

# 無機化学物質のオオミジンコ急性遊泳試験と 培地におけるキレート剤の影響

阿部 達雄, 菅原武\*, 高橋俊\*

## *Daphnia magna* immobilization assay application to toxicity of metal salts and the effect of chelate in medium

Tatsuo ABE, Takeru SUGAWARA\*, and Shun TAKAHASHI\*

### Abstract

Various metal salts exist in environment and they come from not only natural source but also artificial source. We expect that the metal salts also affect organisms (for example the metal ion) since metal chloride is one of the forms which are stabilized as a metal salt. Therefore, the toxic strength of metal chloride is investigated by *Daphnia magna* immobilization assay. Lithium chloride (LiCl), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) rubidium chloride (RbCl), and Cesium chloride (CsCl) are used as test reagent. *D. magna* immobilization test was carried out based on OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (TG202). 20 neonates within 24 hours old were placed into M4 medium (exposure and control) under constant temperature ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The neonates were observed at 24 and 48 hours after exposure and the number of affected and survived neonates were recorded. The  $\text{EC}_{50}$  in M4 medium was 61.6 mg LiCl / L, 5100 mg NaCl / L, 769.7 mg KCl / L, 77.8 mg RbCl / L, and 51.5 mg CsCl / L. The  $\text{EC}_{50}$  in M4 medium without EDTA was 21.7 mg LiCl / L, 2254 mg NaCl / L, 674 mg KCl / L, 64.5 mg RbCl / L, and 35.4 mg CsCl / L. These results correlate with chelate formation constant ( $\log K_f$ ).

キーワード： オオミジンコ, 無機化学物質, 急性遊泳阻害試験, 塩化物, EDTA, M4 培地

### 1. 緒言

近年、ナノ物質や複合新素材など、数多くの無機化学物質あるいは金属複合素材などが開発されている。また、環境水中には、様々な無機化学物質が存在している。海洋や岩石由来である天然のカリウム化合物やナトリウム化合物がある。温血動物では、およそ 25 種の元素が不可欠であると考えられており、そのうち鉄 (Fe)、銅 (Cu)、マンガン (Mn)、

亜鉛 (Zn)、コバルト (Co)、モリブデン (Mo)、クロム (Cr)、スズ (Sn)、バナジウム (V)、ニッケル (Ni) の 10 種は生体内に微量に存在する金属イオンであり、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、マグネシウム (Mg)、カルシウム (Ca) は、多量に存在する金属イオンで、生体機能において重要な役割を果たしている。カドミウム (Cd) やルビジウム (Rb) も低レベルで必要とされており、非金属イオンについても水素 (H)、ホウ素 (B)、炭素 (C)、窒素 (N)、

\*現在 長岡技術科学大学大学院

酸素 (O)、フッ素 (F)、珪素 (Si)、リン (P)、硫黄 (S)、塩素 (Cl)、セレン (Se)、ヨウ素 (I) も不可欠である。さらに微量のヒ素 (As) や臭素 (Br) も不可欠であることが分かっている<sup>1), 2)</sup>。以上の元素のうち、C, H, O, N, P, S は、遺伝子 (DNA, RNA) や有機化学物質 (アミノ酸、たんぱく質、ビタミン) など生命の必須元素の代表的なものである。また、P, N, K および Si は、陸上および海洋の三大必須元素と言われている。一方、産業革命以降に化学工業などにより人為的な要因によって、通常存在しないような環境において、淡水中や農作地においてリン化合物やその他の金属化合物などが検出されるようになった。また、無機化学物質は、溶解するとイオンとなり、様々な形で環境中に存在しており、これらの環境中での影響をすべて詳細に調べることは現実的ではない。米国環境保護局 (EPA) で公開している環境毒性データベース ECOTOX には、陸上および水圏の生物に対する化学物質の影響を調べた文献値等がまとめられている<sup>3)</sup>。このなかには、ミジンコ類に対する既存影響データも数多く記載されている<sup>4)~8)</sup>。しかし、有機化合物に比べ無機化学物質の既存データは非常に少なく、なかには既存の影響データが存在しない物質もある。

オオミジンコ (*Daphnia magna*, Fig. 1) は、甲殻類 鯉脚綱 枝角亜目 ミジンコ科 ミジンコ属 の大型なミジンコで、化学物質に対する感受性が高いことと、単為生殖であり繁殖が容易であることから化学物質の生態系への影響を評価する試験生物としてひろく用いられている<sup>9)</sup>。また、オオミジンコは、淡水生態系において、微細な植物プランクトンなどの一次生産者を捕食し、魚類等の餌となるような食物網の重要な位置を代表する生物である。食物網の重要な位置を占める生物が、環境中に流出した化学物質により影響を受けた場合、その影響は生態系全体に広がり、その環境に与える影響は無視できないものになる。このため、オオミジンコを用いた試験は生態学的にも重要である<sup>10), 11)</sup>。

