

## 5. 水環境の評価に関する調査

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 鈴木 穰  
主任研究員 津森 ジュン  
宮島 潔  
専門研究員 東谷 忠  
山下 尚之

### 1. はじめに

本調査は、利根川、多摩川等の河川流域を対象に、流域条件と水量・水質の関係把握、栄養塩の実態と富栄養化ポテンシャルの評価、水質と生物影響の関係、特に一次生産に対する影響評価、都市排水が水生生物に与えるホルモン作用の把握を行い、河川における水環境の現状を把握するとともに、今後も良好な水環境を保全するために有用なデータの収集を行うものである。

平成 16 年度は、農薬に着目して中川の倉田橋等にて藻類の生長阻害試験及び水質調査を実施した。また、陸域から海域へ供給される物質として栄養塩類に注目し、利根川において栄養塩類の流下方向での分布について調査した。さらに、平成 15 年度に引き続き多摩川の石原、拝島の両水質自動監視所においてメダカを用いた現地での曝露評価試験の改良を行うとともに曝露評価試験を行った。

### 2. 水・物質循環機構理解のための実態調査

ゴルフ場農薬による環境汚染問題をきっかけに、環境基準や水質評価指針等の農薬規制が定められた。しかし、規制対象となっている農薬は限られていること、新たな農薬の開発も進められていることにより、水田に施用された農薬が河川水から検出されることが報告されている。本調査では、農薬の流出実態を把握することを目的とした。

#### 2-1 藻類に対する影響調査

調査地点は、中川の倉田橋（中川基点から 17.7km）、および庄内橋（同 23.0km）の 2 地点とした。平成 16 年 4 月 30 日～7 月 6 日の間、各調査地点において採水を行った後、試料を実験室に持ち帰り藻類生長阻害試験を行った。

##### (1) 試験方法

藻類生長阻害試験の供試藻類としては、緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35) を用いた。*P. subcapitata* は、藻類培養用の AAP 培地を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後 3～5 日経過した対数増殖期のものを試験に用いた。試験では、継代培養を行っている *P. subcapitata* を滅菌した濃度 15mg/L の  $\text{NaHCO}_3$  溶液で洗い、培地成分を除いた後に使用した。

藻類生長阻害試験については、Blaise らの方法を参考にして、マイクロプレートを用いて実施した。マイクロプレートの各ウェルには、200 $\mu\text{L}$  のサンプルと 20 $\mu\text{L}$  の *P. subcapitata* 細胞懸濁液および 20 $\mu\text{L}$  の培地を入れ、培養温度 24 $^{\circ}\text{C}$ 、120rpm の振とう条件で 96 時間培養を行った。光条件は、照度 4000Lux の連続照射とし、藻類の初期細胞濃度は  $1 \times 10^4$  cells/mL とした。培養期間中、マイクロプレートリーダー（Wallac 社製、ARVO SX-1420）を用いて吸光度（波長 450nm）を測定し、藻類増殖量をモニタリングした。藻類生長曲線下の面積から、対照試料と比較した場合の藻類生長阻害率を算出した。

##### (2) 調査結果

倉田橋および庄内橋で採水した試料についての藻類生長阻害試験の結果を図-1～図-2 に示す。倉田橋、

庄内橋いずれの地点においても、4月30日から5月14日に採水した試料では40%~80%以上の阻害率が認められた。

5月末以降に採水した試料では、阻害の認められるものは4試料と少なかった。また、その阻害率は5月前半の試料と比べると比較的小さく、同一採水日に両地点で阻害が認められることもなかった。このことから、5月の前半には、除草剤の散布により化学物質の河川への流出が継続して起こっていたという可能性が考えられた。

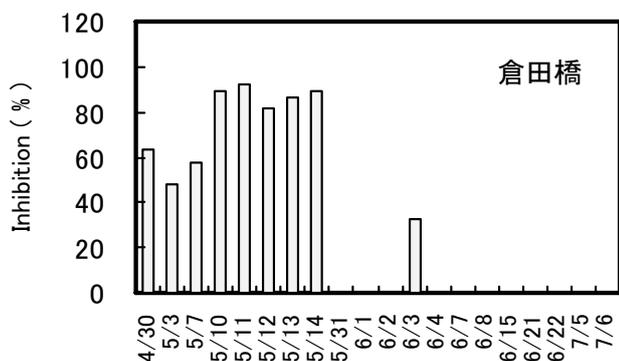


図-1 藻類生長阻害試験結果 (倉田橋)

