

単細胞緑藻クラミドモナスを用いた水質評価手法の検討

A Study on Method of the Water Eco-toxicity Assay Using Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*

田 中 仁 志

Hitoshi TANAKA

要 旨

本研究は、藻類（単細胞緑藻クラミドモナス）を用いて水質評価手法の確立を目的として行った。非イオン界面活性剤の一種ノニルフェノールエトキシレート、外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の疑いがあるとされるアルキルフェノール類、ビスフェノールAなど、化学物質に対するクラミドモナスの影響評価時間と半数増殖影響濃度（IC₅₀）を求めた。

その結果、IC₅₀を判定する培養時間は、32時間（32h-IC₅₀）が最適であることが分かった。ノニルフェノールエトキシレートは、エトキシ基の重合度の増加に伴ってIC₅₀が高くなり、一方、アルキルフェノール類は、アルキル基の炭素数の増加に伴ってIC₅₀が低下することが明らかになった。

以上のことから、本手法は、簡易なバイオアッセイによる評価手法として有望であることが分かった。

1 はじめに

平成8年4月、埼玉県飯能市の水道水が泡立ち、10分以上も消えないといった内容の記事が新聞各紙に掲載された。原因は、工場の排水中に含まれていた非イオン界面活性剤による水道水源汚染であった。住民の間では、この非イオン界面活性剤の健康への影響に対する不安が高まった。

河川水中には、このように人為的汚染による法的未規制物質を含めて、さまざまな化学物質が混在しており、化学的手法でそれらすべての化学物質を分析・監視することは、労力・費用等の理由で限界がある。特に、生物に対する毒性が未知な化学物質や、二つ以上

の化学物質が組み合わさると相乗作用によって毒性が強くなるものもある。こうした背景から、環境汚染物質の生態毒性を視野に入れた水質モニタリングには、それらに対する生物の応答を利用した評価方法（バイオアッセイ）が有効である。

近年、魚類や貝類などの野生高等動物の形態異常が報告され、内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の生態系に及ぼす影響が懸念されるようになったが、藻類に関する報告は少なく、環境ホルモンの影響について不明な点が多い。藻類は、水圏生態系において一次生産者として重要な位置を占めるため、生物試験の材料として注目され、セテナストラム¹⁾⁻⁴⁾やササビノリ⁵⁾⁻⁷⁾などが使われてきた。本研究では、2本の等長な鞭毛

を持つことから鞭毛形成や運動の研究や、暗所でも生育が可能（混合栄養）なことから光合成の研究などさまざまな分野で広く使われている単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を供試生物として、主に環境ホルモンの疑いのある物質の増殖阻害作用を調べ、その結果をもとにバイオアッセイに適用するための検討を行った。

なお、クラミドモナスを用いた水質評価手法の検討は、簡単な装置（省コスト）で、場所をとらず（省スペース）、誰でも簡単に、短時間（省労力）で評価可能な、簡易な方法であることを重視した。

2 実験材料および実験方法

2・1 供試藻類および評価方法の検討

本研究は、クラミドモナスの野生株（BIU-90, plus mating type(mt⁺), 富山大学より分譲された）を試供藻類とした。その主な特徴は、次のとおりである。

- (1) 2本の等長な鞭毛を使って泳ぎ回るため、鞭毛の構造^{8,9)}や運動¹⁰⁾に関する研究が可能
- (2) 走光性がある
- (3) 混合栄養（炭素源があれば光が不要）のため、光合成能¹¹⁾に関する実験が可能
- (4) 通常単相体生活をするため、突然変異体を分離しやすい
- (5) 細胞分裂周期が比較的短い（5～6時間度）、短時間で分裂機構への影響が評価できる
- (6) 有性生殖を利用し、遺伝的解析や生殖への影響に関する研究が可能
- (7) 細胞が大きい（約10μm）ため、顕微鏡で細胞の形態を観察しやすい

