



生活排水のバイオアッセイにおけるミジンコの有用性と最適なモニタリング方法

吉永, 信美

(Citation)

課題研究優秀論文集, 2025:1-31

(Issue Date)

2026-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/0100499441>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100499441>



2025 年度 卒業研究最終論文

生活排水のバイオアッセイにおける
ミジンコの有用性と最適なモニタリング方法

神戸大学附属中等教育学校 12 回生

6 年 3 組 36 番

吉永 信美

(指導教員 樋口 真之輔、兎本 博介)

2025 年度 卒業研究最終論文

生活排水のバイオアッセイにおけるミジンコの有用性と最適なモニタリング方法について

神戸大学附属中等教育学校 12 回生 6 年 3 組 36 番 吉永 信美

(指導教員 樋口 真之輔、兎本 博介)

要旨

生活排水は河川や海水の汚染に大きな影響を与えている。実際に、東京都内で川や海に流される汚濁の 70%以上は生活排水に起因している（東京都環境局，2023 年）。し尿を除く雑排水のうち、台所、風呂が 90%を占めていて、これらはどちらも石鹼、洗剤を主な汚染原因としている（水フォーラム—科学と技術—，2017 年）。そこで本研究は、生活排水のバイオアッセイを行う際にミジンコは有用な指標生物となりうるかどうか、最適なバイオアッセイ法は何かについて調べた。合成界面活性剤を含む洗剤と比べて毒性が低いものの、きちんと処理されなければ水生生態系に多大な影響を与えてしまう石鹼に焦点を当てて実験を行った。0.01mL、0.03mL、0.05mL、0.1mL、0.3mL、0.5mL、1.0mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）の濃度の石鹼水に対するミジンコの遊泳阻害率と採餌阻害率について調べた。遊泳阻害率は石鹼水にミジンコを 10 分、20 分、30 分、40 分、50 分間暴露させ、それぞれのミジンコの遊泳軌跡、速度、加速度を動画解析ソフトで解析した。採餌阻害率については、0.1mL、0.3mL、0.5mL、1.0mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）の石鹼水とミジンコが 30 匹入ったビーカーに、ミジンコの餌である植物プランクトンのクロレラを 0.5mL ずつ入れて、1 時間後に分光光度計でそれぞれの溶液の吸光度を測った。遊泳阻害率を調べる実験では、遊泳軌跡を観察することによって最短 10 分で遊泳阻害を確認することができ、測定可能な濃度は 0.05mL/300L（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上であることが確認された。また、30 分間以上測定すると 0.01mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上の濃度によるミジンコの遊泳阻害が確認できると分かった。遊泳速度の変化は、ある時間まで毒に耐えられるが、それを過ぎると一気に遊泳速度が遅くなるような、階段型であると考えられる。平均遊泳速度を比較すると、0.02mL の石鹼の体積差でも差が顕著に現れ、最短で 10 分、最大で 50 分間でバイオアッセイが可能であることが分かった。また、濃度は最も低くて 0.01mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）まで検定可能であることが分かった。加速度は絶対値が大きくなり、これは角ばった軌跡と関係があると考えられる。採餌阻害に関する実験では、石鹼の濃度の違いによる大きな差はなかった。しかし、石鹼ありとなしでは、ミジンコが食べた餌の量に大きな差があった。よって、完全に無毒化したかどうかの確認には有効だと考える。これは 1 時間で測定可能である。これらから、石鹼の微量な体積の差に着目した毒性評価をしたい場合は、遊泳解析を行い、完全に石鹼を取り除くことができたかを確認したい場合は、ミジンコの採餌阻害率について調べる手法が有効であると結論付けた。遊泳解析も採餌阻害率について調べる手法も所要時間が最大で 1 時間程度であり、短時間でバイオアッセイが可能であることが分かった。また、ミジンコは容易に繁殖するので、入手しやすい指標生物であると考えられる。以上から、ミジンコによる生活排水のバイオアッセイは効率的で有用な方法であると結論付けた。

生活排水のバイオアッセイにおけるミジンコの有用性と

最適なモニタリング方法

The Utility of *Daphnia Pulex* in the Bioassay of Sewage and Its Optimal Monitoring Methods

吉永 信美

Nobumi Yoshinaga

Abstract

This study revealed the utility of *Daphnia pulex* in the bioassay of sewage and its appropriate monitoring methods. I conducted two kinds of experiments. The first one was about the movement prevention rates. The second one was about the feeding inhibition rates. From the first experiment, I found out that the speed deteriorated and the acceleration increased as toxicity increased. In addition, the swimming tracks changed greatly related to toxicity. From the second experiment, I discovered there was a big difference between with and without soap in the feeding inhibition rate. In conclusion, motion analyses are effective ways to examine slight differences in the amount of soap and experiments on the feeding inhibition rates are effective in examining whether soap is completely removed. It is possible to measure concentrations as low as $3.33 \times 10^{-3}\%$ (volume of soap/volume of distilled water). This study focused on bioassay, so comparison of chemical toxicity tests with bioassay will be useful to reveal uniqueness of bioassay.

Keywords: daphnia pulex, bioassay, water pollution, soap, aquatic toxicity

凡例

1. 引用文：引用した史料に関しては、注でその引用箇所を示した。引用文中の「」は原文にあった部分であり、本論執筆者の補った部分ではない。また、…（中略）…は引用文の省略を示す。
2. 参照した文献：注でその引用箇所を示した。
3. 参考文献：参考文献は、本論文に出てくる順に並べる。

目次

要旨	1
凡例	3
第 1 章 序論	1
第 1 節 生活処理水による水質汚染について	1
第 2 節 石鹼・合成洗剤の使用による環境問題について	1
第 3 節 ミジンコの性質について	2
第 4 節 ミジンコのバイオアッセイとしての有用性について	2
第 5 節 ミジンコのバイオアッセイにおける先行研究	2
第 6 節 本研究の目的	3
第 7 節 本論文の構成	4
第 2 章 石鹼によるミジンコの遊泳阻害に関する実験	5
第 1 節 本調査の概要	5
第 2 節 調査目的	5
第 3 節 調査方法	5
第 4 節 調査結果	6
第 5 節 考察	15
第 3 章 石鹼によるミジンコの採餌阻害に関する実験	18
第 1 節 本調査の概要	18
第 2 節 調査目的	18
第 3 節 調査方法	18
第 4 節 調査結果	19
第 5 節 考察	21
第 4 章 結論	23
第 1 節 まとめ	23
第 2 節 今後の展望	23
謝辞	24
参考文献	25

第 1 章 序論

第 1 節 生活処理水による水質汚染について

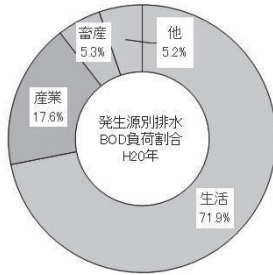


図 1

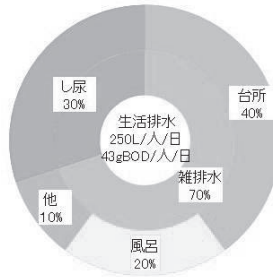


図 2

生活排水とは、トイレ、台所、洗濯、風呂などから出される生活に起因する排水のことを指す。生活排水は河川や海水の汚染に大きな影響を与えている。実際に、東京都環境局の 2023 年の調査

(www.kankyo.metro.tokyo.lg.jp) に

よると、都内で川や海に流される汚

濁の 70%以上は生活排水に起因している。雑排水とは、生活排水のうち、し尿を除く排水で、台所、洗濯、風呂などから出される排水のことを指す。家庭から出される汚濁のうち、BOD（生物化学的酸素要求量）については 74%、窒素の 25%を占めている。水フォーラム—科学と技術—では、生活排水の概況について、平成 20 年の発生源別排水 BOD 負荷割合は 71.9%が生活排水、17.6%が産業排水、5.3%が畜産排水であることが報告された。また、雑排水は生活排水のうち 70%を占めており、その雑排水のうち 40%が台所に起因し、20%が風呂に起因していると述べている。これらから、生活排水は水質汚染に多大な影響を与えていて、中でも石鹼や洗剤を使う台所と風呂から出る排水が主な原因であることが分かった。

第 2 節 石鹼・合成洗剤の使用による環境問題について

合成洗剤が誕生したのは、今から約百年前の第一次世界大戦時である。当時、ドイツでは動植物からとれる油脂が不足していたため、それを補うために合成洗剤が開発された。合成洗剤は 1960 年代頃から急激に普及した。しかし、合成洗剤に含まれる合成界面活性剤によって、様々な環境問題が生じた。例えば、家庭や工場から出る水が流れ込んだ川や湖に、たくさんの泡が消えずに残ったり、海や湖が富栄養化になり、プランクトン急増による水生物の生態系破壊などが起きたりした。そのため、政府や洗剤メーカーは、成分の見直しや合成界面活性剤を使わないなどして、環境負荷を軽減するような取り組みをしている（日本石鹼洗剤工業会，2010）。しかし、合成界面活性剤のみが環境問題を引き起こす原因ではない。例えば、石鹼（無添加石鹼を除く）に多く含まれているイソプロピルメチルフェノールという成分がある。イソプロピルメチルフェノールは、底質への吸着係数はトリクロサン等比べて 2 から 3 オーダー程度高く、水相中に残留しやすいことから、未処理の雑排水が流れ込む特異的に汚染物質の濃度の高い地域での水生生物への生態リスクに注意を払う必要があると指摘されている（田村，2012）。これらから、石鹼や洗剤を含む生活処理水が適切に処理されなければ、水圏生態系に多大な影響を及ぼすことが分かる。

第3節 ミジンコの性質について

ミジンコ *Daphnia pulex* は、動物界節足動物門鰓脚綱双殻目ミジンコ科ミジンコ属ミジンコ種に分類される。体長は1 mm前後である。ミジンコは、体の両側についている第2触覚を動かすことで遊泳する。水中では、第2触覚を上から下に動かすことによって、水をかき、体を前に動かしている。そのため後退することはできず、前進のみ可能である。また、平面上だけで遊泳するのではなく、三次元空間を移動することができる。すなわち、水の高さがある水中では、水面に対して鉛直上向きまたは下向きに遊泳することも可能である。ミジンコは餌として、植物プランクトンやバクテリアなどを5対の脚（胸部）の第3・第4胸脚でこし集めて食べている。また、緑藻、原生動物、酵母などを与えると良好な繁殖性を示す。