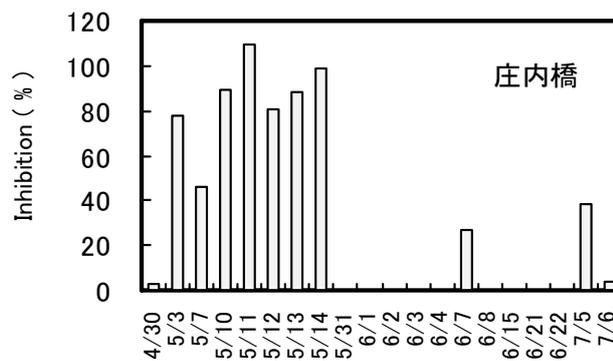


図-2 藻類生長阻害試験結果 (庄内橋)

## 2-2 藻類生長阻害原因物質の検討

藻類の生長阻害の認められた試料の一部について、機器分析による原因物質の特定を試みた。調査地点間で阻害率が大きく異なっていた4月30日の試料、いずれの調査地点においても阻害率の大きかった5月10日の試料を選定し、代表的な除草剤について定法にしたがって分析を行った。

分析結果を表-1に示す。分析対象とした21物質は、4試料全てについて定量下限未満の値であった。この結果から、使用されている農薬が異なるのか、河川中で分解しているのかは不明であるが、物質を特定するためには、農薬の使用状況に関する情報収集が不可欠であると考えられた。一方で、藻類生長阻害試験などのバイオアッセイの適用が、毒性物質が不明な場合に有効であることが再認識された。

表-1 農薬分析結果

	4月30日 倉田橋	4月30日 庄内橋	5月10日 倉田橋	5月10日 庄内橋	定量下限値 (mg/L)	分析方法
MCC	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ジチオピル	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
シマジン	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
テルブカルブ	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ナプロバミド	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ピリブチカルブ	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ブタミホス	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
プロミザミド	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ベンスリド	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ法(FID)
ペンディメタリン	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
ペンフルラリン	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
メチルタイムロン	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0002	ガスクロマトグラフ質量分析法
MCPP	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	高速液体クロマトグラフ法
2, 4-PA-Na	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	高速液体クロマトグラフ法
トリクロピル	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	高速液体クロマトグラフ法
アシュラム	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	高速液体クロマトグラフ法
グルホシネート	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	高速液体クロマトグラフ法
シデュロン	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	高速液体クロマトグラフ法
ハロスルフロメチル	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	高速液体クロマトグラフ法
フラザスルフロ	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	高速液体クロマトグラフ法
グリホサート	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	高速液体クロマトグラフ法

### 3. 水生生物への影響に関する調査

水域の富栄養化の程度を測定する方法としては、AGP (Algal Growth Potential) 試験がある。これは、検水に藻類を接種して一定の条件下で培養を行い、検水の藻類増殖能力を観察するものであり、窒素・リンなどの栄養塩類を含め、検水の総合的な藻類増殖能力を測定するものである。

本調査では、多数のサンプルを迅速に処理する手法として、マイクロプレートを用いた AGP 試験について検討を行うとともに、様々な排水が流入する利根川流域を対象として調査を行い、利根川流域における AGP の分布や栄養塩類との関係について検討した。また近年、藻類種の増殖バランスの観点から、水域におけるシリカの存在量が問題となっている。藻類の増殖には、窒素およびリンといった栄養塩類とともに、シリカも重要な元素であり、特に、河川等に多く生息している付着性の珪藻類にとっては、シリカは必須元素である。そこで、利根川流域におけるシリカの分布についても調査を実施した。

