単細胞緑藻ドナリエラの鞭毛再生による沿岸域海水の バイオアッセイの可能性

堀家直哉* 西川 淳* 田中仁志** 中村省吾*

Usefulness of Flagellar Regeneration in *Dunaliella* sp. as an Endpoint for the Bioassay of Seawater Pollution

Nobuya HORIKE*, Atsushi NISHIKAWA*, Hitoshi TANAKA** and Shogo NAKAMURA*

*Department of Environmental Biology and Chemistry, Faculty of Science, Toyama University, Toyama 930-8555, Japan

**Center for Environmental Science in Saitama, 914 Kami-tanadare, Kisai, Kita-saitama, Saitama 347-0115, Japan

Abstract

Since most environmental pollutants are thought to finally accumulate in the ocean, it is important to develop a quick and convenient assay system for seawater pollution. In this study, we tested the possibility of using flagellar regeneration in a marine unicellular organism, *Dunaliella* sp., as an endpoint of bioassay. *Dunaliella* sp. has two flagella of equal length and swims by beating its flagella. When the flagella are amputated by mechanical treatment, they rapidly regenerate to their original lengths in 6-8 hr. We examined the effects of five pollutants {Cu²⁺, Cd²⁺, linear alkyl benzene sulfonate (LAS), 4-nonylphenol (NP), and bisphenol A (BPA)} on flagellar regeneration. Each chemical exhibited a characteristic inhibition pattern, with the inhibitory effect being stronger in the order of NP>Cu²⁺>LAS>BPA>Cd²⁺. The EC50 value of Cu²⁺ was 4-8 times lower than the effluent standard value in Japan. Flagellar regeneration occurred normally in 20-100% artificial seawater, showing that this endpoint can be used even in brackish water. We therefore collected coastal seawater samples in Toyama Bay and examined their effects on flagellar regeneration. Results showed that the seawater samples collected from some fishing ports and a coastal area inhibited flagellar regeneration, and flagella regrew only to 77-87% of the control length. Thus, the flagellar regeneration assay using *Dunaliella* sp. appears sensitive and can be a useful method for assessing seawater pollution.

Key words: bioassay, *Dunaliella*, flagellar regeneration, coastal seawater

1. はじめに

われわれ人類によって、これまでに1,800万種を超える化学物質が作り出されている¹⁾。これらの化学物質のうち、日常的に使用されているものは約6万種といわれており²⁾、使用中・使用後に非意図的にそれらが環境水中に放出される可能性も高い。このようにして起こる環境水の汚染をモニタリングする場合、従来は個別汚染物質の同定と、化学的分析によるその汚染物質の濃度の測定が主な手段であった。しかし、このような方法では、前もって測定する物質を想定して実

施するため、それ以外の汚染物質は検出できない。また、検出されたとしても、その濃度が生物にどのような影響を及ぼすのかについては、未知な部分が多い。このような点から、近年、生物を利用して包括的に環境水の汚染物質を検出するバイオアッセイが、モニタリングの手法として注目されつつある³⁾。

ところで、環境中に放出された汚染物質の最終的な集積場所は、主に海洋になると考えられる。また、沿岸域には、工場や浄化施設が設置されている地域もあり、その排水が直接河口や海に流入する可能性も高い。したがって、海水の汚染を検出するためのバイオアッ

*富山大学理学部生物圏環境科学科 〒930-8555 富山市五福3190

**埼玉県環境科学国際センター 〒347-0115 埼玉県北埼玉郡騎西町上種足914

セイが注目されつつある。そして既に、海水汚染のバイオアッセイとして、単細胞藻類、原生動物、棘皮動物、甲殻類、魚類などの生物種が用いられているが、その指標は主に、致死や、増殖・発生阻害で、アッセイに時間を要するものが多い²⁾。また、アッセイした結果からリスクを判断する「リスク評価」を行うためには、様々な汚染物質に対して感受性の異なる複数の生物種の毒性指標でアッセイする必要があると考えられている^{3),4)}。そのためにも、これまで報告されていない、新たな生物種の新たな毒性指標によるアッセイ方法の開発も望まれている。以上の観点から、本研究では、海洋性単細胞緑藻のドナリエラを用いて、その鞭毛再生が、海水汚染のバイオアッセイの指標として有用かどうかを調べた。我々は、既に、単細胞緑藻クラミドモナスの鞭毛再生が、淡水の汚染を検出するための毒性評価として有用であることを報告している⁵⁾が、我々が用いたクラミドモナスは海水中では生存できない。そのため、新たにドナリエラを用いて、海水汚染の毒性指標に有用かどうかを調べた。その結果、汚染物質によっては感度の高いアッセイが出来ること、また、海洋から汽水域まで、海水（塩分）濃度を調節することなくアッセイできる有用な指標となりうる可能性が示された。