このような特徴から、クラミドモナスは、さまざまな視点から、毒性物質の影響評価に利用可能な単細胞緑藻である。本研究では、簡便な方法で評価が可能な（5）の増殖能に着目し、増殖阻害試験を行うこととした。あらかじめ、分光光度計（株島津製作所製・UV-120-02）で660nmにおける透過率¹²⁾と細胞密度の関係を調べたところ、良い相関が得られた（図1）ことから、透過率の変化を細胞密度の変化として捉えた。

2・2 試験物質の検討および調製

本研究で実験に用いた試験物質およびその特徴¹³⁾⁻¹⁶⁾は、次のとおりである。

ノニルフェノールエトキシレート（NPEO：避妊

フィルム、国内製薬会社製；Igepal CO-210・520・720・890・990, ALDRICH社製）・・・非イオン界面活性剤。自然界では、生分解によりノニルフェノール（NP：APsのうち、アルキル基の炭素数が9つのもの、図2）が生成^{17,18)}される。また、避妊フィルムには殺精子剤としてNPEOが50mg含有されている。

アルキルフェノール類（APs：表1参照）・・・プラスチック類の酸化防止剤、界面活性剤の原料およびその分解生成物。アルキル基がC5～C9のものはエストロゲン様作用をするとされる。

ビスフェノールA（BPA：和光1級, 和光純薬製）・・・缶詰の内側の被覆に使われているポリカーボネート樹脂および界面活性剤の原料

17β-エストラジオール（β-Estradiol, 生化学用, 和光純薬製）・・・女性ホルモンの一種

これらの試験物質は、蒸留水またはエタノール（Ethanol1000, 残留農薬試験用, 和光純薬製）を用いて、BPAは0.01～50mg/ℓ、APsは0.01～100mg/ℓ、NPEOは1～1,000mg/ℓ、17β-エストラジオールは0.0165～66mg/ℓの範囲で、それぞれ数段階の濃度に調整した。なお、避妊フィルムおよびIgepal CO-890, 990（水溶性NPEO）の水溶液は、0.2μmメンブレンフィルター（アドバンテックDISMIC-25CS）でろ過滅菌し、前述の水溶性NPEOを除く物質を溶解したエタノール溶

