

II-4. 海産魚類急性毒性試験法

魚類を用いた急性毒性試験としては、既にJIS K0102工場排水試験方法¹⁾、農薬取締法²⁾、APHA-AWWA-WPCFによるStandard Methods³⁾あるいはOECDガイドライン^{4),5)}などがある。これらの方法は公定法あるいはそれに準ずる方法となっており、実験方法、実験条件などが詳しく規定されている。推奨試験魚として、Standard Methodsでは海産魚も示してはいるが、他の方法ではコイ、メダカ、ゼブラフィッシュ、ブルーギルあるいはニジマスなどの淡水魚を主な試験魚として推奨している。一方、海産魚と淡水魚の間で汚染物質に対する感受性が異なる可能性が指摘⁶⁾されており、また化学物質による海洋汚染が問題となっていることから、化学物質の海産生物に対する影響を評価するため海産魚による毒性試験法をここに提案するものである。

我が国沿岸に生息する海産魚で、生態毒性試験魚としての必要条件である、大きさのそろった多数の個体の入手ができる、飼育が簡便である、化学物質に対する感受性が高いなどを満足する種類を選択した。その結果、マダイ、シロギスおよびアミメハギが試験魚として優れていることが明らかとなったため、これらの種類を用いた急性毒性試験法を提案した。

1. 海産魚類急性毒性試験の概要

魚類に対する毒性とは、ある物質あるいはある排水などに魚類を暴露した場合に起こる有害な影響である。この有害な影響とは、一つの影響を指し示しているわけではなく、最も著しい影響として個体の死があり、その他に成長阻害、呼吸機能障害、再生産機能障害などの種々障害がある。魚類の毒性試験にはほ乳類と同様、短期間の暴露実験により被験物質(排水など)の半数致死濃度(LC₅₀、median lethal concentration)を求める急性毒性試験と、長期間の暴露実験により被験物質の最大許容濃度(MATC、maximum allowable toxicant concentration)、無作用濃度(NOEC、no observed effect concentration)などを求める慢性毒性試験がある。ここでは、2. 試験法で、一定時間(通常96時間)被験物質に暴露し、生残を観察して供試魚であるマダイ、アミメハギおよびシロギスなどの海産魚の半数が死亡する濃度(LC₅₀)を求める急性毒性試験法について、次いで3. 試験法の解説で解説を行う。

2. 試験法

ここで提案する試験法は、試験魚として海産魚のマダイ、アミメハギおよびシロギスを選定しているが、前述の既往試験法を基本とし、マダイ、アミメハギおよびシロギスを用いた場合の試験条件を新たに規定することにより、小型海産魚を用いた急性毒性試験とした。

1) 試験法の原理

本試験は、マダイ、アミメハギ、シロギスなどの海産魚を試験魚とし、これを海水で数段階に希釈した被験物質に暴露して経時的に死亡率の観察を行い、試験魚の半

数を死亡させる被験物質濃度のLC₅₀を求めるものである。試験期間は通常96時間までとし、24、48、72および96時間後のLC₅₀を求める。この試験には、試験液を試験期間中換えない止水式、一定時間(通常24時間)毎に試験液の全部あるいは大部分を換える半止水式、流水で行う流水式の3方式があり、必要に応じて適した方式を使う(注1)。

2) 試験の準備

(1) 試験魚

マダイ、アミメハギあるいはシロギスなどの海産魚とする(注2)。ただし、試験魚には稚魚期の比較的小型で大きさの揃った個体(最大のものの全長が最小のもの1.5倍以下)を用い、また成熟個体を用いない(注3)。また、試験魚は毒性試験の条件(主に水温)に少なくとも1週間は馴致させる(注4)。

(2) 希釈海水

被験物質を希釈する海水には、塩分などの条件を満足していれば通常の沿岸水を充分エアレーションして用いてもよい。ただし、使用する海水中に被験物質の毒性を変化させる汚染物質が含まれている可能性もあるので、活性炭ろ過海水を使用するのが望ましい。また自然海水が得られなければ、人工海水を使用してもよい(注5)。なお、キレート剤を含む人工海水を使用してはならない。