第4節 ミジンコのバイオアッセイとしての有用性について

バイオアッセイとは、生物作用性物質について、化学薬品の代わりに、生物材料を用いて生物応答を利用して毒性を評価する方法である。バイオアッセイは単一化学物質の毒性試験法として役立ってきた（楠井，2000）。水質の化学分析は、環境中に存在する既知物質を同定するためには有用な手段であるが、化学物質や汚染排水が生物に与える影響までは分からない。しかし、バイオアッセイでは生物に対する影響を直接測ることが出来るので、近年注目されている（国立環境研究所 | 生態毒性試験（バイオアッセイ）の必要性和役割（www.nies.go.jp）, 2024）。ミジンコは化学物質に対して感受性が高いため、化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）やOECDの化学品テストガイドラインなどで定められている生物試験、あるいは生態毒性試験の実験生物として用いられている（国立環境研究所 | アーカイブ集 | 01 ミジンコが教えてくれる世界（www.nies.go.jp）, 2024）。

第5節 ミジンコのバイオアッセイにおける先行研究

1982年に発表されたCE Gouldenが行った研究では、ミジンコを毒に暴露させ growth prevention（成長阻害率）と mortality rate（致死率）を調べることでミジンコの生物応答が明白に表れることを示した。

1997年に発表された青山勲氏らの論文では、OECDが化学物質の安全性に関する実験や指標として、生態毒性に関する手法の中、ミジンコを提示していることに基づいて、6価クロム、カドミウム、クロロフェノール、プロピザミド（除草剤）の4種類の化学物質の毒性検査を行っている。また、ミジンコの遊泳阻害の結果に着目して、「ミジンコの運動量解析の毒性評価方法は新しい毒性評価方法として、化学物質のモニタリングに利用することが可能である。」と結論付けている。また、2009年の高山勝己氏らの論文では、動画画像解析を用いたミジンコの泳動阻害試験を行い、毒物である有機リン系農薬フェントロチオン、通称MEPの影響によって、ミジンコが小円を描くような運動（旋回運動）を示すことを示した。

2004年に発表された釜谷美則氏らの論文では、「採餌時間と採餌量に比例関係が成り立つことから、オオミジンコは昼夜の別なく餌を一定速度で採餌していることがわかった。」と述べられている。また、ミジンコの餌であるクロレラを用いた採餌量の毒性試験法は、遊泳阻害試験法に比べて毒性物質の低いところで毒性評価が可能であると示唆している。

2005年には Rosana B. Sotero-Santos が、ミョウバンと塩化第二鉄を毒物としてミジンコのバイオアッセイをした際に、Acute toxicity（急性）と chronic toxicity（慢性）の2種類の反応について調べた。Acute toxicity は数時間から1日、chronic toxicity は数日の間、毒に暴露させてその反応を観察していた。また、化学的酸素要求量（COD）の増加とバイオアッセイの結果を比較していた。CODとは Chemical Oxygen Demand の略称で、日本語では「化学的酸素要求量」と呼ばれる。CODの値は、酸化剤を用いて液中の被酸化物を酸化させる際に消費される酸素の量を数値化したものである。酸素を消費する物質の大半が有機物であるため、海域や湖沼の水質汚染や工場排水の汚染の指標に用いられる

(www.pref.kanagawa.jp)。Rosana B. Sotero-Santos の研究では、CODで毒の強さを測り、そこで得られた毒の強さとミジンコのバイオアッセイの結果が比例していたことが明らかになった。

第6節 本研究の目的

合成洗剤や石鹼を含んだ生活処理水を海や湖に放出することで、海や川、湖の生態系に大きな影響を与えてしまう。特に石鹼は、毒性は低いものの、適切に処理せずに環境に出してしまうと、水圏生態系を壊してしまう危険性がある。そのため、石鹼や合成洗剤を含んだ生活処理水を、完全に無毒化した上で、自然界に流し出すことが必要であると考えられる。また先行研究から、化学物質に対して感受性の高いミジンコはバイオアッセイの指標として用いることができることが分かった。ミジンコのバイオアッセイの手法としては、ミジンコの遊泳阻害について調べる動画画像解析と採餌阻害率、成長阻害率、致死率を調べる調査があることが分かった。また、バイオアッセイをする時間に基づいて acute toxicity と chronic toxicity の2種類の観点があることが分かった。

しかし、先行研究では、カドミウムなど重金属の毒性が非常に高い毒物を用いたり、ミジンコが毒性の低い液体にも反応することを示すために、自然に存在している河川水を使用したりしている。そのため、生活処理水に含まれる石鹼の無毒化の指標として、ミジンコを用いていない。また、化学的な毒性検査方法である COD とバイオアッセイの結果が比例していることは分かったが、バイオアッセイで測定可能な最大、特に最小の濃度の限界値を求められていない。致死率と成長阻害率を調べるモニタリング方法は、水槽の中から同一個体のミジンコを探して測定することや、致死率と成長阻害率自体を測ることが容易ではないことから、現実的なバイオアッセイ法ではないと考えた。

これらのことを踏まえて、生活排水が水質を汚染する原因は主に洗剤と石鹼であるが、化学的毒性検査で容易に検出しづらい毒性が弱い石鹼に着目しようと考えた。また、遊泳阻害と採餌阻害について調べるアッセイ法は数時間で測定可能で、再現性も高く、現実的なバイオアッセイ法であると考えた。加えて、バイオアッセイでは毒性の低い毒物にも有

意な差を示すと仮説を立てた。

本研究では、ミジンコが毒性の弱い毒物である石鹼を含んだ生活処理水の無毒化の指標となりうるかどうか、最適なバイオアッセイの手法は何かについて考察した。この研究は、処理後の生活排水を自然界に放出する際の最終確認として、毒物への感度が非常に高いミジンコを用いるバイオアッセイを行うことを目的としている。

第 7 節 本論文の構成

本論文は 1～4 章にわたって構成されている。1 章は序論、2 章は石鹼によるミジンコの遊泳阻害に関する実験、3 章は石鹼によるミジンコの採餌阻害に関する実験、4 章は結論と今後の展望について書かれている。

第2章 石鹼によるミジンコの遊泳阻害に関する実験

第1節 本調査の概要

濃度の異なる石鹼水にミジンコを入れ、ミジンコの遊泳阻害について調べた。水温をミジンコの最適温度である 18.2℃で行うことで、石鹼以外の要因による遊泳阻害が起こらないようにした。小型ミジンコであるタマミジンコ（学名：*Moina macrocopa*）を用いて実験を行った。濃度は、1.0mL/300mL、0.5mL/300mL、0.3mL/300mL、0.1mL/300mL、0.05mL/300mL、0.03mL/300mL、0.01mL/300mL（石鹼の原液の体積/蒸留水の体積）で行った。10 分後、20 分後、30 分後、40 分後、50 分後ごとにミジンコをシャーレに移してカメラで撮影した。動画解析ソフトである Kinovea を用いて、ミジンコの遊泳を軌跡、速度、加速度の観点から可視化した。また対照実験として、正常なミジンコの運動の軌跡、速度、加速度についても調べて、これらを基準とした。同じ暴露時間での各濃度におけるミジンコの速度の平均値を散布図にまとめ、濃度の違いによってミジンコの遊泳阻害率の変化を明らかにした。

第2節 調査目的

先行研究より、ミジンコは毒に暴露されると遊泳阻害を起こすことが分かっている。しかし、先行研究では毒性の高いカドミウムなどで遊泳阻害率を調べていた。この実験では、毒性が低い石鹼でもミジンコは遊泳阻害を起こすのか、それはバイオアッセイ法として利用できるほど、石鹼水の濃度と暴露時間が関係しているのかを調べることを目的としている。また、ミジンコが遊泳阻害を起こす石鹼水の最低濃度を調べることで、遊泳阻害を調べるバイオアッセイにおける石鹼水の濃度の限界値を調べることを目的とした。

第3節 調査方法

第1項 準備物

試料：タマミジンコ（以下ミジンコと記す。）

学名：*Moina macrocopa*

小型ミジンコである。オオミジンコ、タマミジンコなどのミジンコの種類は大きさでのみで定められていて、体の構造は等しいため、遊泳についてはミジンコ（*Daphnia pulex*）と等しいと考えられる。

準備物：石鹼の原液（成分：イソプロピルメチルフェノール、エデト酸塩、香料）300mL ビーカー、マイクロピペット、シャーレ（半径 5 cm）、カメラ、蒸留水（水温 18.2℃で行った。ミジンコの最適温度に含まれる。）、パーソナルコンピューター、動画解析ソフト（Kinovea）

第2項 実験手法

- ① 300mL の蒸留水が入ったビーカーを6つ用意した。マイクロピペットで石鹼の原液をそれぞれ1.0mL、0.5mL、0.3mL、0.1mL、0.05mL、0.03mL、0.01mL 入れた。予備実験で、2.0mL/300mL と 3.0mL/300mL で行った場合、10 分後には全てのミジンコが動きを停止していたため、これらの濃度で行った。また対照実験として、蒸留水のみが入ったビーカーを用意した。
- ② ビーカーに10 匹ずつミジンコを入れた。よく動いていてかつ体長が1 mm程度のものを選んだ。
- ③ ミジンコを石鹼水に一定時間暴露させた。
- ④ 10 分後、20 分後、30 分後、40 分後、50 分後ごとに、ミジンコを蒸留水で満たしたシャーレに移して、運動の様子を動画で撮影した。ミジンコが水面に対して鉛直方向に遊泳しないようにするために、シャーレの水の高さを5mm 程度にした。蒸留水のみが入ったビーカーのミジンコ、すなわち正常なミジンコは10 分後のみ撮影した。複数あるミジンコのうち、運動しているミジンコを選んで撮影した。
- ⑤ 撮影した動画を、動画解析ソフトを用いて解析して、ミジンコの軌跡、速度、加速度を分析した。ミジンコの遊泳動画でミジンコを追跡し、ミジンコの遊泳軌跡を画像にした。また、各濃度と時刻でのミジンコの遊泳速度、加速度をグラフにした。そこで得られたデータから速度の平均値を出して、同じ暴露時間におけるミジンコの遊泳速度の平均値を散布図にした。

