0800	0.0806	101	0.0819	102	0.0805	101
0.160	0.160	100	0.162	101	0.159	99
0.320	0.324	101	0.328	103	0.323	101
0.640	0.631	99	0.640	100	0.631	99
1.28	1.31	102	1.33	104	1.31	102
2.56	2.60	102	2.63	103	2.63	103

* : Measured conc./Nominal conc.×100

Table 3-2 Analysis results for concentrations of 3,5-DCP in sensitivity test

Nominal conc. (mg/L)	Standard method (300 mL flask)		Small-scale method 1 (50 mL flask)		Small-scale method 2 (30 mL flask)	
	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)	Measured conc. (mg/L)	Accuracy* (%)
0.640	0.518	81	0.566	88	0.540	84
1.02	0.831	81	0.870	85	0.890	87
1.64	1.33	81	1.31	80	1.28	78
2.62	2.72	104	2.26	86	2.16	82
4.19	4.06	97	3.78	90	3.51	84

* : Measured conc./Nominal conc.×100

Table 4-1 NOEC and ICx of sensitivity test of $K_2Cr_2O_7$

	Standard method (300 mL flask)	Small-scale method 1 (50 mL flask)	Small-scale method 2 (30 mL flask)
NOEC (mg/L)	0.160	0.160	0.320
IC ₅ (mg/L)	0.383	0.481	0.624
(95% confidence limit)	(0.297-0.469)	(0.384-0.579)	(0.512-0.736)
IC ₂₅ (mg/L)	0.773	0.949	1.09
(95% confidence limit)	(0.783-0.978)	(0.854-1.04)	(0.997-1.18)
IC ₅₀ (mg/L)	1.44	1.42	1.52
(95% confidence limit)	(1.34-1.54)	(1.33-1.50)	(1.43-1.61)
PMSD (%)	5.7	3.2	7.3
Control growth rate (0-72h)	2.05	1.89	1.90
CV of 72h growth rate in control	4.1	2.0	4.8
Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control	10	13	11

Table 4-2 NOEC and ICx of sensitivity test of 3,5-DCP

	Standard method (300 mL flask)	Small-scale method 1 (50 mL flask)	Small-scale method 2 (30 mL flask)
NOEC (mg/L)	1.02	0.64	1.02
IC ₅ (mg/L)	1.09	1.18	1.09
(95% confidence limit)	(0.973-1.20)	(0.944-1.41)	(0.950-1.24)
IC ₂₅ (mg/L)	1.68	1.69	1.64
(95% confidence limit)	(1.58-1.78)	(1.52-1.86)	(1.53-1.75)
IC ₅₀ (mg/L)	2.18	2.09	2.09
(95% confidence limit)	(2.09-2.26)	(1.98-2.21)	(2.00-2.17)
PMSD (%)	4.4	6.2	7.0
Control growth rate (0-72h)	2.13	1.77	2.19
CV of 72h growth rate in control	2.1	4.9	2.2
Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control	11	31	3.4

5.7%, 3.2%, 7.3%となった。US EPA では PMSD の10%を感受性
の下限值とし、90%点を上限値として扱っており、PMSD の上限
を超えたデータについては再試験を推奨している^{12, 24)}。この考えを
基に国内試験機関（10機関）の PMSD ¹²⁾の90%点を算出すると6%
となるため30 mL フラスコを用いた試験は検出力が不十分と考えら
れる。対照区の生長速度の変動係数は、従来法と50 mL 及び30 mL
フラスコを用いた小スケール法ではそれぞれ4.1%, 2.0%, 4.8%と
なり、国内試験機関（10機関）の範囲¹²⁾とはほぼ一致しており、試験
内精度は問題ないと判断した。

3,5-ジクロロフェノールの NOEC について、50 mL フラスコを用
いた小スケール法では、従来法より1濃度区低い0.64 mg/L であり、
30 mL フラスコを用いた小スケール法では、従来法と同じ濃度区
(1.02 mg/L) となった。また、ICx については、標準物質を用いた
国際リングテスト（ISO, 2012）²⁵⁾の結果より許容範囲を従来法の
0.5~1.5倍として評価したところ、50 mL フラスコ及び30 mL フラ
スコで許容範囲内となった。