#### 3-1 試験方法

AGP試験の供試藻類としては、藻類試験に一般的に用いられる緑藻類*Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35)を用いた。*P.subcapitata*は藻類培養用のAAP培地を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後4~7日経過した対数増殖期のものを試験に用いた。試験では、継代培養を行っている*P.subcapitata*を滅菌した15mg/LのNaHCO<sub>3</sub>溶液で洗い、培地成分を除いた後に使用した。AGP試験は96穴のマイクロプレート (Falcon社製) を用いて行った。マイクロプレートの各ウェルには、200μLのサンプルと40μLの*P.subcapitata*の細胞懸濁液を入れ、培養温度24°C、120rpmの振とう条件で培養を行った。光条件は、照度4000Lux、12時間明暗周期とし、藻類の初期細胞濃度は $1 \times 10^4$  cells/mLとした。培養期間中、マイクロプレートリーダー (Wallac社、ARVO SX-1420) を用いて吸光度 (波長450nm) を測定し、藻類増殖量をモニタリングした。藻類量がほぼ一定になった時点での藻類増殖量をAGPとした。

調査は、2004年1月および2004年8月に実施した。採取したサンプルは、ガラスファイバーフィルター (GF/B、Whatman) およびメンブレンフィルター (0.2μm、Advantec) によりろ過を行った後、試験に供するまでの間、-30°Cにて冷凍保存を行った。AGP試験は、凍結保存しているサンプルを融解した後、希釈系列を作成しマイクロプレートを用いて行った。また同時に、採取したサンプルについて、オートアナライザー (Bran Lubbe社製、TRAACS800) により、窒素およびリン濃度についても測定を行った。さらに、2004年8月に採取したサンプルについては、モリブデン黄による吸光光度法によりシリカ濃度の測定を行った。

#### 3-2 試験結果および考察

##### (1) 利根川流域における AGP の分布

図-3に利根川流域における2004年8月のAGPの分布を示す。利根川本川におけるAGPは、上流から下流部に行くに従ってその値が上昇するというわけではなく、本川においても値が上下するなど複雑な変化を示した。また、利根川本川の最下流部に位置している銚子大橋においては、AGPはかなり小さい値となった。一方、東京都心部を流れて東京湾へと注ぐ河川である江戸川や中川については、利根川本川と比較してAGPは高い値となった。

また、2004年1月と2004年8月のAGPデータを比較すると、全般的に2004年8月のAGPのほうが低い値となった。低温期である1月と比較して、8月の高温期のほうが河川内に存在する付着藻類や他の生物の活性が上昇する。このことから、冬期に比べて8月のほうが、水中の栄養塩類の消費が早くなると考えられる。また、河川流量については、冬期の1月のほうが少なくなる傾向があり、その結果冬期には河川水中の栄養塩類濃度が上昇することとなる。これらのことから、夏季である2004年8月のAGPは小さくなったと推察される。

##### (2) 利根川流域におけるシリカの分布

図-4に利根川流域におけるシリカ (SiO<sub>2</sub> mg/L) の分布を示す。利根川流域におけるシリカ濃度は、流域全

体に渡って比較的一様であり、あまり大きな変化は見られなかった。利根川本川におけるシリカ濃度は、12.5

～18.2mg/L の間で変化し、流下に伴う変化はあまり見られなかったが、利根川河口部の銚子大橋においてのみ低い値

(5.1mg/L) となった。一方、霞ヶ浦(西浦)におけるシリカ濃度は、10.5～17.1mg/L の間で変化し、利根川本川と比較して大きな差は見られなかった。霞ヶ浦においては、夏期においても

*Aulacoseira granulata* や *Cyclotella spp.* という珪藻類が出現するため、湖水中のシリカが消費されることが予想されるが、霞ヶ浦において大きな濃度減少は観察されなかった。リンなどの元素と比較して、藻類が

利用可能なシリカの存在量が豊富であるためであろう。窒素およびリンといった栄養塩類の負荷が大きく AGP が高い値を示した江戸川については、シリカ濃度は13.8～18.8mg/L の間で変化し、他の地点と比較して大きな差は見られなかった。このことから、窒素・リンといった栄養塩類とシリカは、その負荷発生源が異なっていることが示唆される。