第4節 調査結果

第1項 軌跡について

ここでは、ミジンコの動いた軌跡にのみ着目した結果を記す。正常なミジンコは任意の方向に向かって直線的に進んでいた。進行方向を転換した場合も、その方向に向かってまっすぐ進んでいた。また、方向変換の軌跡は滑らかな曲線を描いていた。石鹼水に暴露して10 分後では1.0mL/300mL のビーカーでは、動いているミジンコがほとんどいなかった。中で動いているミジンコを抜粋して軌跡を調べたところ、時々1~2mm 程動いていたが、ほとんど動いていなかった。石鹼の体積が0.5mL のビーカーのミジンコは直線的に遊泳した後、小刻みに動き往復を繰り返していた。直線運動と小刻みに動く運動が見られた。石鹼の体積が0.3mL、0.1mL、0.05mL のビーカーのミジンコは旋回運動をしていた。旋回運動はミジンコの遊泳障害を示す動きである。0.1mL、0.3mL のミジンコは直線運動の中に部分的に旋回運動が見られ、0.05mL のミジンコは綺麗な旋回運動をしていた。旋回運動の円の直径はどれも3mm から5mm 程度で、直径の長さに差は見られなかった。石鹼の体積が0.03mL、0.01mL のビーカーのミジンコでは、旋回運動もせず曲線的な遊泳軌跡のため、石鹼に暴露された異常な遊泳軌跡は見られなかった。



図 3
正常なミジンコの軌跡

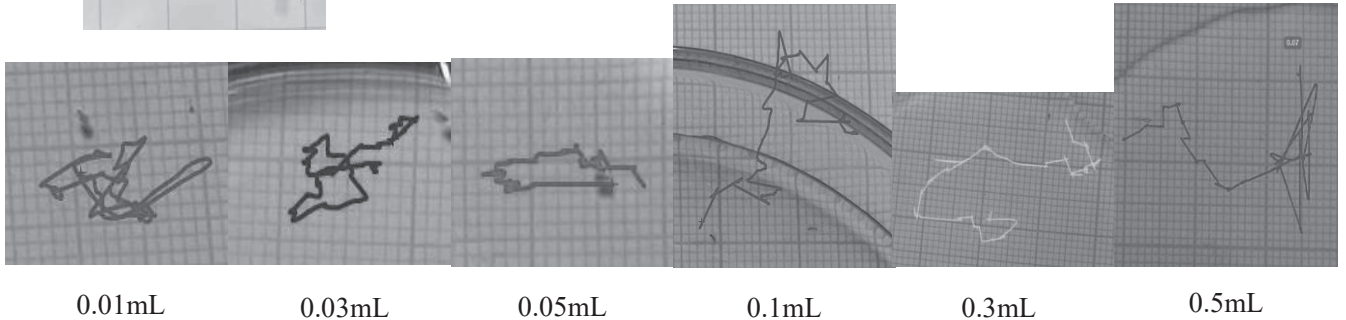


図 4 10 分後のミジンコの軌跡

20 分後では、石鹼の体積が 1.0mL のビーカーには動いているミジンコはいなかった。石鹼の体積が 0.5mL、0.3mL のビーカーのミジンコでは旋回運動が見られた。0.5mL のビーカーのミジンコでは直径が 4 mm 程度、0.3mL のビーカーのミジンコでは直径が 2.5 mm 程度だった。0.1mL のビーカーのミジンコでは、直線運動と旋回運動がどちらも見られた。旋回運動の直径は 2.5 mm 程度だった。0.01mL、0.03mL、0.05mL のビーカーのミジンコは直線的に遊泳していて、異常遊泳は見られなかった。

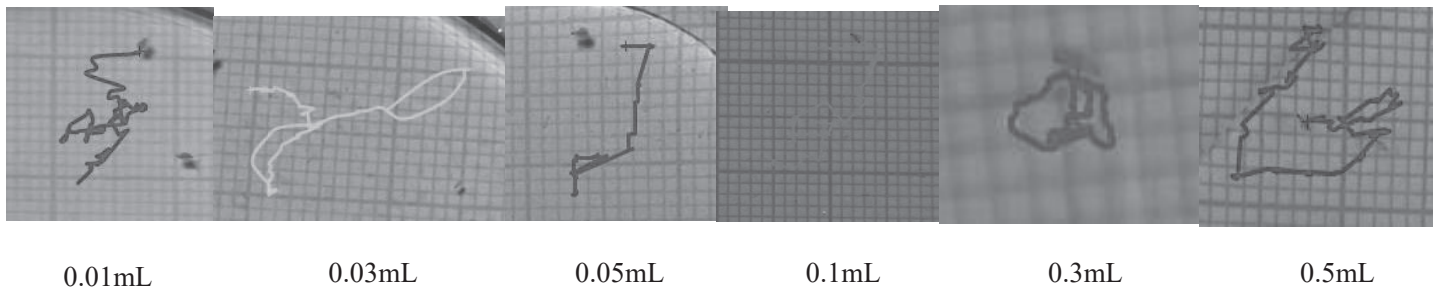


図 5 20 分後のミジンコの軌跡

30 分後では、石鹼の体積が 0.5mL のビーカーのミジンコは、小刻みに動きながら遊泳していて、遊泳経路が不規則になっていた。遊泳軌跡を見ると、正常なミジンコが描く滑らかな遊泳軌跡と比べて角ばっていた。また、0.3mL のビーカーのミジンコは直径 2 mm 程度の旋回運動を示していた。0.03mL、0.05mL、0.1mL のビーカーのミジンコでも角ばっている軌跡を描いていた。0.01mL のビーカーのミジンコでは、30 分後になり初めて角ばった軌跡を示した。全部の濃度のビーカーのミジンコが角ばった軌跡を描いていた。

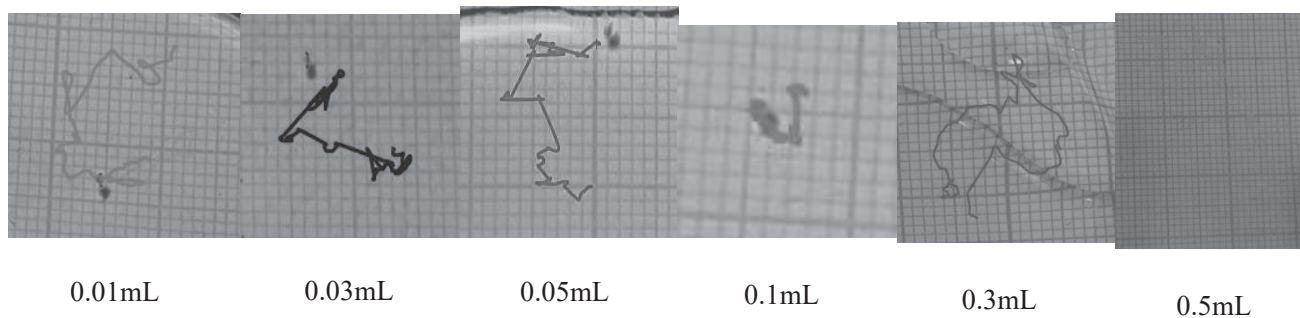


図 6 30 分後のミジンコの軌跡

40 分後でも全部の濃度のミジンコの軌跡が角ばっていた。旋回運動は 0.03mL のビーカーのミジンコで部分的に見られ、その他のビーカーのミジンコでは見られなかった。

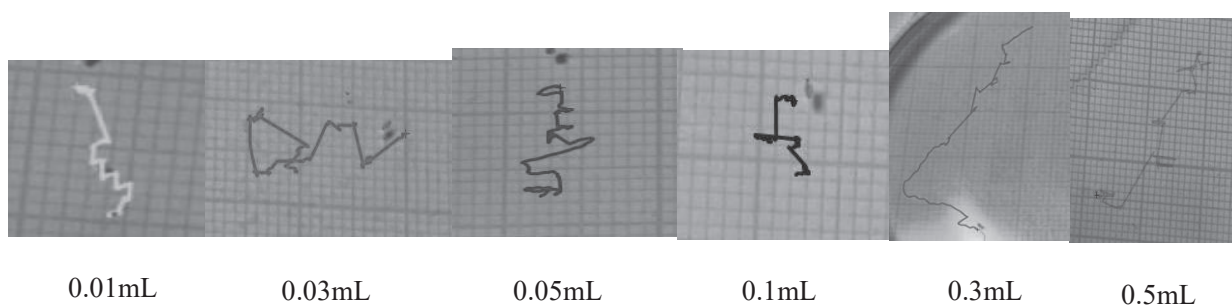


図 7 40 分後のミジンコの軌跡



50 分後では、石鹼の体積が 0.01mL のビーカーのミジンコ以外はほとんど動いていなかった。0.01mL のビーカーのミジンコは引き続き角ばった軌跡を描いていた。

図 8 50 分後の石鹼の体積が 0.01mL ミジンコの軌跡

第 2 項 速度について

グラフの縦軸は速度[m/s]、横軸は時間[ms]を表している。横軸の数字は動画における時間のため関係がない。正常なミジンコの速度の平均値は 17.766mm/s、最大値は 102.58mm/s であった。下図は正常なミジンコの速度の変化を表している。

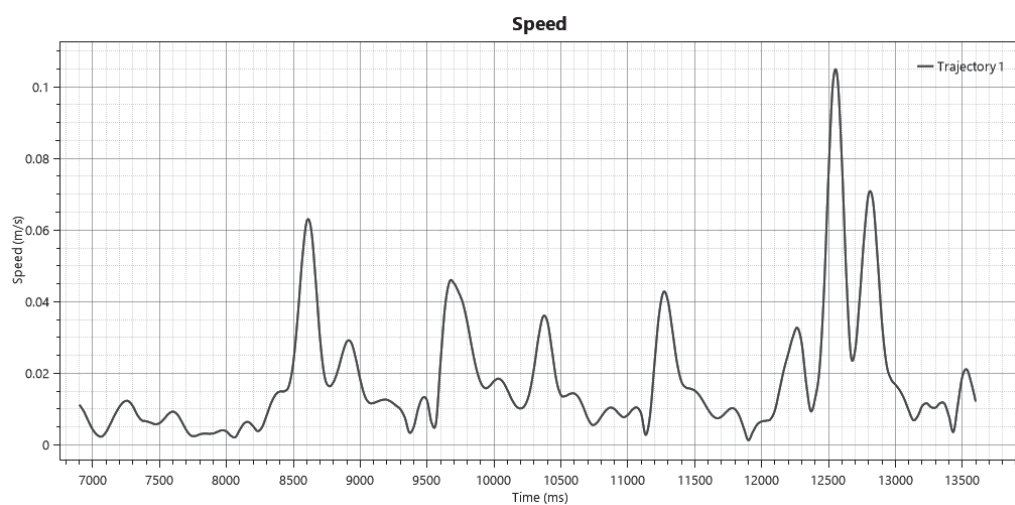


図 9

10 分後では、0.01mL のビーカーのミジンコの速度の平均値は 8.977 mm/s、0.03mL のビーカーのミジンコは 6.548 mm/s、0.05mL のビーカーのミジンコは 5.535 mm/s、0.1mL のビーカーのミジンコは 7.948 mm/s、0.3mL のビーカーのミジンコは 1.1598mL、0.5mL のビーカーのミジンコは 1.1791 mm/s、1.0mL のビーカーのミジンコは 0.4664 mm/s であった。