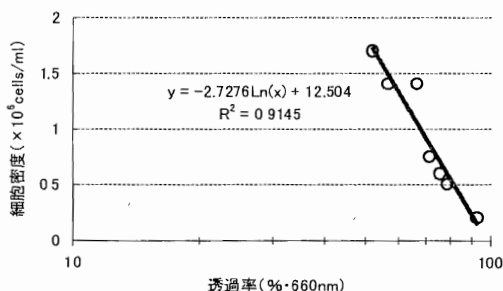


図1 クラミドモナスの細胞密度と660nmにおける透過率の関係

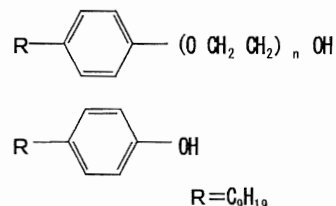


図2 ノニルフェノールエトキシレート（NPEO，上）とノニルフェノール（NP，下）の構造式 NPEOのnは、重合度によって異なる

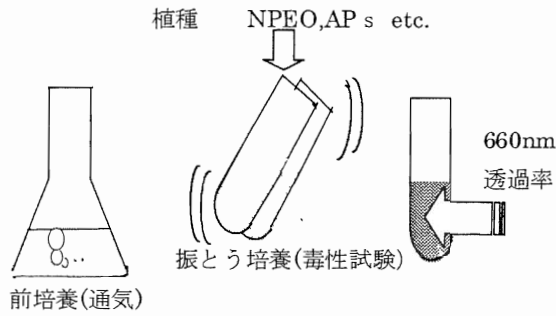


図3 増殖阻害試験の実際

液および対照区のエタノールは、滅菌処理をせず、そのまま実験に使用した。

2・3 試供藻類の培養と試験手順

クラミドモナスの培養は、SGI培地¹⁹⁾にSodium Acetate Trihydrateを1g/l添加した培地を用い、室温、白色蛍光灯連続照明下で行った。実験は、まず、前培養として300ml三角フラスコ中で通気培養を行い、淡黄緑に色づいた対数増殖期(0.6~1.2×10⁶cells/ml)のクラミドモナスを1mlずつ、あらかじめ5mlの培地を入れた試験管(パイレックス製・18×180mm)に分注したものを各濃度につき、3本ずつ(n=3、ただし、一部のAPsについては、n=1~2)用意した。この試験管中の6mlの培地に、所定の濃度になるよう試験物質を100μl(避妊フィルムは、NPEO含有量が少ないため666μl)添加し、対照には、同量の滅菌蒸留水もしくはエタノールを添加し、試験培地とした。なお、試験物質の添加による総体積の増加(6.0→6.1ml)に伴う濃度変化は無視した(避妊フィルムを除く)。次に、試験管を振とう器(東京理化学器械株式会社・MMS-300)を用いて、135rpmで振とう培養し、分光光度計で660nmにおける透過率を一定時間おきに測定した(図3)。その際、クラミドモナスが均等に混ざるように、試験管の底部を弾くようにして、よく攪拌した。実験に供する試験管は、エタノールで洗浄したものを使用し、培地等は、オートクレーブ(121℃・15min)で滅菌した。標準物質の添加等の操作は、無菌的に行った。

2・4 影響評価方法

試験物質のクラミドモナスに対する影響評価は、半数増殖阻害濃度(50% Growth Inhibiting

Concentration, IC₅₀)を用いた。

増殖率は、t時間後の対照区が常に100%になるように次式より求め、IC₅₀は、生態毒性統計処理ソフト(EcoTox-Statics Release1.1)²⁰⁾で算出した。

$$\text{増殖率}(\%) = [1 - (\text{対照区の透過率の変化量} \times 1(\%) - \text{試験区の透過率の変化量}(\%)) / \text{対照区の透過率の変化量}(\%)] \times 100$$

3 結果と考察

3・1 暴露時間の検討

クラミドモナスの増殖に伴う培地の660nmにおける透過率の変化の例を図4に示す。対照区では、実験開始時に95~92%程度であった透過率は、経時的に減少し、32時間後には60%程度になるものもあり(図4・NPEO)、これ以後、沈殿する(対数期から定常期に入ったと思われる)細胞が目立つようになった。さらに、透過率は、50%程度まで減少したが、沈殿細胞中には死細胞も多くなり、透過率の測定ではこれらの