(3) 器具および装置

①試験水槽

後述する試験魚の収容密度を満足するガラス製水槽とする。

②恒温設備

試験は一定の温度範囲で行うため、水温を調節する設備が必要である。止水あるいは半止水式試験の場合、試験を恒温室で行うか、あるいは試験水槽を恒温水槽に浸して行う。また、流水式試験の場合は海水を調温する。いずれの場合も設定温度±1℃の範囲内に保つ。

③飼育機器

通気が必要な場合、エアレーション装置を使用する。

3) 試験条件(注6)

(1) 水温

試験水温はマダイで20℃程度、アミメハギおよびシロギスでは23~26℃の範囲に設定し、水温変動が±1℃以内になるように調温する(注7)。

(2) 塩分

29以上35以下(注7)。

(3) 酸素飽和度

60%以上。可能であれば70%以上が望ましい(注7)。

(4) 収容密度

1濃度区当りの試験尾数を7尾以上とし(注8)、海水1L当りの収容密度マダイで0.28g以下、アミメハギで0.23g以下(注9)、シロギスで0.12g以下とする(注9)。

(5) 試験濃度

被験物質の濃度は、必要に応じて予備試験によりその範囲を決める。予備試験では濃度範囲を広く、例えば、

100、10、1、0.1mg/Lのようにとる。本試験では、予備試験の結果を参考にして、24時間以内に大部分の試験魚が死亡する濃度と96時間後も大部分の供試魚が生存する濃度を推測し、両濃度間で等比級数的(公比2以下)に5濃度区以上を設定する。

被験物質の濃度は、設定濃度の80%以上に維持されることが望ましい。したがって、試験前にこの条件が満たされるか否かを確認しておく(注10)。この条件が維持できない場合は、 LC_{50} の計算は実測濃度にもとづいて行う。この場合、被験物質濃度を試験期間中に複数回測定し、これらの平均値を被験物質の濃度とする(注11)。

各濃度区の試験液は、被験物質の保存溶液を希釈して調製する。被験物質の水に対する溶解度が低い場合、試験魚に対して低毒性の有機溶剤(アセトン、エタノール、メタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなど)あるいは界面活性剤(Tween80、HC040など)などの助剤を用いてその保存溶液を調製する。(注12)

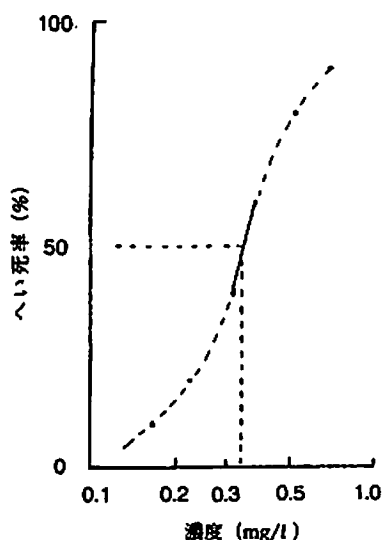


図 2-4-1 片対数グラフによる LC_{50} 算出

(6) 排水処理

毒性試験で用いた試験水中の被験物質を必要に応じて処理するため、排水処理装置を準備する。なお、処理装置によって被験物質が試験水から除去されることを事前に確認しておく。

4) 試験操作

- (1) 被験物質の希釈試料(5濃度区以上)を各試験水槽に調製する。希釈水だけを用いた対照区も設定し、さらに有機溶剤などの助剤を用いた場合、試験区で助剤が最高濃度となった区と同濃度の助剤対照区を設ける(注12)。
- (2) 試験液の調製後、直ちに試験魚を水槽内に移し、試験を開始する(注13)。試験中は給餌しない(注14)。
- (3) 試験中は頻繁に観察し(注15)、死亡、横転、狂奔などの異常行動を示した場合はこれを記録する(注16)。
- (4) 試験中の死亡魚は速やかに取り除く。
- (5) 24、48、72および96時間後の死亡魚数を記録する。