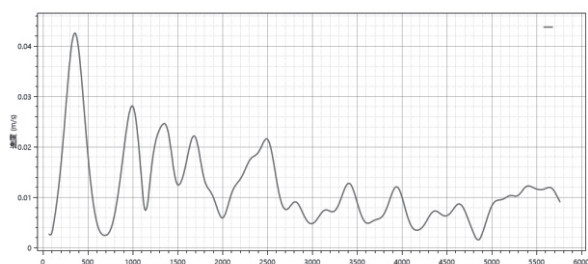


図 10 10 分後 0.5mL/300mL

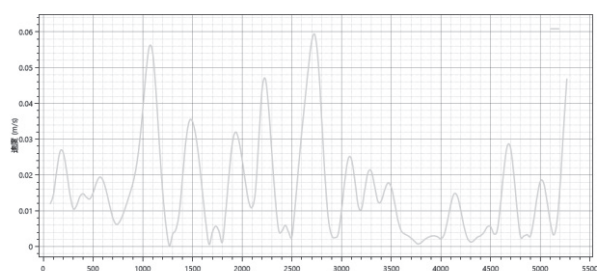


図 11 10 分後 0.3mL/300mL

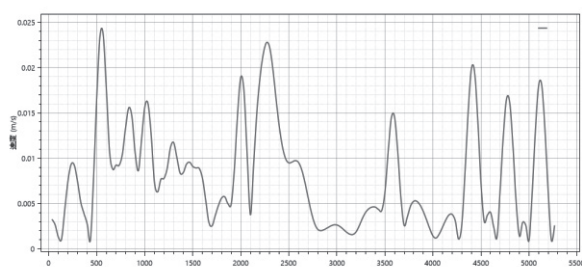


図 12 10 分後 0.1mL/300mL

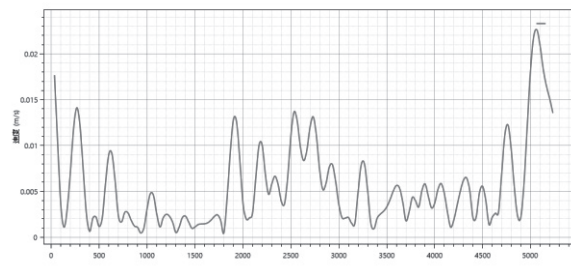


図 13 10 分後 0.05mL/300mL

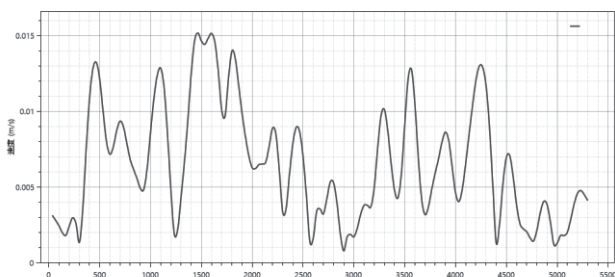


図 14 10 分後 0.03mL/300mL

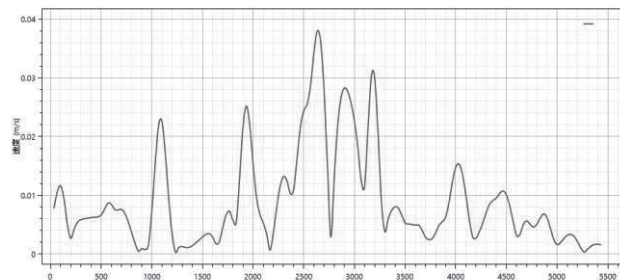


図 15 10 分後 0.01mL/300mL

20 分後では、0.01mL のミジンコが 5.685 mm/s、0.03mL は 10.234 mm/s、0.05mL は 4.648 mm/s、0.1mL は 0.78536 mm/s、0.3mL は 0.3147 mm/s、0.5mL は 0.07057 mm/s、1.0mL のミジンコは静止していた。

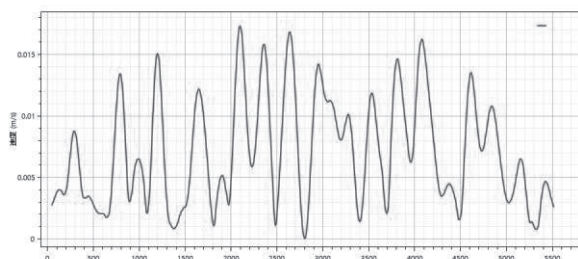


図 16 20 分後 0.5mL/300mL

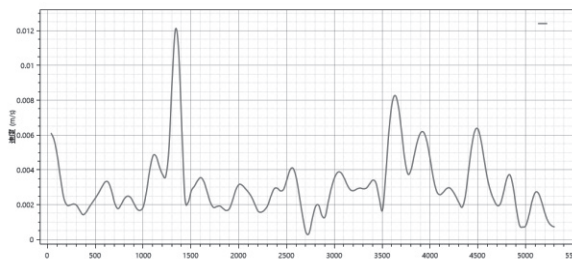


図 17 20 分後 0.3mL/300mL

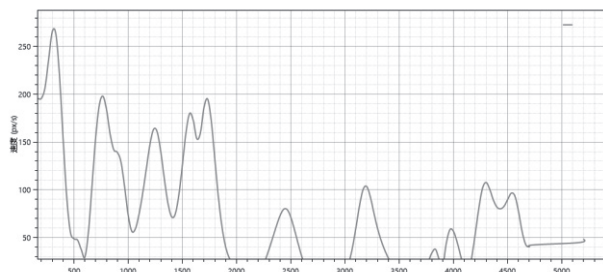


図 18 20 分後 0.1mL/300mL

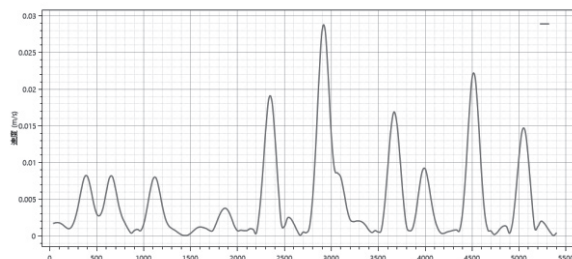


図 19 20 分後 0.05mL/300mL

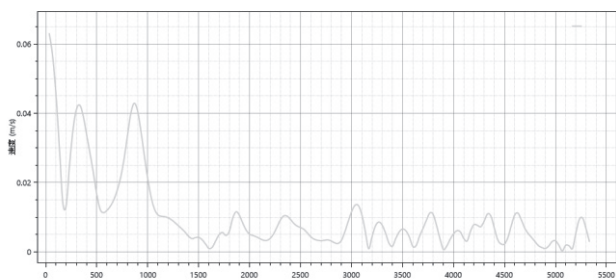


図 20 20 分後 0.03mL/300mL

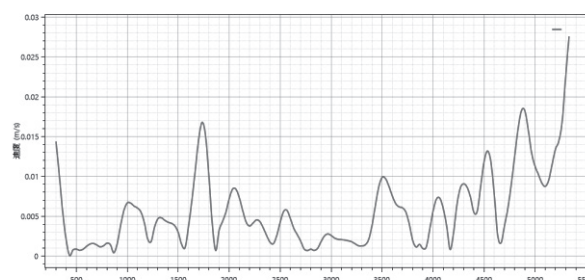


図 21 20 分後 0.01mL/300mL

30 分後では、0.01mL が 7.772 mm/s、0.03mL が 7.7264 mm/s、0.05mL が 7.7964 mm/s、0.1mL が 1.439 mm/s、0.3mL が 0.9895 mm/s、0.5mL が 0.114 mm/s であった。1.0mL のミジンコは静止していた。