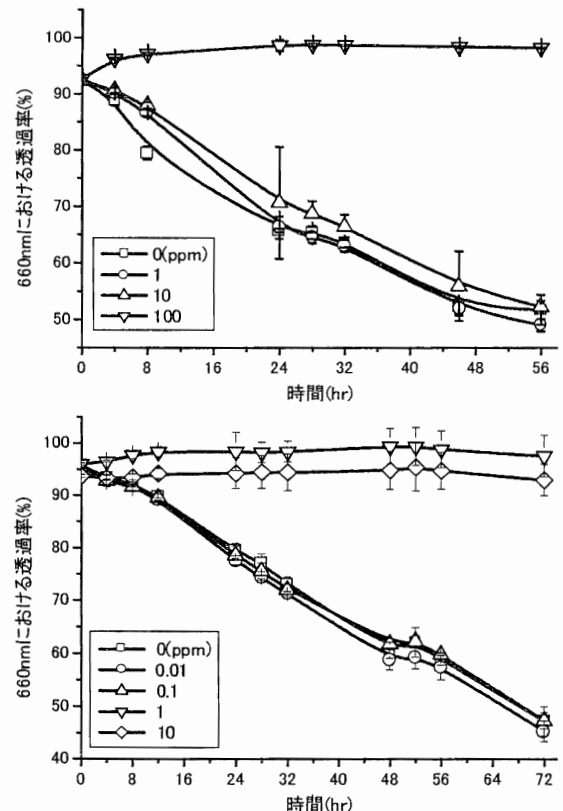


図4 NPEO(上)およびNP(下)添加後の各濃度別の660nmにおける透過率の経時変化(平均±SD, n=3)。横軸は添加後からの時間を表す。

※1: 透過率の変化量は、実験開始時の透過率aが、t時間後にはbになったとすると、(a-b)/a×100(%)で表すことができる

細胞も含まれるため、32時間以降の評価は不適切と考えた。一方、実験開始4～8時間後には、すでに微妙ではあるが、実験区と試験区の間で培地の色の変化を肉眼で確認することができた。また、図4のNPの対照と0.01, 0.1, 1ppmの実験区において、透過率の変化が有意なものか検定 (P=0.05) を行った。実験開始時には、それぞれ有意な差はなかったが、4時間後には、対照, 0.01, および0.1ppmと1ppmの試験区との間に有意差を生じた。つまり、4時間後には、増殖阻害の有無を光学的に読みとれることが分かった。さらに、4, 8, 24, 28, 32時間後のIC₅₀をそれぞれ算出したところ、4h-IC₅₀が最も低く、32h-IC₅₀が最も大きい値を示した。このことは、実験開始後短い時間でも増殖阻害作用を示すが、時間とともに増殖が活発化するため、増殖の影響を指標とする場合、ある程度の培養時間が必要と考えられる。従って、4時間後には、660nmにおける透過率から求めた増殖率により、IC₅₀が算出できたが、本研究では、増殖に対する馴化時間をおく必要があること、感受性の高い対数期であること、かつ、対照区と試験区で比較し、増殖影響の有無が最も明確になったことから判断し、32時間後の半数増殖阻害濃度 (32h-IC₅₀) で増殖に対する影響を評価するのが適切であると判断した。

3・2 NPEOの影響

NPEOを主成分とする避妊用殺精子剤では、10ppmでは増殖阻害が認められず、100ppmで増殖が阻害された。増殖阻害が生じた濃度の細胞を光学顕微鏡で観察したところ、葉緑体の色素が欠落し、無色になっているのが観察された。また、NPEOは、エトキシ基 (EO基) の重合度の違いにより、増殖阻害を起こす濃度が異なった。例えば、EO基の重合度がn=100を越えるものは、1,000ppmの濃度でも増殖阻害が観察されず、n=2程度のものは、NPに近い濃度で阻害作用を示した。すなわち、表1より、EO基の重合度が増すに従って32h-IC₅₀が高く、増殖阻害作用が弱くなることが分かった。これらの傾向は、モル濃度で比較しても、同様の傾向を示した。同じエーテル型の非イオン界面活性剤である、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (POER) のヒメダカに対する毒性は、EO基が小さくなるほど強くなるという報告^{21, 22)}もあることから、NPEOのEO基の重合度が毒性に大きく関与していることが分かった。

なお、避妊フィルムの32h-IC₅₀は、約20ppmであ

ったところから、今回用いた試薬の中では、NPEO(12)と近いことから判断し、EO基の重合度がn=12くらいのNPEOが、原料として使われていると推定できた。

3・3 APsの影響

APsの増殖阻害は、NPEOに比べ、低い濃度で観察された。NPEOの分解生成物であるNPは、1ppmで増殖阻害を起こした (図4)。このことは、NPEOのEO基が分解されるに従って、毒性が強くなることを示している。NPEOと同様にAPsの影響を32h-IC₅₀で比較すると (表1)、アルキル基の炭素数が小さい (C₃) ものから大きく (C₉) なるに従って、徐々に32h-IC₅₀は低くなり、C₇~C₉のAPsが最も強い増殖阻害作用を示した。ここで、対象物質間の分子量の違いを補正するため、モル濃度で比較したところ、やはり、同様の傾向を示した。このことから、アルキル基の大きさと増殖阻害作用の強さは、ほぼ比例することが分かった。また、ブチルフェノールの結果では、結合位の違いにより毒性も異なっていた。こうした32h-IC₅₀の相違いは、わずかな化学物質の構造の違いにより、毒性が異なることを示しており、緑藻のクラミドモナスにおける毒性物質の作用機序を明らかにする重要な手がかりになると思われる。

表1 実験に用いた標準物質および32時間後の50%増殖阻害濃度 (32h-IC₅₀)

NPEO欄の()内の数値は、EO基の重合度を示す。表中の数値に >を付けて表した物質は、実験を行った最高濃度においても増殖阻害が起こらなかったため、32h-IC₅₀を求められなかった。