(6) 対照区あるいは助剤対照区における96時間後の死亡率が10%(試験魚数が10尾未満の場合、1尾)を越えた場合、試験結果を採用してはならない。

(7) 試験期間中、試験液についてはその水温、pH、塩分、溶存酸素濃度(酸素飽和度)および被験物質の濃度を測定する。水質測定は、少なくとも試験開始前および終了時に行うものとするが、可能な限り頻繁に行う。

5) 結果の解析およびとりまとめ

試験終了後、図 2-4-1に示すように試験液の濃度に対して対数正規確率紙に、それぞれの暴露時間に得られた累積死亡率をとり、死亡率50%より上のものと下のものとで50%に最も近いものを直線で結び、死亡率50%に対する試験液濃度である LC_{50} を読み取る(注17)。この他に参考データとして、供試魚の死亡が認められなかった最も高い濃度および試験魚の死亡が認められた最も低い濃度を記録し、死亡以外の影響(横転、狂奔などの異常行動など)もデータから LC_{50} と同様にして、 EC_{50} (半数の試験魚に死亡以外の影響を及ぼす濃度、median effective concentration)として算出する。

3. 試験法の解説

注1 魚類を用いた急性毒性試験には、試験期間中に試験液の交換を全く行わない止水式、一定期間(通常24時間)毎に換水を行う半止水式、および常時流水で行う流水式の3方法がある。毒性試験では被験物質の濃度を一定に保つことが要求されることから、被験物質の濃度が分解、揮発などによって変動しやすい場合、流水式試験法によるのが望ましい。しかし、試験条件を満足すれば半止水式によってもよい。また、被験物質が96時間程度では分解され難く、あるいは揮発し難いなど、その濃度がほとんど変動しない場合は、止水式によってもよい。なお、止水式試験では96時間後まで試験液の酸素飽和度を60あるいは70%以上に保つことは難しい。このような場合、被験物質の濃度が通気などによって変動しないことが分かっているならば通気などの適当な方法によってもよい。また、試験魚の排泄物による水質の悪化が著しい場合、半止水あるいは流水試験による。

例えば、カドミウム(Cd)や銅などの場合、分解あるいは揮発などによる濃度変化がなく、通気による濃度変化もないので止水式によってもよい。また、農薬の一種であるスミチオン(MEP)あるいはBPNC(バッサ)などでは通気すると濃度の減少が著しいものの、通気しなければ24時間後の濃度が設定濃度の80%以上を維持できる場合は、24時間毎の換水を行う半止水式によってもよい。一方、揮発性の著しい物質、ダイアジノンあるいは船底塗料の一種である有機スズ化合物などのように、通気しなくても24時間(あるいはさらに短時間)後の濃度を設定濃度の80%以上に維持することが困難なものでは、原則として流水式によることが望ましく、それが不可能で半止水式による場合には実測濃度によって LC_{50} を算出する。

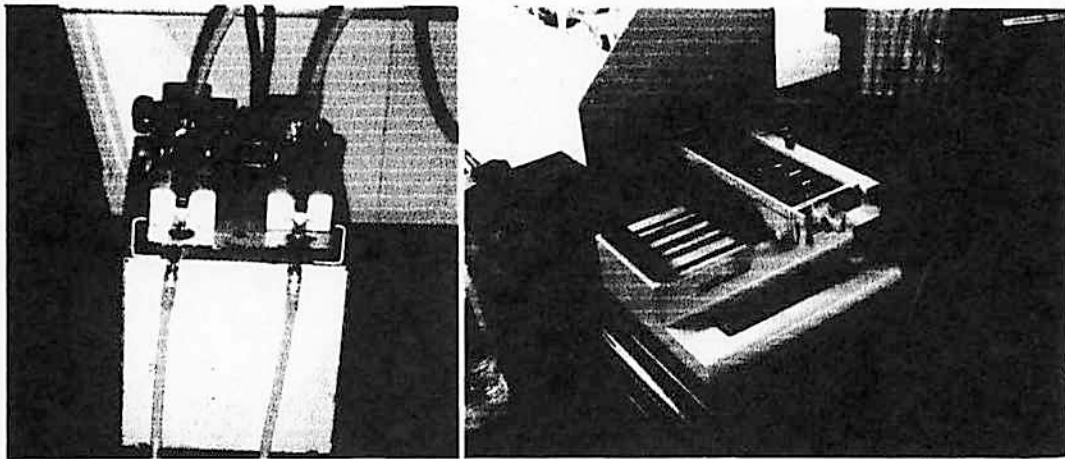
流水試験の場合、一定流量の流水(海水)中に一定流量の被験物質を添加することによって一定濃度の試験液を調製するため、微量ポンプ(図 2-4-2)を用いる。この際、ポンプおよび配管の材質に注意する必要がある。例えば、前報告書⁷⁾の第1章 3.4毒性試験装置の開発で明らかに