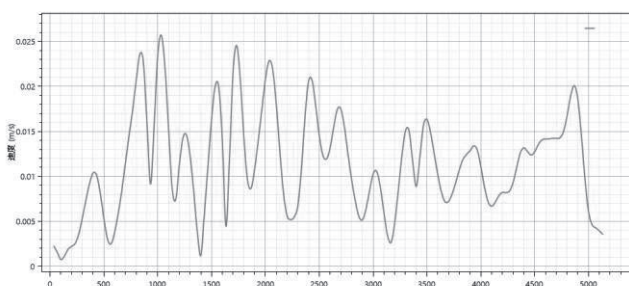


図 22 30 分後 0.5mL/300mL

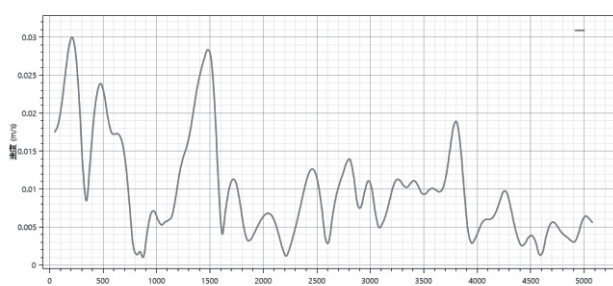


図 23 30 分後 0.3mL/300mL

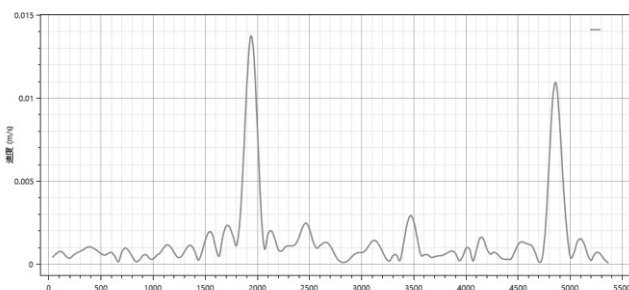


図 24 30 分後 0.1mL/300mL

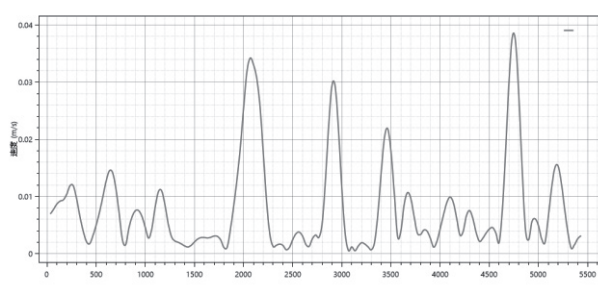


図 25 30 分後 0.05mL/300mL

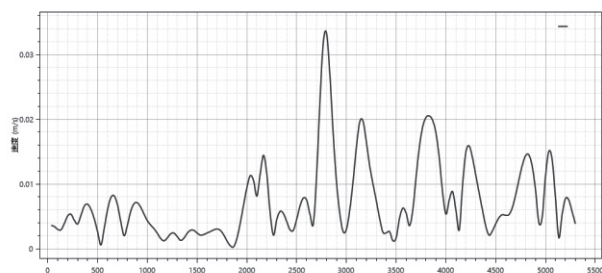


図 26 30 分後 0.03mL/300mL

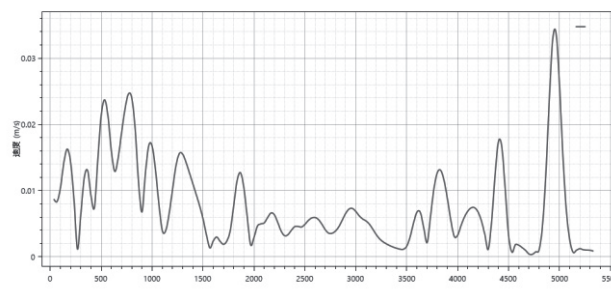


図 27 30 分後 0.01mL/300mL

40 分後では、0.01mL が 2.541 mm/s、0.03mL が 0.5137 mm/s、0.05mL が 0.4865 mm/s、0.1mL が 0.3067 mm/s であった。0.3mL、0.5mL のビーカーのミジンコが新たに静止し始めた。

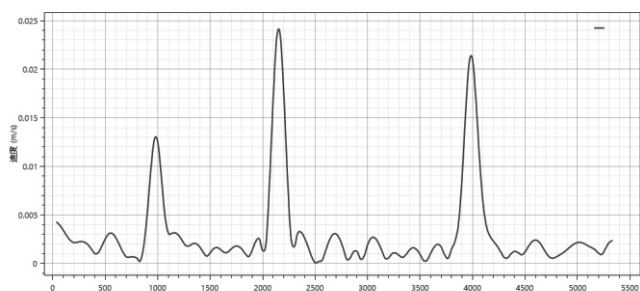


図 28 40 分後 0.1mL/300mL

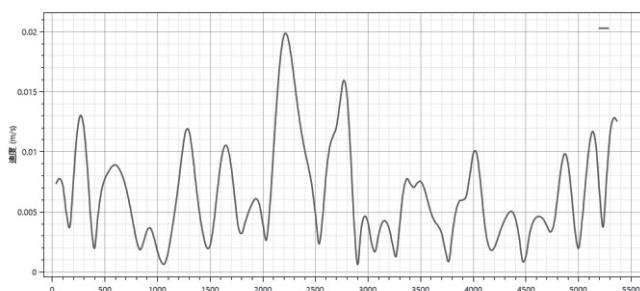


図 29 40 分後 0.05mL/300mL

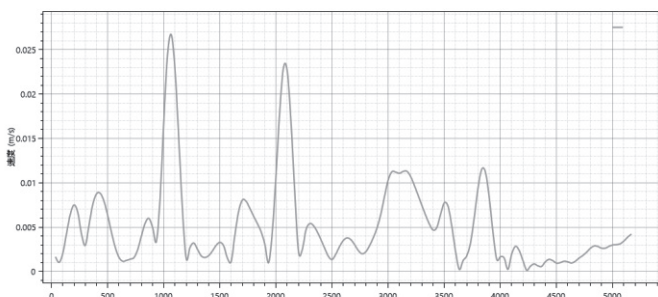


図 30 40 分後 0.03mL/300mL

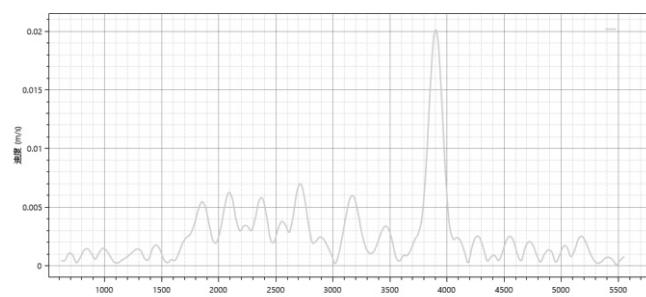


図 31 40 分後 0.01mL/300mL

50 分後では、0.01mL が 0.3672 mm/s、0.03mL が 0.121 mm/s、0.05mL が 0.0279 mm/s、0.1mL が 0.0056 mm/s、であった。引き続き 0.3mL、0.5mL、1.0mL のビーカーのミジンコは静止していた。

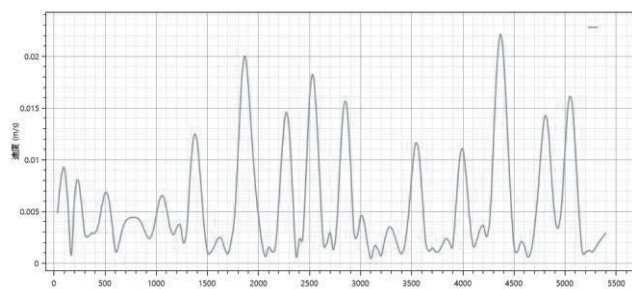


図 32 50 分後 0.1mL/300mL

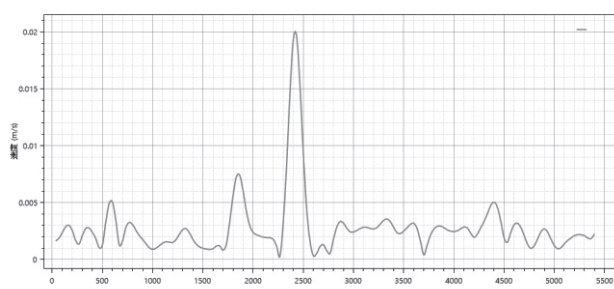


図 33 50 分後 0.05mL/300mL

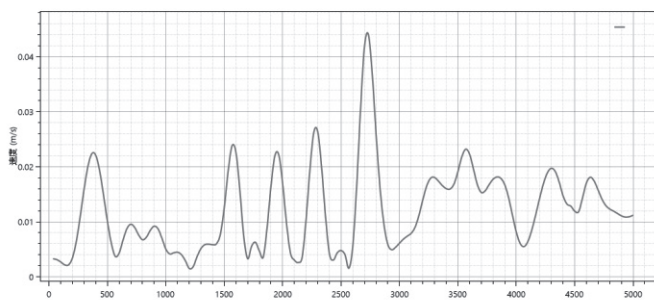


図 34 50 分後 0.03mL/300mL



図 35 50 分後 0.01mL/300mL

以下は同じ暴露時間における石鹼水の濃度とミジンコの平均遊泳速度の関係を表したグラフである。縦軸は速度の平均値(mm/s)、横軸は石鹼の濃度(石鹼の体積 mL/蒸留水 300mL)を表している。