また、江戸川においても河川の河口部においてのみ、シリカ濃度は低い値(5.6mg/L) が示された。この江戸川河口部の地点においては、塩素イオン濃度も高い値が示されており、海水の影響が大きい場所であると考えられる。このことから、海水が流れ込む水域においては、シリカ濃度は低下すると予想される。

利根川流域において、シリカ濃度は10mg/L 以上と比較的高い値が示されていることから、シリカが藻類増殖の制限因子になることは少ないと推察された。

2004年8月3日

○ AGP ( $1 \times 10^6$  cells/mL)

● AGP ( $5 \times 10^6$  cells/mL)

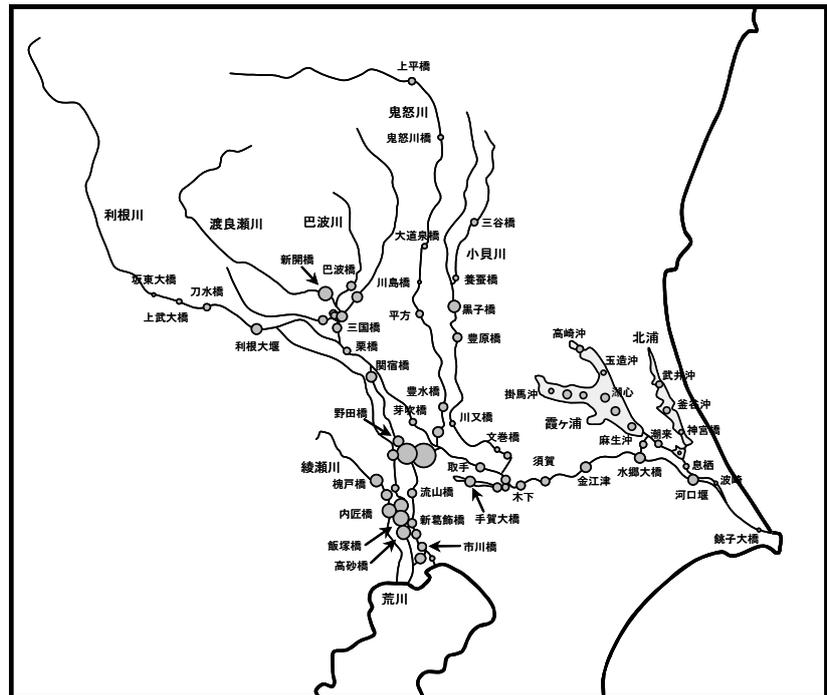


図-3 利根川流域におけるAGPの分布

(a) 2004年8月3日

○ ケイ酸濃度 (10 mg/L)