2. 実験方法

2.1 ドナリエラの培養

実験には、長崎大学水産学部の萩原博士より分譲していただいた、海洋性単細胞緑藻のドナリエラ (*Dunaliella* sp.; 緑藻綱, ドナリエラ目) を用いた。このドナリエラを、位相差顕微鏡で観察したところ、長径約10 μ m、短径約6 μ mの楕円形をした細胞体を持ち、その先端に長さ約10 μ mの2本の鞭毛を持っていた。培養は、autotrophic medium (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM K₂HPO₄, 7.4 mM MgCl₂·6H₂O, 2.0 mM MgSO₄·7H₂O, 2.7 mM KCl, 9.9 mM KNO₃, 1.4 mM CaCl₂·2H₂O, 5.1 μ M EDTANa₂, 9.0 μ M FeCl₃·6H₂O, 9.9 μ M H₃BO₃, 2.1 μ M MnCl₃·4H₂O, 0.3 μ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.3 μ M ZnCl₂, 63 nM CoCl₂·6H₂O, 0.2 μ M CuCl₂·2H₂O, 0.2 μ M VOCl₃, 0.5 mM NaHCO₃, 0.5 M NaCl) を使用し⁶⁾、白色蛍光灯下 (約4,800 lx) で試験管による前培養をした後、更に300 mlフラスコで通気培養した。細胞密度は、細胞数を、位相差顕微鏡 (Olympus CX 40) と血球計算盤を用いて計測した値から求めた。

2.2 鞭毛の切断と長さの測定

前記のように培養し、対数増殖期 (1~2×10⁶ cells·mL⁻¹) に達した培養液を20 mLとり、遠心 (980 xg, 3分間) で細胞を集めた。これに、新しい培地を20 mL加えて縣濁させた後、10,000rpmで3分間、ホモジナイザー (日本精機AM-1) にかけて鞭毛を切断した。この処理によって、約95~100%の細胞で鞭毛が切断された。その後、それぞれを50 mLの三角フラスコに入れ、白色蛍光灯下で、シェーカー (TAITEC, NR-3) を用いて振とう培養した。そして、2時間毎にその一部を取り出し、再生してきた鞭毛の長さを、位相差顕微鏡 (Olympus CX 40) と接眼マイクロメーターを用いて測定した。なお、

測定は30個体について行ない、その平均値をその時間での再生した鞭毛の長さとした。

2.3 試薬

鞭毛再生阻害実験には、CuCl₂·2H₂O (和光純薬, 特級), CdCl₂·2.5H₂O (和光純薬, 特級), 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS; 和光純薬, AB S測定用), 4-ノニルフェノール (NP; 東京化成工業), ビスフェノールA (BPA; 東京化成工業) を用い、NPはエタノール (99.5%; 和光純薬, 特級) に、それ以外は蒸留水に溶解させた。上記の薬品類は、原則として濃度10 mMのストック溶液をつくり、実験の都度、所定の濃度になるように希釈した。

また、光学顕微鏡で観察・測定するための細胞の固定には、市販の20% グルタルアルデヒド (和光純薬, 電子顕微鏡用) を人工海水で10倍に希釈した2%溶液を用い、サンプル100 μ lに対し20 μ lの比率で添加した。実験に用いた人工海水は、マリンアート・スーパーフォーミュラー (千寿製薬) を蒸留水に溶解させて使用した。

3. 結果と考察

3.1 ドナリエラの増殖曲線

用いた培地中における、ドナリエラの細胞増殖能を調べた。約8×10⁴ cells·mL⁻¹で増殖を開始させたところ、約168時間でプラトーに達し、その際の細胞密度は約1.5×10⁷ cells·mL⁻¹であった。また、対数増殖期の倍加時間は約18時間となった。そして、以下の実験には対数増殖期中期 (1~2×10⁶ cells·mL⁻¹) の細胞を用いることにした。

3.2 ドナリエラの鞭毛再生

最初に、クラミドモナスと同様に、ホモジナイザーを用いて17,000rpmで3分間かけて⁸⁾鞭毛を切断したところ、ドナリエラでは、2時間後に、約31%の細胞でしか鞭毛の再生が見られなかった。このように、クラミドモナスとの差異が見られたのは、ドナリエラには細胞壁がほとんど無く、ホモジナイザー処理による障害を受けやすいためではないかと考えられた。

Fig. 1 Flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. Initial average length: 10 ± 1.1 μ m. Bars, standard deviations.