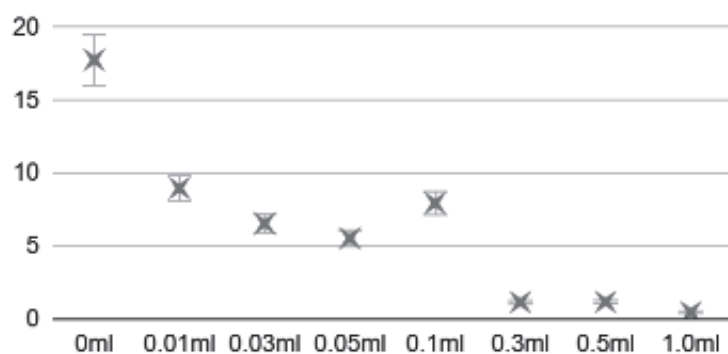


図 36 10 分後の平均速度

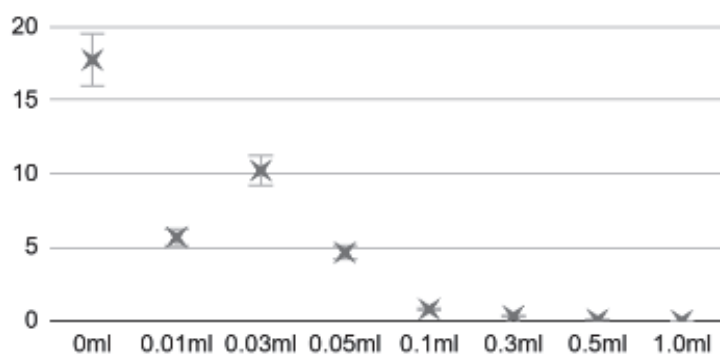


図 37 20 分後の平均速度

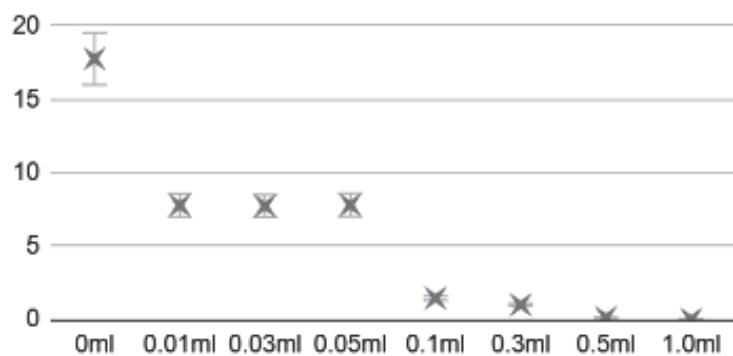


図 38 30 分後の平均速度

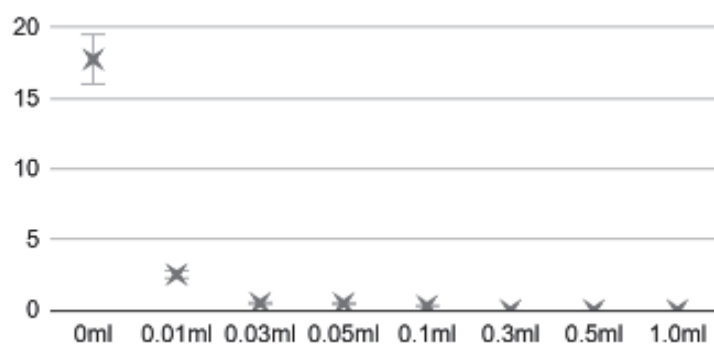


図 39 40 分後の平均速度

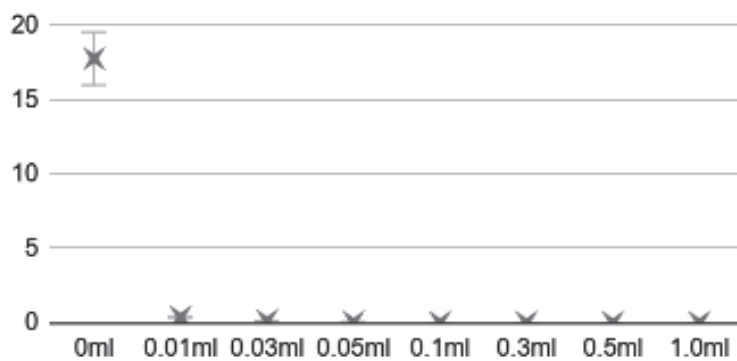


図 40 50 分後の平均速度

第 3 項 加速度について

正常なミジンコの加速度は平均値が 0.667mm/s^2 、最大値が 865.793mm/s^2 であった。

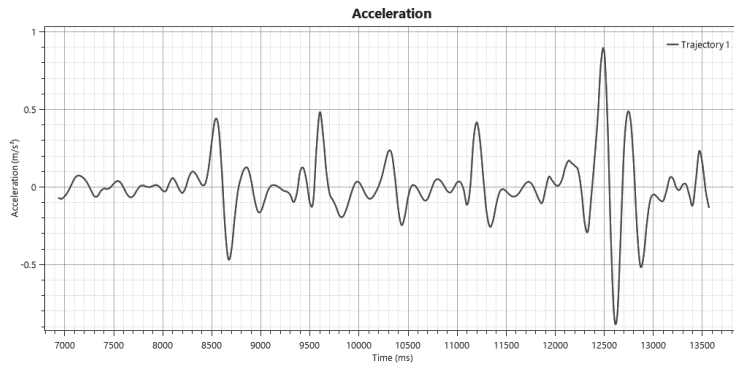


図 41

10 分後では、0.1mL/300mL の加速度の平均値が -0.096mm/s^2 、最大値が 405.278mm/s^2 であった。0.3mL/300mL では平均値が -0.003mm/s^2 、最大値が 52.169mm/s^2 であった。0.5mL/300mL では平均値が -0.022mm/s^2 最大値： 315.506mm/s^2 であった。1.0mL/300mL では平均値が -0.302mm/s^2 、最大値が 73.673mm/s^2 であった。20 分後では、0.01mL/300mL の平均値が -0.224mm/s^2 、最大値が 97.363mm/s^2 であった。0.03/300mL の平均値は -0.061mm/s^2 、最大値は 63.968mm/s^2 だった。30 分後は、0.01mL/300mL は平均値が 3.614mm/s^2 、最大値が 8.081mm/s^2 であった。

第 5 節 考察

第 1 項 遊泳障害が起きるメカニズムについて

タンパク質は、20 種類ほどのアミノ酸が多数共有結合した、いわゆるポリペプチド鎖であるが、アミノ酸の配列順序（一次構造）が持つ情報によって、らせんを組んだり（二次構造）、密に折りたたまれたり（三次構造）、またそれらが集まって独特の空間的配置を持つ集合体（四次結合）を形成したりする。固有の生物学的機能を果たすために、都合の良い構造（コンフォメーション）をとっている。このようなコンフォメーションの形成に寄与している結合および相互作用は、共有結合、水素結合、疎水性相互作用、静電的相互作用、Van der Waals 相互作用が知られている。一次構造は切断されずにこれらの結合や相互作用が切断されるとき、コンフォメーションが変化する。この反応が高 pH、すなわち塩基によって起こる（新井，2001）。石鹼の pH は 8~10 であり、石鹼に暴露されたことでミジンコのタンパク質が変性し、遊泳障害が起きたと考えられる。

第 2 項 軌跡について

暴露時間が 10 分後では、0.01mL と 0.03mL のビーカーのミジンコでは方向変換するときに曲線を描いていて、旋回運動をせず無作為の方向に泳いでいた。よって軌跡からは遊泳障害を確認できなかった。0.05mL のミジンコは旋回運動をしていて軌跡から遊泳障害が確認できた。0.1mL、0.3mL、0.5mL では、角ばっている軌跡を描いていて遊泳障害されていることが分かった。0.1mL、0.3mL のビーカーのミジンコは部分的に旋回運動をし

ていたことから、角ばった軌跡と旋回運動は毒に暴露されると同時に見られる異常な遊泳軌跡であることが分かった。これは、0.3mL のビーカーのミジンコが暴露時間 10 分のときに角ばった軌跡を描き、より毒物に曝されたその 10 分後に旋回運動を描いていたことから裏付けられた。10 分間の暴露時間で 1.0mL のビーカーのミジンコは動きを停止していたことから、この濃度では 10 分間でもミジンコの生命を脅かすものであると分かった。暴露時間が 30 分後になると、最も濃度の低い 0.01mL のビーカーのミジンコでも角ばった軌跡を描いて、全部の濃度で角ばった軌跡が見られた。40 分後でも全部の濃度で角ばった軌跡を描いて、50 分後では 0.01mL のビーカーのミジンコのみ動いて、その他の濃度のミジンコは静止していた。これらから、遊泳軌跡を観察することによって最短 10 分で遊泳阻害を確認することができ、測定可能な濃度は 0.05mL/300L（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上であることが示された。また、30 分間以上測定すると 0.01mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上の濃度によるミジンコの遊泳阻害を確認可能であることが分かった。角ばった軌跡を描く理由は第 4 項に詳細を記載しているが、ミジンコが遊泳阻害されると加速度の絶対値が大きくなり、速度の変化が激しいため曲線の軌跡を描くことができず、角ばった軌跡を描くと考えられる。

第 3 項 速度について

図 36 から図 40 から分かるように、0.01mL/300mL から 0.1mL/300mL の濃度のグループと 0.3mL/300mL から 1.0mL/300mL の濃度のグループでは、遊泳速度の平均値に大きな差が見られたことが分かった。20 分後でも 0.03mL の速度を外れ値と考えれば 0.01mL/300mL から 0.1mL/300mL の濃度のグループと 0.3mL/300mL から 1.0mL/300mL の濃度のグループで分かれていることが読み取れる。30 分後になると 0.01mL、0.03mL、0.05mL の濃度のミジンコの平均速度がほぼ等しくなった。このことから 20 分後の 0.03mL の速度は外れ値であったと考えられる。30 分後では、0.1mL の濃度のミジンコの速度が 0.01mL から 0.05mL の濃度の速度のグループから抜けて、0.3mL から 1.0mL の濃度の速度のグループに含まれた。また、40 分後には 0.03mL から 1.0mL の濃度のミジンコの速度がほとんど等しくなったと読み取れる。0.01mL のミジンコは 30 分後と比べて 2.1738 mm/s だけ遅くなった。50 分後には全部の濃度のミジンコが遊泳を停止していた。

以上から、ミジンコの遊泳速度は石鹼の濃度と比例しておらず、関係式を一次関数で示すことはできないことが明らかになった。ミジンコの遊泳速度と石鹼の濃度の関係は、ある時間まで毒に耐えられるがそれを過ぎると一気に遊泳速度が遅くなるような、階段型であると考えられる。耐えられる時間は濃度に依存しており、0.3mL、0.5mL、1.0mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）ならば 10 分、0.1mL/300mL ならば 30 分、0.03mL/300mL ならば 40 分、0.01mL/300mL は 40 分から 50 分の間であることが分かった。平均遊泳速度を比較すると、0.02mL の石鹼の体積差でも差が顕著に現れ、最短で 10 分、最大で 50 分間でバイオアッセイが可能であることが分かった。

第4項 加速度について

正常なミジンコの平均加速度は正である。すなわち、減速よりも速度が加速することの方が多し。それに対して、石鹼ありの溶液内のミジンコの加速度を比べると、30分後の0.1mL/300mL ビーカーを除いて、時間と濃度に依らず全てのビーカーのミジンコの加速度は負である。加速するためには速く第二触覚を動かさないといけないため、より体を動かすためのエネルギーが必要だが、減速するときは第二触覚を速く動かす必要がなく、体を動かすためのエネルギーがあまり必要ない。これらから、石鹼水内のミジンコの加速度が負なのは、石鹼によって体が暴露されたミジンコは、より速く第二触覚を動かすことが難しいため、加速よりも減速の方が多かったからだと考えられる。

10分後では、0.1mL/300mL、0.3mL/300mL、0.5mL/300mL のミジンコの加速度に差はあまり見られなかったが、1.0mL/300mL のミジンコの加速度は -0.302mm/s^2 であり、他の3つと比べると絶対値が圧倒的に大きかった。つまり、石鹼の濃度が最も高いビーカーのミジンコは、急激に減速することが分かる。また、0.1mL/300mL のミジンコの10分後と20分後の加速度を比較すると、値はそれぞれ -0.096mm/s^2 、 -0.224mm/s^2 であり、時間が経過したことによって加速度が小さくなっていることが分かる。さらに、30分後の0.1mL/300mL のミジンコの加速度は 3.614mm/s^2 であり、正常なミジンコの加速度である 0.677mm/s^2 に比べるとはるかに大きいことが分かる。よって、石鹼の濃度が高かったり、時間が経ったりして、ミジンコの遊泳障害率が上がると、加速度の絶対値が大きくなる。これは、石鹼によってミジンコは正常な遊泳ができなくなり、速度の変化が激しくなったからだと考えられる。正常なミジンコは速度の変化が少ないため、滑らかな動きができると考えられる。それに対して、遊泳障害後は加速度の絶対値が大きい、すなわち一定速度で遊泳することができなくなっていた。よって、急発進したり急停止したりすることで、遊泳軌跡も角ばっていると考えられる。