感受性試験の結果より、これ以降の検討は従来法の結果に近い傾
向を示した50 mL フラスコに培地20 mL を添加した場合を小スケ
ール法の試験・条件とした。

3. 2 小スケール法を用いた事業場排水測定

3. 2. 1 事業場排水測定における小スケール法の有効性

事業場 AA 及び AB の排水試料を対象とした従来法と小スケール
法の試験結果を Table 5に、濃度反応曲線を Fig. 1と Fig. 2に示す。
小スケール法の NOEC および ICx について従来法と比較して同程
度であった（許容範囲：NOEC ± 1 濃度区、ICx は0.5~1.5倍）。

今回の検討において AA 及び AB の排水試料で小スケール法の
PMSD は国内試験機関（10機関）の90%点である5%を超えてい
たものの、NOEC や濃度反応曲線が従来法と小スケール法ではほ
同程度であり、小スケール法の実験試料への適用は可能であると考
えた。

3. 2. 2 小スケール法による事業場排水の調査結果

Table 6に排水水質の結果を示す。調査した項目全てにおいて排
水基準値以内であった。Table 7に各事業場排水の NOEC 及び TU
と ICx, PMSD, 対照区の平均生長速度の結果を示す。生長阻害が

確認されなかった試料の NOEC は、最大試験濃度区である80%と
して TU を計算した。なお、原因は不明であるが対照区の毎日の生
長速度の変動係数が35%を超えていた試験があったため、その排水
試料の結果は参考値とし、これ以降の議論に採用しなかった（排水
P 及び Q）。

排水試料 A, B, S, X の PMSD について国内試験機関（10機関）
の90%点である5%を超えており、検出力が低い排水試料が存在し
た。生長阻害影響がない（NOEC が80%）と判断された排水試料 A
の PMSD は5.8%であり、同様に生長阻害が確認されない排水試料
K の1.3%と大きく異なる値となった。しかし、80%濃度区におけ
る生長阻害率を比較すると、排水試料 A と P ではそれぞれ-10%
および-21%（対照区よりも細胞数が増加）のため生長阻害影響に
おける偽陰性の可能性は低く、NOEC が80%とみなせると考えら
れる。

調査した25の排水試料の中で8つが最低濃度区（20%濃度区）で
も対照区と比較して生長速度の有意な低下が認められ、試験区を3
濃度区（20%, 40%, 80%）としても藻類生長阻害の有無を把握す
ることができた。環境省の検討では TU の基準値について示されて
いないが、排水基準の設定の考え方を踏まえて、公共用水域におい
て排水が10倍程度に希釈されると想定される²⁶⁾ことに基づき、TU
が10を超える場合に改善の必要があると評価する考え方がある¹⁴⁾。
そのため、この考えに基づき TU が10を超える排水を評価する場合
には、4濃度区（10%, 20%, 40%, 80%）での実施が望ましいと
考える。今回の調査で影響が確認された排水の業種としては化学工
業、医療業、電気機械器具製造業、電子部品・デバイス・電子回路
製造業、金属製品製造業、窯業・土石製品製造業であったが、化学
工業及び医療業、金属製品製造業は影響の確認されない排水試料
もあった。今回調査した排水水質と TU について相関解析（TU が
5を上回るものは5とみなして解析）したところ EC と T-N の相
関係数がそれぞれ0.3155, 0.3598となり、弱い正の相関が確認され
た。しかし、T-N が20 mg/L 検出されている排水試料 V や EC が11
mS/cm と高い値であった排水試料 C は藻類生長阻害が確認されて
いないため、藻類生長阻害の原因について従来の生活環境項目に係
る排水基準のみで解釈するのは難しいと考えられる。今後、化学分
析による藻類生長阻害の原因について把握する場合は、重金属類の