試験物質名	アルキル基の炭素数	32h-IC ₅₀ (ppm)	32h-IC ₅₀ (μM)
NPEO (避妊フィルム)	C ₉	20	—
NPEO (2)	C ₉	1.4	4.5
NPEO (5)	C ₉	1.9	4.3
NPEO (12)	C ₉	17	22
NPEO (40)	C ₉	>1,000	>500
NPEO (100)	C ₉	>1,000	>210
4-プロピルフェノール†	C ₃	>100	>730
2-tert-ブチルフェノール‡	C ₄	7.2	48
3-tert-ブチルフェノール‡	C ₄	28	180
4-tert-ブチルフェノール‡, *	C ₄	22	140
4-n-ペンチルフェノール‡, *	C ₅	2.1	12
4-n-ヘキシルフェノール‡, *	C ₆	1.4	7.7
4-n-ヘプチルフェノール‡, *	C ₇	0.24	1.2
4-n-オクチルフェノール‡, *	C ₈	0.24	1.1
4-ノニルフェノール‡, *	C ₉	0.19	0.86
ビスフェノールA*	—	25	100
17β-エストラジオール*	—	>33	>120

†: ALDRICH社製 ‡: 関東化学製

*: 環境庁の環境ホルモン緊急全国一斉調査対象物質 (SPEED' 98)

3・4 ビスフェノールAおよび17β-エストラジオールの影響

ビスフェノールAの32h-IC₅₀は、25ppmであり、これは、分子量を考慮したモル濃度に換算すると、100μMとなり、NPと比較すると、100倍程度大きな値である。ここで、BPAとNPの分子量は、それぞれ220.35、228.29と、ほぼ同じことから、分子量に伴う拡散条件は同程度と思われる。しかし、NPが親油性官能基のアルキル基を持っているため、細胞膜を透過しやすく、細胞内器官にも作用し易かったためと説明できる。一方、17β-エストラジオールは、66ppmの濃度では白濁したため、33ppmが試験区の最高濃度となった。また、すべての実験区において増殖阻害は起こらなかったため、IC₅₀は算出できなかった。

4 今後の課題

平成10年度の環境庁の測定結果²³⁾から、NPは、全国河川中130地点の77%から検出され、その最高検出濃度は7.1μg/lであった。BPAは、同じく68%で検出され、0.94μg/lであった。これらの調査結果から、本研究で、供試生物として用いたクラミドモナス野生株での32h-IC₅₀による評価は、難しいと思われる。河川水から目的物質を抽出・濃縮後添加する方法や、感受性の高い突然変異体を単離することを検討し、感度に関する問題を解決しなければならない。また、本研究では、SGI培地を用いたが、河川水に試験物質を添加したときのIC₅₀を確認しておく必要がある。それらの検討ののち、バイオアッセイ系の確立が可能と考える。

本研究では、クラミドモナスに対する急性毒性の検討を行ったに過ぎず、本来、環境ホルモンの作用として懸念されている不可逆的な反応や有性生殖においての影響についても早急に調べる必要がある。これらの研究には、世代交代が比較的早く子孫への影響を調べられること、鞭毛再生、遊泳速度など^{24) - 30)} (中村ら) 異なった生命現象に注目することで、複合的に毒性評価が可能であることから、クラミドモナスが供試生物に適していると考えられる。

今後は、APsの増殖(細胞分裂)阻害機序、さらに、藻類にも高等動物のようにレセプターが存在し、環境ホルモンとして作用するのかなどについても解明していきたい。

5 まとめ

単細胞緑藻クラミドモナスを供試藻類に用いて、環境ホルモンの疑いのある化学物質の増殖に対する影響を調べるとともに、バイオアッセイ系の確立を目的とした本研究をまとめると、次のようになる。