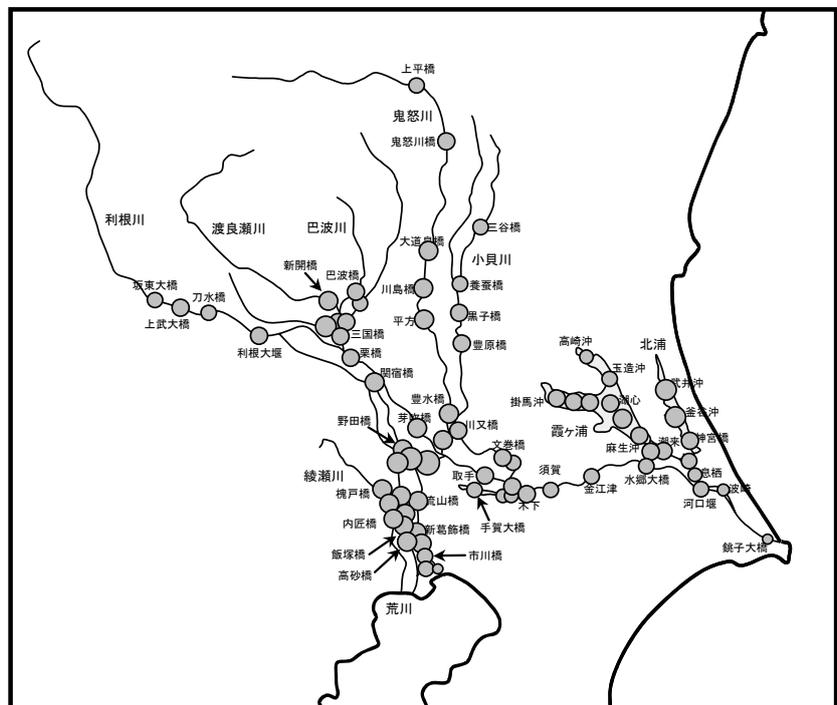


図-4 利根川流域におけるシリカの分布

#### 4. メダカを用いた化学物質影響試験

化学物質による魚類への影響として、内分泌攪乱作用による雄魚の雌性化が問題となっている。河川における魚類の雌性化についてその影響要因を特定するには、性状変化の生じていない新鮮な河川水を用いて魚類曝露試験を行い、その河川水に含まれている雌性化の原因物質を特定することが重要である。

本調査では、新鮮な河川水を用いることのできる場所として水質自動監視所を選定し、開発した魚類曝露試験装置により試験を実施してきた。その結果、河川での魚類影響を検出するためには、水温の安定した制御など室内試験と同様に試験条件を制御する必要があると考えられた。そこで、平成16年度は、試験条件の制御を安定させるとともに、下水処理水の流入前後において曝露試験を実施して、魚類影響の有無および影響要因物質の探索を実施することとした。

##### 4-1 調査方法

###### (1) 試験実施地点

雄魚の雌性化については、下水処理水に残存するエストロゲンおよびノニルフェノールなどのエストロゲン様物質が疑われている。そこで、下水処理水の流入する上下流に水質自動監視所が設置されている多摩川を試験対象河川と選定した。多摩川本川に設置されている監視所のうち、最上流に位置する拝島橋監視所は処理水の流入していない地点として試験実施に選定した。また、石原監視所は浅川合流点の下流に位置し、合計8処理場の処理水を受け入れている地点として選定した。

###### (2) 現地魚類曝露試験法

水質自動監視所では、河川から水をポンプアップして、一時間ごとに水温、pH、溶存酸素、電気伝導度、濁度を自動測定している。一時間ごとの測定のため、30分間河川水をポンプアップしており、測定に不要な余剰水は排水しているので、この余剰水をメダカ曝露試験に用いることとした。

メダカ曝露試験システムでは、河川水は最上部の第1槽に送られる。第1槽は貯水および流量調節を主目的としたステンレス水槽であり、内部に設けたステンレスメッシュによってゴミや砂泥の除去をおこなう構造である。流量は、第2槽へ滴下させるキャピラリーの内径および設置高さを調整することによって、システム全体の単位時間当たりの流量を制御することとした。第2槽は水温調節機に接続しており、河川水はこれらを循環して温度が保たれる構造とした。このようにして水温を一定にされた河川水は、サイフォンによって魚類曝露水槽へと滴下させる。ガラス製のメダカ曝露水槽では、排水口をステンレスメッシュで覆い、メダカが流されない構造とした。第2槽からの流入水は、フンやエサの食べ残しを押し流すことを期待してサイフォンから勢いよく流れ落ちてくるためである。

照明の点灯時間はプログラムタイマーを用いて16時間明8時間暗に調節し、エサは自動給餌器を用いて1日に4回、市販の粉末餌を給餌することとした。なお、今回の試験では、曝露水槽の水温を一定に保つことを確実にするため、鑑賞魚用のサーモスタット付投げ込みヒーターを使用した。

水温、日長時間、エサ、流量などの試験条件は、実験室内で行われる室内曝露試験と同条件に調節した。流量および水温はそれぞれ30L/hour、26°Cとした。さらに、曝露期間は2週間および4週間とした。これらの曝露条件は環境省の化学物質影響試験の手法に沿って決定した。

###### (3) ビテロジェニンおよび水質の分析

雌性化の指標として、雄メダカの個体ごとに曝露後のビテロジェニン（VTG：卵黄タンパク前駆物質）濃度を測定することとした。測定は、肝臓抽出液を用いるメダカ VTG-ELISA キットを用いた。河川水に曝露したメダカは、体重、全長、体長を測定し、開腹して肝臓を取り出した。肝臓の重量を測定してサンプルバッファ内ですりつぶし、遠心分離によって肝臓抽出液を作製した。肝臓抽出サンプルは測定に供するまで、ディープフリーザーで保管した。