されたように、シリコンチューブでは通過する α -HCHの66.6%が吸着してしまう。したがって、配管にはガラス、テフロンなどの細管が推奨される。

注2 マダイ、アミメハギおよびシロギスに対する、塩化第二水銀、PCP-Na、重クロム酸ソーダ、p-ニトロフェノール、 γ -HCH、CdおよびMEPの7物質のLC₅₀を海水馴致ヒメダカ、ボラ、ヒラメ、カタクチイワシおよびコバルトスズメの計8魚種に対するLC₅₀と比較した(表II-4-1)。ほとんどの場合、マダイ、アミメハギおよびシロギスのLC₅₀は他の魚種に比較して低いかあるいは同程度であり、選定した試験魚は有害物質に対する感受性が高

いことが解った。したがって、マダイ、アミメハギおよびシロギスとも供試魚として適していると判断された。

注3 試験魚の成長段階によって、被験物質に対する感受性が異なる⁸⁾。一般的には、成長段階のより初期における感受性が高い(LC₅₀値が低い)が、成長段階の初期の仔魚は、安定して飼育することが困難な場合が多い。したがって、試験魚としては、より初期の成長段階で、飼育が比較的容易な稚魚を選択するほうが望ましい。また、成熟期の感受性がそれ以外の成長段階の感受性に比較して大きく変動することがしばしば指摘されていることから、成熟個体は用いない。



図II-4-2 暴露試験に用いる微量ポンプの一例(左:ガラスポンプ、右:シリンジポンプ)

表II-4-1 各種有害化学物質の各種海産魚に対する96hLC₅₀(mg/L)の比較

魚種	体重 (g)	被 験 物 質						
		塩化第 二水銀	PCP-Na	重クロム 酸ソーダ*	p-ニトロ フェノール	γ -HCH	Cd	MEP
アミメハギ (天然採捕)	1.3	0.52	0.19	—	—	—	—	—
アミメハギ (人工孵化)	0.3	0.02	0.22	15	7.0	—	—	—
アミメハギ (人工孵化)	0.17	—	—	—	—	0.046	0.68	0.15
シロギス (人工孵化)	0.5	0.05	0.07	11	2.8	—	—	—
シロギス (人工孵化)	0.11	—	—	—	—	—	2.67	0.31
シロギス (人工孵化)	0.69	—	—	—	—	0.026	—	—
シロギス (人工孵化)	1.89	—	—	—	—	0.028	—	—
マダイ	0.16	—	—	—	—	—	0.65	0.34'
	0.64	—	—	—	—	0.035	—	—
	2.18	—	—	—	—	0.035	—	—
ボラ	0.04	—	—	—	—	—	6.6	—
	0.48	—	—	—	—	—	—	0.76
ヒラメ	0.05	—	—	—	—	—	—	1.1
カタクチイワシ	0.2	—	—	—	—	—	2.2	—
コバルトスズメ	1.2	0.27	0.26	28	2.4	—	—	—

*:48hLC₅₀

注4 徐々に実験条件に馴致し、実験条件と同一条件になってから少なくとも1週間飼育後に、試験魚に異常の無いことを確認する。例えば水温馴致の場合、1~2℃/日の割合で変化させ、目的の水温になってから1週間飼育し、異常の無いことを確認する。馴致期間中に、死亡率10%以上を示した試験魚群は試験に用いない。