Table 5 NOEC, ICx and TU and PMSD of the effluent of factory AA and AB

Factory name	AA		AB	
	Standard method (300 mL flask)	Small-scale method (50 mL flask)	Standard method (300 mL flask)	Small-scale method (50 mL flask)
	(%)	(%)	(%)	(%)
NOEC	5	5	1.25	1.25
IC ₅	9	12	1.0	1.4
(95% confidence limit)	(6.2-11)	(7.3-17)	(0.6-1.4)	(1.0-1.8)
IC ₂₅	26	28	3.8	3.0
(95% confidence limit)	(22-29)	(22-33)	(3.0-4.5)	(2.6-3.5)
IC ₅₀	50	46	8.1	4.8
(95% confidence limit)	(46-54)	(40-50)	(6.9-9.2)	(4.4-5.3)
TU*	20	20	80	80
PMSD (%)	4.5	8.4	5.1	8.4
Control growth rate (0-72h)	1.76	1.72	1.78	1.72
CV of 72h growth rate in control	1.2	3.0	2.3	2.9
Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control	20	22	15	30

*: Toxic Unit = 100/NOEC

Fig. 1 Dose-response curve for the effluent of factory AA

Fig. 2 Dose-response curve for the effluent of factory AB

測定及び有機汚染物質のターゲットスクリーニングやノンターゲット分析を組み合わせる必要があると考えられる。

結 論

生物応答を用いた排水管理手法に用いる生物試験のうち藻類生長阻害試験の小スケール法を開発し、その有効性を評価した。小スケール法の容器容量や培地容量の検討にあたり従来法との生長速度の比較試験や重クロム酸カリウムと3,5-ジクロロフェノールを用いた感受性試験を実施した。その結果、50 mL フラスコに培地を20 mL 添加した条件が良好な結果であった。次に事業場排水を用いた試験を

実施し、従来法と比較して PMSD は高いが NOEC 及び IC_x の差は許容範囲内であり、50 mL フラスコに培地を20 mL 添加した試験・条件を小スケール法と決定した。開発した方法を用いて試験区を3濃度区(20%, 40%, 80%)と設定して25の排水試料を調査したところ、TU が5を超える排水試料が8つ確認された。このことから、小スケール法により藻類生長阻害の有無を3濃度区設定において把握することができた。また、本研究で検討した小スケール法は、培地量が100 mL から20 mL と5分の1となり、本研究で使用した培養装置で一度に測定できる検体量が2検体から11検体と約5倍に増やすことが出来た。

さらに、小スケール法は改善を必要とする排水に対する毒性削減

Table 6 Water quality of factory wastewater

Factory name	Water quality					
	pH	EC (mS/cm)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)
A	7.8	4.6	<0.5	9.2	4.1	0.77
B	7.3	0.62	3.9	4.1	4.4	0.39
C	8.0	11	1.9	6.9	3.4	6.7
D	8.0	10	0.8	9.4	1.9	4.2
E	7.8	0.39	0.7	4.8	15	1.6
F	7.0	7.5	0.8	11	10	0.74
G	7.2	0.5	1.0	6.9	1.2	0.89
H	8.0	0.57	0.7	6.1	1.9	0.10
I	8.1	12	0.6	8.0	15	6.2
J	6.4	3.4	<0.5	5.8	30	2.1
K	7.6	0.54	0.8	3.0	1.7	0.62
L	7.2	0.11	0.5	3.8	1.0	0.090
M	8.0	0.48	0.8	4.7	0.27	0.084
N	8.3	1.3	1.3	7.8	23	0.51
O	7.7	0.31	<0.5	3.6	0.73	6.3
P	7.5	0.36	12	14	0.94	2.1
Q	7.5	0.97	1.0	3.6	0.83	0.044
R	7.4	0.27	<0.5	2.3	2.2	0.026
S	8.2	10	0.6	2.8	54	0.21
T	7.3	0.49	0.5	8.9	11	0.93
U	7.3	24	0.5	5.1	2.0	0.018
V	6.8	0.53	1.8	23	20	0.86
W	7.5	4.2	<0.5	7.2	2.9	0.082
X	7.2	0.051	4.5	5.2	1.0	0.018
Y	7.6	0.095	1.4	1.6	0.5	0.058

評価 (TRE) への応用も期待できる。米国の TRE は、多段階に実施手順が分かれており、排水処理方法や使用化学物質の評価・見直しなどを事業所内で実施し、その効果を確認していく。事業所内の取組で影響が低減されず、原因物質が不明な場合は、毒性原因を特定するために毒性同定評価 (TIE) を実施する²⁷⁾。TIE では実験室レベルで排水に複数の物理化学的な前処理を行った後に生物応答試験を実施することで、毒性原因物質の特徴を明らかにする。小スケール法によって複数試料を同時に試験することが出来れば、TIE を効率よく実施できる。そして、迅速な毒性原因の推定により、全排水毒性試験の費用削減につながっていくことが期待される。