そこで、100%近くのドナリエラが鞭毛を再生する条件を調べたところ、ホモジナイザーの回転速度を10,000 rpmに落として、3分間かけるのが最適であることが判った。そして、この条件で鞭毛を切断すると、2時間後で切断前の長さの約45%まで、4時間後では約90%まで再生し、8時間後ではほぼ元の長さまで再生した (Fig. 1)。

3.3 鞭毛再生に及ぼす Cu^{2+} 、 Cd^{2+} の影響

環境水を汚染する物質の代表例として、まず、重金属の Cu^{2+} と Cd^{2+} の鞭毛再生に及ぼす影響を調べた。 Cu^{2+} では、 $5 \mu\text{M}$ 以上から影響が出始めた (Fig. 2)。この $5 \mu\text{M}$ Cu^{2+} では、コントロールと比較して速度は少し遅いものの、鞭毛は切断後6時間にわたって再生を続け、コントロールの約87%の長さまで再生した。

しかし、その後、それまで再生していた鞭毛が短縮し始め、8時間後には、コントロールの長さの約55%まで、10時間後には、約24%まで短縮した。さらに、 Cu^{2+} の濃度が高まるにつれ、再生する長さも短くなり、再生から短縮へ転換する時間も少しずつ早くなった。そして、 $20 \mu\text{M}$ 以上では鞭毛の再生が大きく阻害され、 $30 \mu\text{M}$ では、鞭毛の再生が殆ど見られなくなった。

一方、 Cd^{2+} では、 $100 \mu\text{M}$ から鞭毛の再生速度が遅くなりはじめ、切断後10時間でもコントロールの長さの約83%までしか再生せず、 $500 \mu\text{M}$ のそれでは、約56%と大きく減少した (Fig. 3)。さらに、 1.5 mM では、切断後4時間で、切断前の長さの約35%まで再生したものの、それ以後は短縮し始め、8時間後には再生した鞭毛はほとんど見られなくなった。このように、 Cd^{2+} では Cu^{2+} に比べてかなり高い濃度で影響が見られた。これまでも、他の重金属に比べ、 Cd^{2+} の作用は試料水の硬度の影響を受けやすいことが報告されている^{5),9)}。したがって、硬度が高い海水とほぼ同じ組成の培地中

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; ■, $5 \mu\text{M}$; ▲, $20 \mu\text{M}$; ×, $30 \mu\text{M}$ Cu^{2+} . Initial average length: $9.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$. Bars, standard deviations. a*, $p < 0.01$; b*, $p < 0.01$ compared with control and $5 \mu\text{M}$ Cu^{2+} respectively on 8-h.

Fig. 3 Effect of Cd^{2+} on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; ■, $100 \mu\text{M}$; ▲, $500 \mu\text{M}$; ×, 1.5 mM Cd^{2+} . Initial average length: $9.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$. Bars, standard deviations. a*, $p < 0.05$; b*, $p < 0.01$ compared with control and $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} respectively on 8-h.

では、その影響が出る濃度も他の重金属に比べて高くなるものと思われた。

ところで、クラミドモナスでは、鞭毛の長さは構成蛋白質 (主にtubulin)の重合と脱重合の速度に依存していると言われている¹⁰⁾。そして、ドナリエラの鞭毛に関しても、同様な機構で長さが調節されているものと思われる。したがって、 Cu^{2+} や Cd^{2+} によって、一旦伸張しかけていた鞭毛が短縮するのは、重合機構が阻害され平衡が脱重合に傾いたためではないかと考えられ、この現象を解明することで、未だ不明な鞭毛の形成機構を明らかにする手がかりが得られる可能性があるものと思われた。

3.4 鞭毛再生に及ぼすLAS, NP, BPAの影響

LASでは、 $10 \mu\text{M}$ から鞭毛の再生速度が遅くなるという影響が出始め (Fig. 4)、4時間後に再生した鞭毛の長さは、コントロールの約64%、そして、10時間後のそれは、コントロールの約89%となった。同様に、 $20 \mu\text{M}$ では、切断後10時間の再生長は、コントロールの約67%となった。さらに、 $40 \mu\text{M}$ では、切断後6時間までは鞭毛の再生がまったく見られなかったが、6時間後より再生を開始し、8時間後でコントロールの約7%、10時間後で約16%まで再生したが、その後それ以上伸張しなかった。そして、 $60 \mu\text{M}$ 以上のLAS存在下では、鞭毛の再生はまったく見られなかった。