注5 人工海水を希釈水に用いる場合、そのことによって被験物質の毒性が変化してはならない。EDTAのようなキレート剤によって有機被験物質の毒性は変化しないものの、重金属の毒性が変化することからキレート剤を含む人工海水の使用は適当ではない⁹⁾。また、有機被験物質でもPCP-Naのように試験水のpHによって存在形態が変化して毒性試験の結果が変化する物質を使用する場合、試験中のpH変動はできる限り小さくしなければならぬ。人工海水を希釈水として用いる試験は、止水式あるいは半止水式試験法によるものと考えられるため、試験期間中に試験水のpHの変動することが予想される。したがって、pH緩衝能の低い人工海水は使用しない。Lyman and Flemingの組成の人工海水(1L中にKCl 660mg、CaCl₂ 1.120mg、Na₂SO₄ 3.912mg、MgCl₂ 4.981mg、NaCl 23.477mg)は、使用する試薬が少なく簡便かつ経済的であり、キレート剤を含まず、pH緩衝能が自然海水に近いことから、急性毒性試験に使用しても差し支えないと考えられる⁹⁾。なお、市販の人工海水でキレート剤を含むものは、使用してはならない。

注6 注3の理由により稚魚が試験魚として望ましいため、水温、塩分などの試験条件を稚魚に適した条件とした。

注7 生息環境などから推測される適正水温および塩分は、マダイで18~20℃および29~35である。一方、アミメハギでは23~26℃および32~35、シロギスに対する適正水温および塩分については、適正水温および塩分が明確にはならなかったが、以上の結果から、3魚種に対する適正塩分範囲は29~35としたが、できる限り塩分32に近い海水を入手するよう努める。

多くの試験法で水温の変動を±1℃以内になるよう調温するとしており、最近の調温器の性能から±1℃に十分調温できるものと考えた。

アミメハギおよびシロギスの毒性試験に対する酸素飽和度の影響は不明であるが、マダイおよびヒラメで調べた例によれば飽和度70%以上が適当である。ここでは酸素飽和度の適正範囲を、通常の毒性試験で言われている“飽和度60%以上”よりも安全側に見積り、マダイなどの例に準じて、70%以上とした。

注8 最近の毒性試験では試験動物の数を減らす傾向にあり、'89年OECDガイドラインでも従来1濃度区当たり10個体以上としていたものを7個体以上に改めた。

注9 収容密度は、次式により算出した。なお、毒性試験の実施機関の施設などを考慮すると、現時点では半止水式試験法が最も現実的と考え、収容密度算出においても半止水式試験法を念頭において検討した。

24時間毎に試験水の全量を交換する毒性試験(半止水式)を実施する場合、実験水槽への試験魚収容密度は、海水の溶存酸素濃度および試験魚の酸素消費量によって決定される。つまり、試験魚を水槽に収容して一定時間経過後の溶存酸素濃度が一定レベル(例えば70%飽和)以

上であることが必要であり、このことから逆算して試験魚の収容密度を求めるものである。

実際の実験水槽では魚を収容しており、その動きにより、水槽中の水が完全混合状態になっていることを前提にとすれば、水槽の海水の溶存酸素には次式が成立する。

$$V \cdot (dC/dt) = -M_o \cdot N + KL \cdot a \cdot (O_s - C) \quad \dots \textcircled{1}$$

ここで V : 海水の容量(L)

C : 海水の溶存酸素濃度(mg/L)

M_o : 試験魚の酸素消費量(mg/尾/日)

N : 試験魚の個体数

KL : 海水-空気間の酸素移動係数(暴気係数)

a : 海水-空気間の接触面積(m²)

O_s : 酸素飽和度(mg/L)

C(t=0)=O_sの初期条件で(1)式を解くと、

$$C = O_s + (e^{-KL \cdot a \cdot t/V} - 1) \cdot M_o \cdot N / KL \cdot a \quad \textcircled{2}$$