要 約

2009年より環境省において生物応答を用いた排水試験が技術面と制度面で検討されているが、その導入について高額な試験コストが指摘されており、簡易測定手法の開発が求められている。そこで本研究では、生物応答を用いた排水管理手法に用いる生物試験のうち藻類生長阻害試験を小スケール化した小スケール法の検討を行った。その結果、従来法である生物応答を用いた排水試験法 (案) に示された方法 (従来法) と比較して、ガラス製50 mL 三角フラスコに OECD 培地20 mL 添加した場合に生長速度が良好であり、重クロム酸カリウムと3,5-ジクロロフェノールを用いた感受性試験においても NOEC 及び IC_x について許容範囲であった。さらに排水試料を用いて小スケール法の有効性を確認したところ、従来法と比較して検出力はやや劣るが、NOEC や IC_x の差は許容範囲内であった。よって、ガラス製50 mL 三角フラスコに OECD 培地を20 mL 添加した試験・条件を小スケール法と決定した。開発した小スケール法を用いて25の排水試料を調査したところ、8つの排水試料において

Table 7 NOEC, IC_x and TU and PMSD of wastewater of factory A-Y

Factory name	NOEC (%)	IC ₅ (%)	IC ₂₅ (%)	IC ₅₀ (%)	TU* (%)	PMSD (%)	Control growth rate (0-72h)	Average growth rate C.V. (%)	
								CV of 72h growth rate in control	Mean CV for section-by-section (24h) specific growth rate in control
A	80	-	-	-	1.25	5.8	1.83	3.4	1.6
B	<20	7.7	17	28	>5	5.9	1.83	3.4	1.6
C	80	-	-	-	1.25	4.3	1.83	3.4	1.6
D	80	-	-	-	1.25	4.7	1.83	3.4	1.6
E	<20	18	44	75	>5	2.6	1.75	1.7	11
F	<20	6.4	13	21	>5	4.7	1.71	0.62	32
G	80	-	-	-	1.25	1.4	1.71	0.62	32
H	80	-	-	-	1.25	1.4	1.71	0.62	32
I	20	20	54	>80	5	2.2	1.71	0.62	32
J	80	-	-	-	1.25	1.9	1.71	0.62	32
K	80	-	-	-	1.25	1.3	1.71	0.62	32
L	80	-	-	-	1.25	1.9	1.81	0.99	24
M	80	-	-	-	1.25	1.5	1.81	0.99	24
N	<20	1.2	10	36	>5	2.3	1.81	0.99	24
O	80	-	-	-	1.25	1.6	1.81	0.99	24
P**	80	-	-	-	1.25	6.5	1.53	3.1	52
Q**	80	-	-	-	1.25	4.4	1.53	3.1	52
R	<20	11	22	31	>5	4.8	1.68	3.4	34
S	<20	7.7	10	12	>5	5.4	1.68	3.4	34
T	40	63	>80	>80	2.5	4.4	1.68	3.4	34
U	<20	15	29	43	>5	3.7	1.68	3.4	34
V	80	-	-	-	1.25	3.8	1.68	3.4	34
W	80	-	-	-	1.25	1.5	1.77	0.98	21
X	<20	1.1	5	10	>5	9.3	1.77	0.98	21
Y	80	-	-	-	1.25	1.6	1.77	0.98	21

*: Toxic Unit = 100/NOEC

** : Validity of test was not met

最低濃度区（20%濃度区）でも対照区と比較して生長速度の有意な低下が認められ、藻類生長阻害の有無を把握することができた。以上の結果から、今回開発した小スケール法は藻類生長阻害の傾向を把握するための小スケール化試験として有効であることが示された。また、本法は複数試料を同時に試験することが出来るため、毒性原因を特定するための毒性同定評価（TIE）を効率よく実施することができると考えられる。