第3章 石鹼によるミジンコの採餌阻害に関する実験

第1節 本調査の概要

ミジンコの餌である植物プランクトンのクロレラを使って、石鹼によるミジンコの採餌阻害率について調べた。(石鹼の体積) / (蒸留水の体積) が 0.1mL/300mL、0.3mL/300mL、0.5mL/300mL、1.0mL/300mL となる 4 つのビーカーに、クロレラを 0.5mL ずつ入れた。1 時間後のそれぞれのビーカー内の溶液の吸光度、すなわちクロレラの濃度をスペクトロメーターで測り、ミジンコの採餌阻害率について調べた。対照実験として、石鹼が入っていない同濃度のクロレラ水にミジンコを入れ、同様に吸光度を測定した。また、ミジンコの採餌阻害率が分かりやすいように、(クロレラの体積) / (蒸留水の体積) = 0.5mL/300mL でミジンコと石鹼を入れていない溶液の吸光度も測定した。

第2節 調査目的

本実験では、スペクトロメーターを用いてクロレラ水の吸光度の違いを調べることで、石鹼の濃度の違いによるミジンコの採餌阻害率の違いについて調べた。吸光度はどの波長の光がどれだけ吸収されたかを表すので、吸光度を 1 つの数字でまとめて表すことはできない。したがって、石鹼の濃度の違いによる各波長の光の吸光度の差に注目すべきである。そのため、吸光度のグラフは、各石鹼の濃度で測定された吸光度のグラフを重ねて表した。分光光度計は、透明なセル（入れ物）に特定の液体を入れて、それが特定の波長の光を通し、光がセルの向こう側に辿り着いた時に光の量がどのくらい減っているかを表す機械である。吸光度が高ければ、透過率が低いことを表す。すなわち、クロレラ水の濃度が高く、ミジンコは餌のクロレラをあまり食べていないことが分かる。逆に吸光度が低ければ、透過率が高く、クロレラ水の濃度が低いため、ミジンコがクロレラをよく食べたことが分かる。

第3節 調査方法

第1項 準備物

試料：タマミジンコ

学名：*Moina macrocopa*

タマミジンコは小型ミジンコであり、採餌に関してはミジンコ (*Daphnia pulex*) と等しい。

準備物：スペクトロメーター (GDX-SUISPL)、クロレラ、300mL ビーカー、蒸留水、マイクロピペット

第2項 実験手法

- ① ビーカーを5つ用意して、それぞれに蒸留水 300mL 入れた。
- ② クロレラをビーカーにそれぞれ 0.5mL ずつ入れて、濃度が均一になるようにかき混ぜた。
- ③ ピペットで石鹼の原液をそれぞれ 1.0mL、0.5mL、0.3mL、0.1mL 入れた。対照実験として、5つ目のビーカーには石鹼を入れていない。
- ④ ミジンコを 30 匹ずつ入れて放置した。
- ⑤ 1 時間後に、分光光度計を用いてそれぞれのビーカーの吸光度を測定した。
- ⑥ ビーカーに 300mL の蒸留水と 0.5mL のクロレラを入れて、よくかき混ぜた。分光光度計を使ってこの溶液の吸光度を測定し、結果を比較しやすいようにした。

第4節 調査結果

光の色は波長の長さによって決まっている。可視光線は、波長が 380nm～770nm の範囲にある電磁波である。人が目で知覚できる波長であり、紫 (380-430 nm)、青 (430-490 nm)、緑 (490-550 nm)、黄 (550-590 nm)、橙 (590-640 nm)、赤 (640-770 nm) として認識される。赤外線は、波長が 770nm～1mm の範囲にある電磁波、紫外線は、波長が 10nm～380nm の範囲にある電磁波である (光学技術の基礎用語 (www.optics-words.com), 2024)。

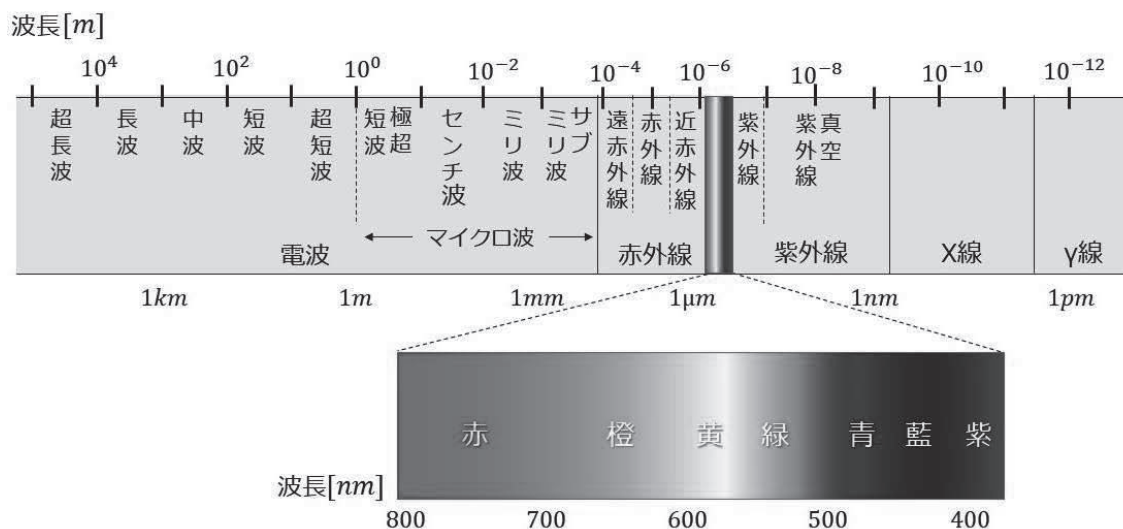


図 42

- 以下のグラフでは、縦軸が吸光度、横軸が光の波長[nm]を表している。
- ・クロレラ 0.5mL と蒸留水 300mL のみのビーカーの吸光度

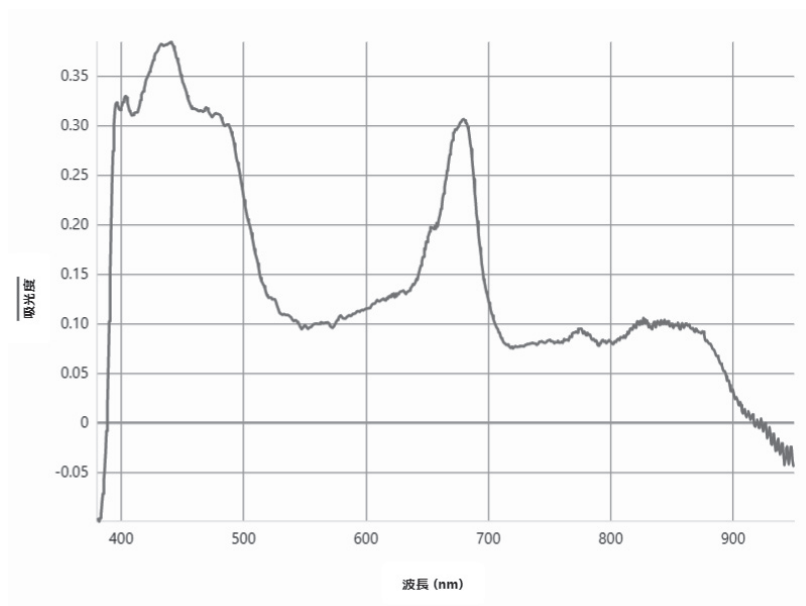


図 43

- ・石鹼の濃度の違いによるクロレラ水の吸光度の違い

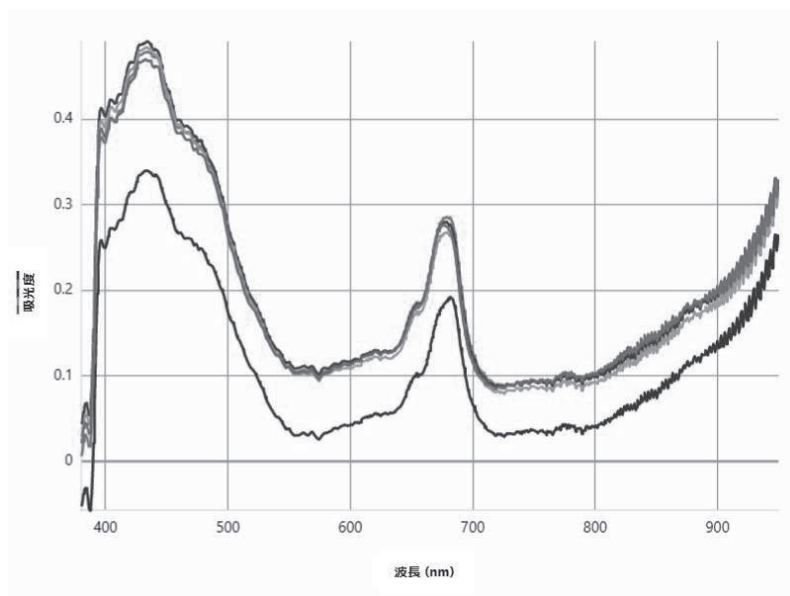


図 44

水色の曲線：1.0mL/300mL
青色の曲線：0.5mL/300mL
黄色の曲線：0.3mL/300mL

ピンク色の曲線：0.1mL/300mL

紫色の曲線：石鹼なし

図 43 と図 44 を比べると、(クロレラの体積) / (蒸留水の体積) = 0.5mL/300mL のクロレラ水の吸光度と石鹼とミジンコを入れたクロレラ水またはミジンコのみを入れたクロレラ水の吸光度を表したグラフは、波長 380 nm～800 nm間では、概形は類似していた。吸光度の極大値と極小値を取る光の波長はどの曲線でもほとんど等しいことが分かった。波長 800 nm以上の吸光度に着目すると、クロレラ水のみでは 800 nm～870 nm間では吸光度がほぼ一定で、870 nm以上では右肩下がりである。それに対して、ミジンコを加えたクロレラ水では、波長 800 nm以上の吸光度はどれも右肩上がりであった。また、石鹼とミジンコを加えたクロレラ水の吸光度とクロレラ水の吸光度を比較すると、石鹼とミジンコが加えられたクロレラ水の吸光度の方が小さくなっていた。