②式で必要なデータで、海水容量(V)、海水-空気間の接触面積(a)および酸素飽和度(O_s)は簡単に決まるが、試験魚の酸素消費量(M_o)および暴気係数(KL)はそれぞれ実測する必要がある。

海水と大気間における酸素の量的関係は③式によって表される。この式の中のKLが暴気係数であり、以下に述べる方法により暴気係数KLが求められる。

$$dC/dt = KL \cdot a \cdot (O_s - C) / V \quad \dots \textcircled{3}$$

③を解くと、

$$C = O_s (1 - e^{-KL \cdot a \cdot t/V})$$

$$\therefore O_s - C = O_s \cdot O_s \cdot e^{-KL \cdot a \cdot t/V}$$

$$\therefore \ln(O_s - C) = \ln O_s - KL \cdot a \cdot t / V \quad \textcircled{4}$$

海水に窒素ガスを吹き込み、溶存酸素濃度をできるかぎり引き下げた後、経時的に溶存酸素濃度の回復程度を測定し、KLを求める。つまり、縦軸にln(O_s-C)、横軸に時間tをとると、直線がもたまる。④式から、この直線の傾きがKL・a・t/Vなることがわかる。この式より、水温が25℃、塩分が33.5の時のKLを求めると174.04となる。

一方、26℃におけるアミメハギおよびシロギスの酸素消費量が⑤および⑥式で示されることが明らかとなっている。

$$\text{アミメハギ} : M_o = 0.463 \cdot W^{0.88} \text{ (mgO}_2 \text{ / 尾 / 時)} \quad \dots \textcircled{5}$$

$$\text{シロギス} : M_o = 0.693 \cdot W^{1.72} \text{ (mgO}_2 \text{ / 尾 / 時)} \quad \dots \textcircled{6}$$

したがって、KL=174.04、⑤および⑥式を②式に代入し、⑦および⑧式を得る。

アミメハギ :

$$C = O_s + (e^{-174.04 \cdot a \cdot t/V} - 1) \times 0.463 \cdot W^{0.88} \cdot N / 174.04 \cdot a \quad \dots \textcircled{7}$$

シロギス :

$$C = O_s + (e^{-174.04 \cdot a \cdot t/V} - 1) \times 0.693 \cdot W^{1.72} \cdot N / 174.04 \cdot a \quad \dots \textcircled{8}$$

これらの式に、適当な魚体重W(g)、個体数N、海水容量(L)および海水表面積(m²)を代入することにより、24時間後(t=1)の海水の溶存酸素濃度C(mg/L)が求まる。この時に、酸素飽和度が70%以上となるように魚体重、個体数などを決める。海水容量20Lの市販ガラス水槽(a=0.0956m²)の場合で計算すると、海水1L当りの収容密度はアミメハギで0.23g以下、シロギスで0.12g以下となる。

一方、マダイの酸素消費量については特定の体重でのみ酸素消費量を求めているが、これを②式に代入するとマダイの収容密度は0.28g/L以下となる。

注10 既存データがあればそれを利用してよい。しかし、それが無い場合には実測により被験物質の

濃度が設定濃度の80%以上であることを確認する。

注11 分解性、揮発性あるいは吸着性の高い物質では設定濃度の80%以上を維持することが難しい場合がある。このような場合、流水式試験によることが望ましいが、被験物質の濃度が大きく変動せず、他の実験条件を満たすのであれば半止水式(主に24時間毎に全量換水)によってもよい。この場合、被験物質の濃度は実測濃度による。また、このような物質以外でも被験物質の濃度は実測濃度によることが望ましい。

注12 基本的には溶解助剤を用いずに被験物質を水に溶解させて保存溶液あるいは中間原液(流水式試験の場合に微量定量ポンプで添加する水溶液)を調製する。

助剤を用いずに難水溶性物質の水溶液を調製する方法として、スターラや超音波による攪拌、被験物質を充填したカラムと原液水槽との反復循環などの方法がある。しかし、上述の方法は、水溶液の調製に多大の労力を要する場合には助剤を用いても差し支えない。また、助剤を用いずに被験物質の溶解度まで溶解させた水溶液でLC₅₀が求められなかった場合、助剤を用いてさらに高濃度の溶液を調製しLC₅₀を求めることがある。ただし、この場合、求めたLC₅₀は参考値とする。なお、助剤の試験液中濃度は100mg/Lを超えないことが望ましい。各助剤のマダイに対する毒性は不明だが、アミメハギおよびシロギスに対する毒性は以下に示した¹⁰⁾。