文 献

- 1) 渡部春奈, 鑑迫典久: 第1編 第6章 排水管理におけるバイオアッセイ利用に関する国際的傾向, 123-151, 生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向, 鑑迫典久監修, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2014)
- 2) Komjarova, I. and Blust, R.: Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment, *Aquatic Toxicology*, **90**, 138-144 (2008)
- 3) 八木 聡, 川上北斗, 藤原拓真, 石川奈緒, 伊藤 歩, 笹本 誠, 海田輝之: 緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* への抗菌性物質の単独および複合毒性, 水環境学会誌, **39**, 63-70 (2016)
- 4) 大曲 遼, 竹内彩乃, 勝又政和, 中村 勝, 有蘭幸司, 石橋康弘: 緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) の遅延発光による重金属類の毒性評価, 環境と安全, **8**, 1-8 (2017)
- 5) Lari, E., Gauthier, P., Mohaddes, E., and Pyle, G.G.: Interactive toxicity of Ni, Zn, Cu, and Cd on *Daphnia magna* at lethal and sub-lethal concentrations, *Journal of Hazardous Materials*, **334**, 21-28 (2017)
- 6) 楠井隆史, 第2編日本の現状 第1章 生物応答を用いた排水管理の最新動向, 156, 生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向, 鑑迫典久監修, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2014)
- 7) 楠井隆史, 第2編日本の現状 第1章 生物応答を用いた排水管理の最新動向, 155, 生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向, 鑑迫典久監修, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2014)
- 8) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会: 生物応答を用いた排水試験法（検討案）, 2013
- 9) 山本裕史, 池幡佳織, 安田侑右, 田村生弥, 鑑迫典久: 徳島県内の事業所排水を対象にした TIE の事例, 環境化学, **25**, 11-17 (2015)
- 10) 富川恵子, 入江俊行, 内田弘美, 渡部春奈, 鑑迫典久: WET法を活用した工場排水管理: 化学工業における排水改善の取り組み, 環境化学, **25**, 27-33 (2015)
- 11) 藤原尚美, 野中信一, 豊久志朗, 鑑迫典久: 金属製品製造工場の WET を用いた排水中毒性要因の推定とその改善例, 環境化学, **25**, 35-42 (2015)
- 12) 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: 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, 環境化学, **25**, 43-53 (2015)
- 13) 板津靖之, 高野智弘, 金 俊, 福富真実子, 楠井隆史: 事業所排水の生態毒性学的評価: 毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響, 環境化学, **25**, 19-26 (2015)
- 14) 環境省: 生物応答を利用した排水管理手法の活用について, <http://www.env.go.jp/press/files/jp/28556.pdf>, 2017年11月9日現在
- 15) 一般社団法人日本経済団体連合会: 生物応答を利用した排水管理手法（WET 手法）の活用の再考を求める, http://www.keidanren.or.jp/policy/2016/007_honbun.pdf, 2017年11月14日現在
- 16) 環境省: 「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」に関する意見募集結果の概要, http://www.env.go.jp/press/seibutsu_conf06/ref02.pdf, 2018年2月14日現在
- 17) 古閑豊和, 柏原 学, 志水信弘, 石橋融子: 生物応答を利用した排水水質評価手法の導入に向けた精度管理（比較）について, 福岡県保健環境研究所年報第44号, 133-136 (2017)
- 18) 揖斐敏夫: 65.25クロム（VI）ICP 質量分析法, 1204-1205, 「JIS ハンドブック2017 環境測定Ⅱ水質」, 一般財団法人日本規格協会, 東京 (2017)
- 19) 揖斐敏夫: JISK 0102 2016工場排水試験方法, 950-1117, 「JIS ハンドブック2017 環境測定Ⅱ水質」, 一般財団法人日本規格協会, 東京 (2017)
- 20) R Core Team: R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org/> (2015)
- 21) 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, 269-275 (2002).
- 22) US EPA: Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System program, EPA 833-R-00-003, 7.1-7.2 (2000)
- 23) 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検討と下水試料への適用, 水環境学会誌, **20**, 768-775 (1997).
- 24) US EPA: Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System program, EPA 833-R-00-003, 6.6 (2000)
- 25) ISO: "Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae", ISO8692 (2012)
- 26) 環境庁水質保全局: 第2章 排水水の排出の規制等, 153, 逐条解説 水質汚濁防止法, 中央法規出版, 東京 (1996)
- 27) 環境省: 生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会（第3回）参考資料1, <http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf/03/ref01.pdf>, 2018年11月13日現在