NPに関しては、 $1 \mu\text{M}$ までは、鞭毛再生への影響はほとんど見られず、再生のパターンはコントロールとほぼ同じであった (Fig. 5)。しかし、 $2 \mu\text{M}$ になると鞭毛の再生は急激に阻害され、切断後10時間でも、コントロールの約39%までしか再生しなかった。そして、 $3 \mu\text{M}$ 以上では、鞭毛はほとんど再生しなかった。

Fig. 4 Effect of LAS on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; ■, 10 μ M; ▲, 20 μ M; ◆, 40 μ M; ×, 60 μ M LAS. Initial average length: 10.5 ± 1.2 μ m. Bars, standard deviations. a*, $p < 0.01$; b*, $p < 0.01$ compared with control and 10 μ M LAS respectively on 8-h.

Fig. 5 Effect of NP on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; □, 1 μ M; ▲, 2 μ M; ×, 3 μ M NP. Initial average length: 9 ± 1.1 μ m. Bars, standard deviations. a*, $p < 0.01$; b*, $p < 0.01$ compared with control and 2 μ M NP respectively on 8-h.

一方、BPA では、50 μ M、100 μ M と濃度が上昇するにつれ、再生してプラトーに達した鞭毛の長さも短くなった。そして、150 μ M になると、急に影響が強まって鞭毛の再生が大きく抑えられ、再生した鞭毛の平均長はコントロールのわずかに約10%となった (Fig. 6)。

これら鞭毛再生の障害パターン及びNP>LAS>BPAという障害の強さは、針木ら⁹⁾が報告したクラミドモナスでのそれらと非常によく似ていた。また、BPAより

Fig. 6 Effect of BPA on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; ■, 50 μ M; ▲, 100 μ M; ×, 150 μ M BPA. Initial average length: 9.1 ± 1.5 μ m. Bars, standard deviations. a*, $p < 0.05$; b*, $p < 0.01$ compared with control and 50 μ M BPA respectively on 8-h.

もオクタノール/水分配係数が大きいNPの方の阻害作用が強かったことは、それに依存した、細胞膜あるいはそれを通しての細胞内への浸透の強さに関連している可能性も考えられた。

ところで、 Cd^{2+} 、LASに暴露したものでは、その濃度によって、再生した鞭毛の長さに各平均値を中心にした大きなばらつきが見られた。したがって、平均値は明らかに異なるものの、大きな標準偏差値を持つ結果になった。このような再生長のばらつきの原因は不明であるが、まだ未解明な鞭毛の再生機構を調べる上からも、興味を持たれる現象であると思われる。

3.5 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、LAS、NP、BPAの鞭毛再生に及ぼす50%影響濃度

以上の5種類の重金属及び各種化学物質について、50%影響濃度 (EC₅₀) を、鞭毛切断後、2時間、4時間そして8時間について求めた (Table 1)。これによると、重金属は、時間の経過とともに、そのEC₅₀が低下する傾向がみられた。これは、前述のように、一旦再生しかけた鞭毛が途中で短縮することによると思われる。一方、界面活性剤のLASや、内分泌攪乱化学物質とされているNPやBPAでは、時間の経過とは関係なく、そのEC₅₀はあまり変化しなかった。

Cu^{2+} については、そのEC₅₀が、我が国の排水基準値を十分に検出できる感度であることが判明した。しかし、 Cd^{2+} のそれは排水基準値よりも高く、検出するためには、クラミドモナスで行われているような高感受性変異株の作製が必要だと思われる。また、LAS、NP、BPAに関してはまだ明確な規制値はないが、全国の河川から化学的な方法で検出された値¹⁰⁾よりも高い。したがって、これらの物質に関しても、より感度の高い変異株の作製が望まれる。ところで、環境水中の汚染物質を迅速・簡便に測定する方法としてMicrotoxが広

Table 1 Effective concentrations of heavy metal ions and chemicals on flagellar regeneration in *Dunaliella* sp.