図 44 で吸光度が最大である波長が 432nm で比べると、吸光度が高い順に、0.5mL/300mL の吸光度が 0.489、0.3mL/300mL が 0.484、0.1mL/300mL が 0.478、1.0mL/300mL が 0.470、石鹼なしのビーカーの吸光度は 0.340 となった。石鹼の濃度の違いによる吸光度の差は 0.005～0.008 である。しかし、吸光度が最大である 0.5mL/300mL と石鹼なしを比べると、吸光度の差は 0.149、石鹼ありの中で最も吸光度が小さかった 1.0mL/300mL と比較しても、吸光度の差は 0.130 であった。したがって、石鹼ありとなしでは吸光度に大きな差があることが分かった。また、2 番目に大きい極大値をとる波長 679.4 nmで比較すると、吸光度が高い順に、0.1mL/300mL で 0.284、0.5mL/300mL で 0.278、1.0mL/300mL で 0.273、0.3mL/300mL で 0.266、石鹼なしでは吸光度が 0.187 となった。0.1mL/300mL、0.5mL/300mL、1.0mL/300mL 間では、差は非常に小さかった。しかし、やはり石鹼ありとなしを比較すると、石鹼なしのビーカーの吸光度が圧倒的に小さいことが分かった。石鹼の濃度に注目すると、石鹼の濃度が高ければ高いほど吸光度も大きくなるとは言えず、光の波長によって様々であった。

第 5 節 考察

図 43 と図 44 から、(クロレラの体積) / (蒸留水の体積) = 0.5mL/300mL のクロレラ水の吸光度を表したグラフと同濃度のクロレラ水に石鹼とミジンコを加えた溶液の吸光度のグラフの概形が、380 nm～800 nm間で近似して、吸光度の極大値と極小値を取る光の波長はほとんど等しいことが分かった。このことから、ミジンコと石鹼を加えた場合も、その溶液が吸収しやすい可視光線の光と吸収しにくい可視光線の光は変わらないことが分かる。この下でクロレラ水と、石鹼とミジンコを加えたクロレラ水の同波長の光の吸光度を比較すると、石鹼を加えた場合もミジンコの採餌活動によって吸光度は小さくなったと考えられる。これは、ミジンコは石鹼によって採餌阻害されるものの、全く餌を食べなくなった訳ではないことを示唆している。

次に、図 44 の曲線同士を比較すると、石鹼ありと石鹼なしのクロレラ水の吸光度の差は、石鹼の濃度の違いによる吸光度の差よりも、はるかに大きいことが読み取れる。これは、(石鹼の体積) / (蒸留水の体積) = 0.1mL/300mL という石鹼が微量であったとしても、ミジンコが餌を食べることに大きな影響を与えることを表している。採餌阻害が起こ

る要因として2つ考えられる。1つ目は、石鹼によってミジンコの遊泳が阻害されたことだ。ミジンコは餌を見つけて自ら餌の方へ泳いで行くのではなく、泳ぎながら水を口から飲み込み、櫛のような毛をもつ第3胸脚と第4胸脚を使って植物プランクトンなどの生物をこし集めて食べている。だから、石鹼によってミジンコが泳がなくなったまたは、泳ぐ速さが遅くなったため、水を身体に流し込むことができずクロレラをこしとることができなくなったと考えられる。2つ目は、石鹼を取り込んでしまったため、ミジンコの器官の機能が衰えてしまったことである。最初は正常に泳いでいたが、その際に石鹼を体内に取り込んでしまい、消化器官の機能が低下してしまったと考えられる。

続いて、石鹼の濃度の違いによる吸光度について考察する。0.2mL 程度の石鹼の体積の違いで、吸光度に大きな差があるとは結論付けられなかった。また、石鹼の濃度と吸光度の関係を明確に決めることは困難であった。これは、石鹼の数 mL の違いでミジンコの採餌阻害率にあまり差は見られないことを意味している。

第4章 結論

第1節 まとめ

ミジンコの遊泳阻害率を調べる実験から、石鹼のわずかな体積の違いでも、軌跡と速度、加速度共に変化が明白に現れた。軌跡は直線的に動く→旋回運動、角ばった軌跡のように変化することが分かった。遊泳軌跡を観察することによって最短10分で遊泳阻害を確認することができ、測定可能な濃度は0.05mL/300L（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上であることが確認された。また、30分間以上測定すると0.01mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）以上の濃度によるミジンコの遊泳阻害を確認可能であることが分かった。遊泳速度の変化は、ある時間まで毒に耐えられるがそれを過ぎると一気に遊泳速度が遅くなるような、階段型であると考えられる。耐えられる時間は濃度に依存しており、0.3mL、0.5mL、1.0mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）ならば10分、0.1mL/300mLならば30分、0.03mL/300mLならば40分、0.01mL/300mLは40分から50分の間であることが分かった。平均遊泳速度を比較すると、0.02mLの石鹼の体積差でも差が顕著に現れ、最短で10分、最大で50分間でバイオアッセイが可能であることが分かった。また、濃度は最も低くて0.01mL/300mL（石鹼の体積/蒸留水の体積）まで検定可能であることが分かった。加速度は濃度が高くなればなるほど、暴露時間が長くなればなるほど、減速が多く絶対値が大きくなることが分かった。これは角ばった遊泳軌跡を描く要因でもあると考察できる。

採餌阻害に関する実験では、石鹼の濃度の違いによる大きな差はなかった。しかし、石鹼ありとなしでは、ミジンコが食べた餌の量に大きな差があった。よって、完全に無毒化したかどうかの確認には有効だと考える。これは1時間で測定可能である。

これらから、石鹼の微量な体積の差に着目した毒性評価をしたい場合は、遊泳解析を行い、完全に石鹼を取り除くことができたかを確認したい場合は、スペクトロメーターを用いて吸光度を測り、ミジンコの採餌阻害率について調べる手法が有効であると結論付けた。遊泳解析も採餌阻害率について調べる手法も所要時間が最大で1時間程度であり、短時間でバイオアッセイが可能であることが分かった。また、ミジンコは容易に繁殖するので、入手しやすい指標生物であると考えられる。以上から、ミジンコによる生活排水のバイオアッセイは効率的で有用な方法であると結論付けた。

第2節 今後の展望

今後の研究では、実験回数をより増やして、バイオアッセイによって得られたミジンコの遊泳阻害率、採餌阻害率から毒の強さを逆算できる関数を導きたいと考えている。また、pHが異なる他の毒物でも実験したい。CODとBODを使う化学的毒性検査も行い、その結果とバイオアッセイの結果と比較して類似点と相違点を見つけ、化学的毒性検査とのバイオアッセイの特異性を示すことで、ミジンコのバイオアッセイの汎用性を高めたい。

謝辞

論文執筆に際して助言をいただいた指導教員である樋口真之輔先生、兎本博介先生に感謝いたします。

参考文献

- ・東京都環境局|生活排水対策について (www.kankyo.metro.tokyo.lg.jp) .2024 年 12 月 20 日時点
- ・水浄化フォーラム—科学と技術—|生活排水の概況 (<http://water-solutions.jp/>) .2024 年 12 月 20 日時点
- ・日本石鹼洗剤工業会 | 安全と環境
(https://jsda.org/w/02_anzen/senzai_anzensei_03.html) .2025 年 1 月 28 日時点
- ・田村生弥、山本裕史『防菌防黴剤の河川環境中における生分解・光分解と底質への吸着』.(2012).
- ・楠井隆史『環境管理におけるバイオアッセイの役割』.(2000).
- ・国立研究開発法人 | 国立環境研究所 | 生態毒性試験 (バイオアッセイ) の必要性和役割 (www.nies.go.jp) .2024 年 1 月 7 日時点
- ・国立研究開発法人 | 国立環境研究所 | アーカイブ集 | 01 ミジンコが教えてくれる世界 (www.nies.go.jp) .2024 年 1 月 7 日時点
- ・CE Goulden 『Procedures and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioassay』.(1982).
- ・青山勲、羅榮、岡村秀雄『ミジンコの運動量解析による有害化学物質のモニタリング』.(1997).
- ・釜谷美則、横田雅世、長島珍男『ミジンコの採餌阻害による短時間毒性検査』.(2004).
- ・Rosana B. Sotero-Santos 『Evaluation of water treatment sludges toxicity using the *Daphnia* bioassay』.(2005).
- ・(www.pref.kanagawa.jp) .2025 年 1 月 27 日時点
- ・新井健一『水産動物筋肉タンパク質の変性と制御 (総説)』.(2002).
- ・光学技術の基礎用語 | 光学の基礎 | 光の波長(www.optics-words.com),2024 年 1 月 20 日現在
- ・花里孝幸『ミジンコが教えてくれること』.サイエンス・アイ新書.(2013).
- ・Donald J Baird 『The *Daphnia* bioassay : a critique』.(1989).
- ・Carlos Barata 『Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field』.(2007).
- ・Gustavo D. Bulus Rossini, Alicia E. Ronco 『Acute toxicity bioassay using *Daphnia obtusa* as a test organism』.(1996).
- ・Juan Carlos Sánchez-Meza,Víctor Francisco Pacheco-Salazar,Thelma Beatriz Pavón-Silva,Víctor Guadalupe Guiérrez-García,Clemente De Jesús Avila-González &Patricia Guerrero-García 『Toxicity assessment of a complex industrial wastewater using aquatic and terrestrial bioassays』.(2007).
- ・Dmitry Kirsanov, Evgeny Legin, Anatoly Zagrebin, Natalia Ignatieva, Vladimir Rybakin, Andrey Legin 『Mimicking *Daphnia magna* bioassay performance by an electronic tongue for urban water quality control』.(2004).
- ・Christian Ritz, Jens C. Streibig 『Bioassay Analysis Using R』.(2005).

- C. R. Janssen, G. Persoone 『Rapid toxicity screening tests for aquatic biota 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*』 .(1993).