- (1) 660nmの透過率を調べることにより、クラミドモナスの細胞数を概ね把握することができた。また、半数増殖阻害濃度(IC₅₀)を評価する時間は、透過率の変化および細胞の状態から判断し、32時間後(32h-IC₅₀)が適当であることが分かった。
- (2) NPEOは、10ppmでは増殖阻害が認められず、100ppmで増殖が阻害された。それらの細胞を光学顕微鏡で観察したところ、鞭毛ははずれ、葉緑体の色素が欠落し、無色になっていた。また、NPEOは、EO基の重合度の違いにより、増殖阻害を起こす濃度が異なった(表1・上段)。すなわち、EO基の重合度が増すに従って32h-IC₅₀が高くなり、増殖阻害作用は弱くなることが分かった。

一方、避妊フィルムの主成分は、殺精子剤としてNPEO(50mg含有)が使われており、32h-IC₅₀が約20ppmであったことから、EO基の重合度がn=12程度のものが使われていると推定できた。

- (3) APsの増殖阻害は、NPEOに比べ、低い濃度で観察された(表1・中段)。アルキル基の炭素数が小さい(C₃)のものから大きく(C₉)なるに従って、徐々に32h-IC₅₀値は低くなり、C₇~C₉のAPsが最も強い増殖阻害作用を示した。このことから、アルキル基の大きさと増殖阻害作用の強さは、ほぼ比例することが分かった。また、プチルフェノール異性体群では、結合位の違いによっても増殖阻害濃度が異なることが分かった。

BPAの32h-IC₅₀(モル濃度)は、APsのC₇~C₉と比較すると100倍程度大きかった。これは、アルキル基を持たないことから、親油性が小さく、細胞膜を透過しにくかったものと考えられる。また、17β-エストラジオールの増殖阻害濃度を求めることはできなかった。

- (4) 以上の結果から、クラミドモナスを供試生物に利用し、660nmの透過率を測定し、増殖阻害作用を検討した本方法は、河川水など試料の濃縮方法と組み合わせることにより、比較的簡易な生態毒性評価方法として有効であると考えられる。

(本研究の一部は、平成10年度さいたま環境研究フォーラム³¹⁾で発表したものである)

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導および資料の提供をいただいた富山大学理学部中村省吾博士、同生物圏環境科学科針木和也氏(M2)、ならびに関係各位に謝意を表します。