	Cu ²⁺	Cd ²⁺	LAS	NP	BPA (μM)
2h-EC50	13.6	472	13.4	1.78	103
4h-EC50	11.6	417	13.8	1.73	103
8h-EC50	5.6	378	19.5	1.84	104
Effluent standard	46.8	0.9			

範に用いられている。そのCu²⁺に関する感度(30min-EC50)は、報告者によってばらつきはあるものの、2.0 μM~59.8 μMとされている¹²⁾。今回、我々がドナリエラで得たEC50もそれに匹敵する感度を持っていた。また、リスク評価を確立する上から、様々な生物種の様々な生命現象をエンドポイントとした評価方法の開発が望まれているが、ドナリエラの鞭毛再生をエンドポイントとすれば、蛋白質合成とその重合という、これまでにない新たな生命現象への影響を評価できるものと思われた。

3.6 富山湾沿岸域海水の影響

海洋におけるバイオアッセイでは、海水の濃度(塩分、硬度など)が指標となる生物の生命現象に影響を与えることが多い。したがって、塩分濃度が低い河口域の海水では、直接バイオアッセイできないことがしばしばあり、塩分濃度の調整操作が必要となる。そこで、塩分濃度が比較的低い沿岸海域でも、鞭毛再生がコントロールと同じように起こるかどうかを、人工海水を用いて、その濃度を0~100%に変化させて調べた。その結果、人工海水濃度が10~20%以上であれば、コントロールと同じ再生パターンを示した(Fig. 7)。しかし、人工海水濃度が5%になると、鞭毛の再生はまったく見られなかった。これまでに報告され使用されている、Microtoxやウニの初期発生を用いた評価方法では、汽水は塩分調整する必要があった。しかし、今回の結果から、ドナリエラの鞭毛再生を指標に用いれば、

Fig. 7 Effect of concentration of artificial seawater (ASW) on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; ■, 20%; ▲, 10%; ×, 5% ASW. Initial average length: $8.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$. Bars, standard deviations.

ほとんどの沿岸域で塩分濃度を調整する操作無しに、直接バイオアッセイできる可能性が示唆された。

次に、実際の沿岸域海水(Fig. 8)のバイオアッセイを試みた(Fig. 9)。東部県境の宮崎海岸で採水したものでは、鞭毛再生のパターンは、コントロールである人工海水中のものと比較してほとんど変わらず、10時間後の鞭毛の再生長も、コントロールとほぼ同じであった。一方、魚津漁港で採水したものでは、鞭毛切断後10時間の再生長は、コントロールの約83%となり、魚津海岸(魚津市の蜃気楼ロード沿岸)で採水したものでは、それが、コントロールの約77%と、低い値であった。さらに、富山県沿岸の中央付近に位置する岩瀬漁港、富山港、四方漁港などで採水したものでは、10時間後の再生長が、コントロールの約77~87%となった。なお、各海水の比重から濃度を換算したところ、すべて人工海水濃度で50%以上に相当し、pHも7.4~8.3で、鞭毛の再生へ影響するものではなかった。これらの結果から、富山湾沿岸域でも、より外海に面した宮崎海岸で採取した海水中よりも、漁船の出入りの激しい漁港や下水口のある海岸などで採取した海水中での鞭毛再生率が低い値となり、そのような海水中に、ドナリエラの鞭毛再生に影響するような汚染物質の存在が推察された。そして、ドナリエラの鞭毛再生が、沿岸域海水のバイオアッセイに実用化できることも強く示唆された。さらに、これまでの単細胞藻類を使ったバイオアッセイは、殆どが増殖阻害を指標とした評価であり、12~24時間以上の時間が必要であったが、ドナリエラの鞭毛再生を指標に用いれば、評価時間も2~4時間と大幅に短縮することが可能であると思われる。

Fig. 8 A schematic diagram of collecting points for coastal seawater in Toyama Bay.

Fig. 9 Effect of coastal seawater in Toyama Bay on flagellar regeneration of *Dunaliella* sp. ●, control; □, Miyazaki coast; △, Uozu coast; ◇, Uozu Fishing Port; ×, Iwase Fishing Port; ■, Toyama Port; ▼, Yokata Fishing Port. Initial average length: $10.5 \pm 1.3 \mu\text{m}$. Bars, standard deviations. a* (▼, ■, ◇), $p < 0.01$; b* (△, ×), $p < 0.01$ compared with control and (▼, ■, ◇) respectively on 8-h and 10-h.