メダカ VTG-ELISA キットは、抗 VTG 抗体を固相化した 96 穴マイクロプレートや試薬など測定に要する試薬がキット化されており、添付のプロトコールどおりに測定を実施した。

## 4-2 試験結果

### (1) 拝島橋監視所

拝島橋監視所における水質試験結果を表-2に示す。試験期間においてエストロンなどのエストロゲンは検出されなかった。エストロゲン活性は最高値で0.35 ng/L-E2であった。また、曝露試験を行った雄メダカにVTGの生成は認められなかった。

表-2 拝島橋監視所 エストロゲン類測定結果

	水槽	試験開始	第1週	第2週	第4週	検出下限値	定量下限値
エストロゲン活性 (ng/L-E2)	第2槽	0.35	0.33	0.22	0.05	0.05	0.08
	曝露水槽		0.24	0.24	ND		
E2	第2槽	ND	ND	Tr (0.9)	ND	0.30	1.00
	曝露水槽		ND	ND	ND		
E1	第2槽	ND	ND	ND	ND	0.20	0.60
	曝露水槽		ND	ND	ND		
EE2 (ng/L)	第2槽	ND	ND	ND	ND	1.30	4.40
	曝露水槽		ND	ND	ND		

ND：検出下限値未満

Tr：検出下限値以上一定量下限値未満

### (2) 石原監視所

石原監視所では、試験期間におけるエストロン（E1）の検出が顕著であり、エストロンがエストロゲン活性の大きな部分を占めていると考えられた。これらの測定結果を表-3に示す。2週間および4週間の曝露の結果、すべての雄メダカにVTGの生成が認められた。曝露開始から2週間および4週後の雄メダカVTGの平均値は、それぞれ19.1、11.3 ng/肝臓mgであった。

表-3 石原監視所 雄メダカのVTG測定結果

個体No.	体重	全長	体長	肝重量	肝指数	VTG濃度
TM0403-	mg	mm	mm	mg	%	ng/mg liver
ISH-2W01	240.4	29.2	23.6	7.7	3.20	19.7
ISH-2W02	173.9	26.4	20.5	5.3	3.04	31.9
ISH-2W03	179.7	25.7	20.3	7.4	4.14	42.0
ISH-2W04	194.7	26.6	21.9	5.4	2.78	10.0
ISH-2W05	284.3	29.7	25.2	8.7	3.05	11.3
ISH-2W06	212.5	28.6	23.1	4.7	2.21	7.9
ISH-2W07	212.3	28.1	21.9	5.5	2.60	12.4
ISH-2W08	242.6	28.2	22.0	10.5	4.33	13.7
ISH-2W09	238.8	27.8	22.6	7.8	3.28	23.1
MAX	284.3	29.7	25.2	10.5	4.3	42.0
MIN	173.9	25.7	20.3	4.7	2.2	7.9
AVE	219.9	27.8	22.3	7.0	3.2	19.1
STD	35.2	1.3	1.5	1.9	0.7	11.4
ISH-4W01	237.1	31.0	25.6	4.9	2.07	4.3
ISH-4W02	258.7	31.2	25.6	5.0	1.94	11.6
ISH-4W03	247.2	30.2	24.7	2.4	0.99	12.4
ISH-4W04	239.0	30.5	24.5	3.6	1.49	13.8
ISH-4W05	198.0	27.9	23.1	2.9	1.44	4.8
ISH-4W06	213.7	29.7	24.5	6.9	3.22	21.6
ISH-4W07	230.4	28.5	23.4	5.2	2.27	6.0
ISH-4W08	239.0	30.5	25.2	4.4	1.85	5.9
ISH-4W09	237.3	29.7	24.4	3.4	1.45	18.9
ISH-4W10	245.1	30.4	25.9	4.5	1.82	13.7
MAX	258.7	31.2	25.9	6.9	3.2	21.6
MIN	198.0	27.9	23.1	2.4	1.0	4.3
AVE	234.5	29.9	24.7	4.3	1.9	11.3
STD	17.3	1.1	0.9	1.3	0.6	6.0