また、本研究は、一部を除き、平成10年度埼玉県総合政策部提案型研究推進制度(先導的基礎研究)の助成を得て行ったものである。

参 考 文 献

- 1) 松原正明, 原田 新, 田中宏明: 藻類増殖阻害試験及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, 11, 768-775(1997)
- 2) 鈴木祥広, 森下玲子, 高見 徹, 丸山俊朗: 藻類増殖阻害試験における生物量の測定方法が毒性評価に及ぼす影響, 環境工学研究論文集, 35, 101-109(1998)
- 3) 鈴木祥広, 森下玲子, 丸山俊郎: 増殖阻害試験に用いる供試藻類の栄養条件がモノクロロミンの毒性評価に及ぼす影響, 水環境学会誌, 20, 11, 783-788(1997)
- 4) 鈴木祥広, 森下玲子, 丸山俊朗: 淡水産植物プランクトンの増殖阻害試験によるモノクロロミンと塩素殺菌下水処理水の毒性評価, 水環境学会誌, 19, 11, pp. 861-870(1996)
- 5) 丸山俊朗, 三浦昭雄: 海藻を供試生物とした都市下水処理水の生物検定, 水環境学会誌, 16, 5, pp. 327-338(1993)
- 6) 高見 徹, 丸山俊朗, 鈴木祥広, 海賀信好, 三浦昭雄: 海藻(スサビノリ殻胞子)を用いた生物検定による都市下水の塩素代替消毒処理水の毒性比較, 水環境学会誌, 21, 11, pp. 711-718(1998)
- 7) 高見 徹, 丸山俊朗, 鈴木祥広, 三浦昭雄: 海藻(スサビノリ殻胞子)を用いた生物検定における適切な暴露時間と判定指標の検討, 水環境学会誌, 22, 1, pp. 29-34(1999)
- 8) 中村省吾: クラミドモナスの鞭毛形態形成が異常な突然変異体株の解析, 平成4年度科学研究費補助金(一般研究(C))研究成果報告書
- 9) Nakamura, S., Takino, H. and Kojima, M. K.: Effect of lithium on flagella length in *Chlamydomonas reinhardtii*. Cell Struct. Funct., 12, 369-374(1987)
- 10) Nakamura, S., Watanabe, M., Hatase, K. and Kojima, M. K.: Light inhibits flagellation in a *Chlamydomonas* mutant. Plant Cell Physiol., 31, 399-401(1990)
- 11) Nakamura, S., Tanaka, G., Maeda, at., Kamiya, R., Matsunaga, T. and Nikaido, O.: Assembly and function of *Chlamydomonas* flagella mastigonemes as probed with a monoclonal antibody. J. Cell Sci., 109, 57-62(1996)
- 12) 上水試験方法: 日本水道協会, p. 65(1993)
- 13) 井口泰泉: 科学, 68(7), 岩波書店(1998)
- 14) 井口泰泉: よくわかる環境ホルモン学, 環境新聞社, 東京(1998)
- 15) 立花 隆: 環境ホルモン入門, 新潮社(1998)
- 16) 山本猛嗣: 日本発環境ホルモン報告, 日刊工業新聞社(1998)
- 17) 磯部友彦・高田秀重: 水環境中におけるノニルフェノールの挙動と環境影響, 水環境学会誌, 21, 4, 203-208(1998)
- 18) 高田秀重: 化学, 53(7), 化学同人(1998)
- 19) Sager, R. and Granick, S.: Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. Ann. New York Acad. Sci., 56, 831-838(1953)
- 20) 吉岡義正: 生態影響評価試験に関する調査研究(平成9年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書, (財)日本環境学会, p. 137-155(1998))
- 21) 山口孝弘, 鈴木陽子, 篠塚秀典, 寺井里枝, 池田進彦, 小林進: 洗剤の魚(ヒメダカ)致死毒性実験, 合成洗剤研究会誌, 9(2), 27-28(1996)
- 22) 小林 勇: 非イオン界面活性剤の生理活性及び環境影響, 水環境学会誌, 21, 4, 197-202(1998)
- 23) 環境庁水質保全局水質管理課: 水環境中の内分泌攪乱物質(いわゆる環境ホルモン)実態概況調査(夏期)結果速報(1998).
- 24) 針木和也・山下真紀子・中村省吾・佐藤忠文: 単細胞緑藻クラミドモナスの, 遊泳運動, 鞭毛再生, 増殖への重金属の影響, 第30回日本原生動物学会大会, 茨城大学(1997)
- 25) 針木和也, 山下真紀子, 中村省吾: 単細胞緑藻クラミドモナスの遊泳運動・鞭毛再生・コロニー形成への重金属の影響, バイオアッセイ国際シンポジウムinとやま, 富山県民会館(1997)
- 26) 針木和也, 楠井隆史, 中村省吾: クラミドモナスの

- 鞭毛再生と遊泳速度に及ぼすCu, Zn, Cdの影響, 第4回バイオアッセイ研究会・日本毒性学会合同発表会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)(1998)
- 27) 中村省吾:単細胞緑藻による環境多重評価法の確立, (財)富山県高等学校教育振興財団平成9年度研究助成報告書, p. p. 11-16(1999)
- 28) 針木和也, 山下真紀子, 楠井隆史, 中村省吾:単細胞緑藻クラミドモナスの鞭毛再生, 遊泳速度, 増殖に及ぼすCd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺の影響, 金沢大学創立50周年記念 国際シンポジウム「地球-水-人間」 金沢市文化ホール(1999)
- 29) Hariki, K., Nakamura, S.:Effect of surfactants and endocrine disruptors on flagellar regeneration and swimming velocity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the International Symposium "Earth-Water-Humans", Kanazawa, 104-108(1999)
- 30) 針木和也・中村省吾:原生動物クラミドモナスの鞭毛再生と遊泳速度に及ぼす界面活性剤および外因性内分泌攪乱物質の影響, 日本動物学会中部支部大会, インテック大山町研修センター(富山)(1999)
- 31) 田中仁志:平成10年度さいたま環境研究フォーラム資料集, 66-75(1999)