た。そして、今後は、一方で高感受性変異株の単離を試みながら、もう一方で他の汚染物質の影響や、富山湾沿岸域海水の鞭毛再生への影響を継続的に調べていくことが必要であると思われる。

4. まとめ

環境中の汚染物質の最終的な集積場は、主に海洋になると考えられる。そこで、海水中の汚染物質を迅速、簡便に検出するためのバイオアッセイとして、海洋性単細胞緑藻ドナリエラの鞭毛再生を利用する方法を検討した。まず、ドナリエラの鞭毛を切断すると、切断後約6～8時間で切断前の長さにまで回復することが判った。そこで、今回は、環境汚染物質とされる重金属イオン (Cu^{2+} および Cd^{2+})、界面活性剤の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)、そして、内分泌攪乱化学物質とされる4-ノニルフェノール(NP)やビスフェノールA(BPA)を用いて、ドナリエラの鞭毛再生への影響を調べた。その結果、鞭毛再生への各物質に特徴的な阻害パターンが見られた。これら5種類の汚染物質について、半数影響濃度 (EC_{50}) を求めた結果、 $\text{NP} > \text{Cu}^{2+} > \text{LAS} > \text{BPA} > \text{Cd}^{2+}$ という順に阻害の強さが見られた。さらに、これらの EC_{50} を、我が国の排水基準値と比較したところ、 Cu^{2+} の EC_{50} がその約4～8倍の感度を有することが判った。

次に、人工海水を用いてその濃度を0～100%の間で変化させ、鞭毛再生への影響を調べた。その結果、10～20%以上の海水濃度であれば、鞭毛の再生が正常に起こることが確認された。したがって、ドナリエラの

鞭毛再生は、汽水でも塩分などの濃度調整をすることなく、直接アッセイに用いることが可能であると考えられた。そこで、富山湾の沿岸域の海水を採水し、その中での鞭毛再生実験を試みた。その結果、6定点中5定点で採水した海水中的鞭毛再生率は、鞭毛切断後10時間でコントロールの約77～87%となった。そして、漁港内や排水口のある沿岸域で採取した海水中的鞭毛再生率が低い値となり、これらの海水が汚染されている可能性が示唆された。

以上の結果から、ドナリエラの鞭毛再生が、沿岸域海水のバイオアッセイに有用であると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ドナリエラを分譲していただいた、長崎大学水産学部の萩原篤志先生に、そして、ドナリエラの培地について御教示いただいた、名古屋大学生物分子応答センターの武藤尚志先生に感謝申し上げます。

(原稿受付 2001年7月17日)

(原稿受理 2002年6月13日)

参 考 文 献

- 1) Chemical Abstracts Service: <http://info.cas.org>
- 2) 鈴木基之, 内海英雄/編 (1998) バイオアッセイ水環境のリスク管理, 講談社サイエンティフィク, 東京.
- 3) 青山勲 (1997) 生態影響評価のためのバイオアッセイ, 「バイオアッセイ国際シンポジウムinとやま」講演論文集, 36-43.
- 4) 楠井隆史 (1998) 諸外国におけるバイオアッセイ手法の動向, 第34回日本水環境学会セミナー「環境化学物質とバイオアッセイ」講演資料集, 12-26.
- 5) 針木和也・楠井隆史・中村省吾 (1999) クラミドモナスの鞭毛再生に及ぼす Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} の影響, 日本環境毒性学会誌, 2, 141-147.
- 6) Hariki, K. and Nakamura, S. (1999) Effect of surfactants and endocrine disruptors on flagellar regeneration and swimming velocity in *Chlamydomonas reinhardtii*, Proceedings of the International Symposium "Earth-Water-Humans", Kanazawa University, 104-108.
- 7) Yuasa, T. and Muto, S. (1992) Ca^{2+} -dependent protein kinase from the halotolerant green alga *Dunaliella tertiolecta*: Partial purification and Ca^{2+} -dependent association of the enzyme to the microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 296, 175-182.
- 8) Nakamura, S., Takino, H. and Kojima, M. K. (1987) Effect of lithium on flagellar length in *Chlamydomonas reinhardtii*, Cell Struct. Funct., 12, 369-374.
- 9) 若林明子 (1998) 化学物質の毒性や濃縮性に影響を与える因子, 日本環境毒性学会誌, 1, 27-40.
- 10) Johnson, K. A. and Rosenbaum, J. L. (1992) Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*, J. Cell Biol., 119, 1605-1611.
- 11) 環境庁 (1998) 環境ホルモン戦略計画SPEED'98.
- 12) Kong, I., Bitton, G., Koopman, B. and Jung, K. (1995) Heavy metal toxicity testing in environmental samples, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 142, 119-14