表II-4-2 各分散剤に対するアミメハギおよびシロギスの48hrLC50(mg/L)¹⁰⁾

分散剤	アミメハギ	シロギス
アセトン	5,600	6,600
DMSO	24,000	11,000
HCO100	>10,000	>10,000
Tween80	750	420

メタノール、エタノール、アセトンを分散助剤として用いた場合、その添加量が多くなると試験水の溶存酸素濃度の著しい低下、配管内面へのスカム状物質付着による配管閉塞、などの障害の種ずることがある。このため試験水の換水率増加、配管の交換などの対策を講ずる。

注13 試験液に対するエアレーションは、被験物質の濃度が変化しない場合を除いて行わない。また、エアレーションを行う場合でもこれによって水流が起これ、試験魚が強制的に遊泳運動をさせられるため、可能な限りこれを弱くする。

注14 給餌により試験水の水質が悪化し、結果に影響を及ぼす可能性があるためこれを行わない。

注15 観察する際、試験魚を驚かせないようにする。例えば、水槽の上から体を大きくのぞかせたり、夜間に突然点灯したりすることは避ける。

注16 死亡しないまでも行動の異常、体色変化、粘液の異常分泌あるいは筋肉の強縮に伴う骨折などの形態異常を起こすことも考えられる。これらの知見はその被験物質の毒性を評価する上で重要となる。例えば、除草剤の一種であるトリフルラリンに暴露したマダイ、カタクチイワシおよびヒラメを含む海産魚12種の形態異常発症限界濃度はおおむね96時間 LC₅₀よりも低く、両者の比は、1~8であった。したがって、トリフルラリンの毒性を評価する上で形態異常は重要な指標となる。

注17 片対数方眼紙によるLC₅₀の算出方法は、累積死亡率と試験液濃度の関係がシグモイド曲線を示し、死亡率50%付近ではほぼ直線であることを利用したものである。対数正規確率紙を用いれば、さらに精度が高くなる。また、試験結果をより定量的に把握したい場合、死亡率をプロビット変換する方法があり、この方法によれば信頼限界なども算出できる。最近ではこれらの計算のできるパソコンプログラムが市販されている。

K0102 解説, 日本規格協会 東京, pp. 490-493 (1986).

- 2) 農政局長通達 B第2735号 昭和40年11月25日 魚類に対する毒性試験法
- 3) APHA, AWWA & WPCF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, New York, 1989.
- 4) OECD: Draft Updated OECD Guideline for Testing of Chemicals, 203, Fish Acute Toxicity Test(1989).
- 5) (財)化学品検査協会: OECD Guidelines for Testing of Chemicals (日本語版) OECD化学品テストガイドライン データ解釈指針~化学物質の初期有害性評価のために~, 第1巻, 通商産業省 基礎産業局 化学品安全課 監修)第一法規出版 (1984).
- 6) 林野庁: 松くい虫特別防除に係る沿岸漁業影響調査報告書(1991).
- 7) 水産庁: 海産魚短期毒性試験法確立事業総合報告書 (1995).
- 8) 小山次朗・黒島良介・石松惇: 汚染物質毒性評価のための指標海産魚選定, 水環境学会誌, 15, 804-809(1992).
- 9) 堀 英夫・立石晶浩・高柳和史・山田 久: 海産魚を用いる有害物質の毒性試験における人工海水の試験用水としての適正評価, 日水誌, 62(4), 614-622 (1996).
- 10) 山田 久: 有機スズ化合物の海域環境における挙動と魚類における生物濃縮に関する研究, 瀬戸内水研報, 1, 97-162(1999)

引用文献

- 1) 日本規格協会: 詳解 工場排水試験方法 JIS

<角 堃 彰, 小山次朗>