\*ND <0.5 ng/mg liver

#### 4-3 考 察

##### (1) 石原監視所での雄メダカ VTG の生成

下水処理場 8ヶ所の処理水が流下している石原監視所において、曝露開始後 2 週間および 4 週間のすべての雄メダカに肝臓ビテロジェニンが観察された。水質分析の結果、メダカ曝露水槽でのエストロンおよびエストロゲン活性はそれぞれ 6.7~33.1ng/L、および 5.3~27.9ng/L-E2 であり、エストロンが雄メダカの肝臓ビテロジェニンを生成させた要因と考えられた。

さらに、河川水のエストロゲン作用は、河川水に占める下水処理水の割合を反映する電気伝導度の推移に似ていた。降雨によって河川流量が上昇すると、河川に占める処理水割合が低下して電気伝導度が低下し、エストロゲン活性も低下していた。このため、雄メダカのビテロジェニン生成も河川のエストロゲン作用に比例して変動するらしく、曝露 4 週間後には、曝露期間は長いにもかかわらず雄メダカのビテロジェニン生成は、河川水のエストロゲン活性の低下にともない減少した。

これらの結果から、石原監視所のようにエストロゲン作用の認められる地点では、雄魚はビテロジェニンを生成するほどの影響を受けていると考えられるが、天候によりその作用も変動するものと考えられた。また、この地点での電気伝導度はエストロゲン活性やエストロンのよい指標になると考えられた。

環境省の報告ではノニルフェノールおよび 4-t オクチルフェノールがメダカの内分泌を攪乱すると物質であると認められている。10~20ng/mg-肝重量の肝臓ビテロジェニンを生成した石原監視所での結果は、環境省報告におけるノニルフェノール 20 μg/L 曝露の結果に相当する。さらに、この濃度で孵化後のメダカを 60 日間曝露すると、雄から雌への性転換が起こると報告されている。このため、石原監視所で観測されたエストロゲン物質の影響は、孵化後の稚魚に性転換を引き起こすのに十分なレベルかもしれない。

拜島橋監視所では下水処理水を含まない河川水が流れているため、多摩川でのメダカ曝露試験の対照地点と位置づけられる。今回、ガラス水槽の水温を 26°C に保って試験を実施した結果、雄メダカのビテロジェニン生成は確認されなかった。エストロゲン活性は 0.05~0.35 ng/L-E2 (第 2 槽) であり、17β-エストラジオールやエストロンはすべて ND であったことから、石原監視所での成果に対し比較検討が可能な試験ができた対照地点と位置づけられた。

#### 5 まとめ

本研究の成果として、以下の事が示された。

- ① 4 月末から 5 月中旬に中川で採水した試料は、藻類生長阻害が認められた。生長阻害の原因として農薬を想定して、機器分析を行ったが検出されなかった。生長阻害要因の究明に向け、分析対象物質を絞り込むための情報収集や分析方法の検討が必要であると思われた。
- ② 利根川本川において、藻類増殖能力の夏季、冬季の実態を明らかにした。シリカを含めた栄養塩濃度と AGP 値との関係を検討するためには、今後のデータ蓄積が必要である。
- ③ メダカを用いた河川水質試験所における曝露試験によりビテロジェニン生成が確認された。水質分析の結果、下水処理水に含まれるエストロンが雄メダカのビテロジェニンを生成する要因と考えられた。

なお、本調査研究は、関東地方整備局からの受託業務費により実施されたものである。

#### 参考文献

- 1) Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R., Vasseur, P. : A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, 1, 261-281, 1986
- 2) 日本下水道協会 (1997) AGP 試験、下水試験方法 上巻 (1997年版)、554-562.

- 3) 日本水質汚濁研究協会 (1982) 藻類生産潜在力調査、湖沼環境調査指針、公害対策技術同友会、193-199.
- 4) 環境省 ; Medaka *Oryzias latipes*: Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. <http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html>, 2003
- 5) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明; 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, 36, pp.199-208, 1999