本研究では、オオミジンコを用いた急性遊泳障害

試験により、無機化学物質のミジンコに対する影響を調べ、生態系への影響を評価する。また、キレート剤の試験に及ぼす影響についても考察する。

## 2. 実験方法

### 2.1 オオミジンコの飼育

オオミジンコの飼育は、OECD テストガイドライン TG202<sup>12)</sup> に準拠して、飼育水は Elendt M4 培地 (Table 1、以下 M4 培地)、飼育密度は 20 頭/L、水温は 20±2°C で行った。培地の調製には超純水 (ミリポア製 Academic-Q10、東京) を使用した。容器には、ふたをした 1L ビーカーを用いた。常時エアレーションを行い、定温とするため流し台に栓をして、ヒーター (ニッソー製 New IC オート 100) クールユニット (GEX 製 GXC-200) ポンプ (コトブキ製 POWER BOX 55) を用いた。光周期は、16 時間明/8 時間暗として、鑑賞魚用の照明器具を用いて行った。餌は、クロレラ (*Chlorella vulgaris*) を培地中濃度が 1×10<sup>9</sup> cells / mL となるようにクロレラ給餌溶液を 1 mL / L を毎日加えた。オオミジンコの個体数、水温は毎日記録し、1 日おきに換水を行った。クロレラには、クロレラ V12 (クロレラ工業製、福岡) を用い、原液の細胞数をカウンティングチャンバー (ビルケルチュルク血球計数板) により顕微鏡を用いて観察し、細胞数を計算した。M4 培地を用いて遠心分離により 2 回洗浄した後、再び培地で 1×10<sup>6</sup> cells / mL となるように調整し、クロレラ給餌溶液とした。



Fig. 1 *Daphnia magna*

Table 1 Elendt M4 培地に含まれる成分の各組成

主要成分	濃度, mg / L	微量成分	濃度, mg / L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293.8	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.8595
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	123.3	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.3605
KCl	5.8	LiCl	0.3060
NaHCO <sub>3</sub>	64.8	RbCl	0.0710
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10.0	SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1520
NaNO <sub>3</sub>	0.274	NaBr	0.0160
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.143	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0630
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.184	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0168
		ZnCl <sub>2</sub>	0.0130
		CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0100
		KI	0.00325
		NaSe <sub>3</sub>	0.00219
		NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.00575
		Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2.50
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.9955
ビタミン類	濃度, µg / L		
塩酸チアミン	75.0		
シアノコバラミン	1.00		
ビオチン	0.750		

## 2. 2 急性遊泳阻害試験

試験に用いた無機化学物質は、塩化セシウム (CsCl、MW = 168.36、CAS No. 7647-17-8)、塩化リチウム (LiCl、鹿特級、MW = 42.39、CAS No. 7447-41-8)、塩化ナトリウム (NaCl、特級、MW = 58.44、CAS No. 7647-14-5)、塩化カリウム (KCl、特級、MW = 74.55、CAS No. 7447-40-7)、塩化ルビジウム (RbCl、MW = 120.92、CAS No. 7791-11-9) いずれも関東化学株式会社製で白い結晶だった。

オオミジンコ急性遊泳阻害試験は、OECD ガイドライン TG202 に準拠して行った<sup>12)</sup>。M4 培地を入れた 100 mL ビーカーに試験原液を設定した濃度になるように加えて、5 濃度区と対照区を作成した。作成した各濃度区と対照区の水温、pH、溶存酸素量 (DO) は、試験開始時と試験終了時 (48 時間後) に測定した。水質測定には、水温計 (SATO 製 SK-250WPII-K)、pH 計 (HORIBA 製 D-53T) および溶存酸素計 (YSI 製 Model 55) を用いた。試験には、24 時間以内に生まれたオオミジンコの仔を使用し

た (20 頭/濃度区)。このとき、初産個体の使用は避けた。24 時間後および 48 時間後にミジンコの状態および個体数を実体顕微鏡により観察して記録した。ビーカーを軽くゆすっても動かない個体と死亡個体を影響されたとみなした。影響の強さは、半数影響濃度 (EC<sub>50</sub>) および最大無影響濃度 (NOAEL) で評価した。試験は、クールインキュベーター (IWAKI 製 ICB-151LN) 内にて行った。

## 2. 3 急性遊泳阻害試験における EDTA の有無

試験に用いたミジンコは、すべての試験において M4 培地 (EDTA あり) で飼育された親ミジンコより産まれたものを用いた。試験溶液は、EDTA ありの M4 培地と EDTA なしの M4 培地の両方で行った。EDTA 以外の成分については、ビタミン類なども含めて M4 培地の成分すべてを用いて調製した。培地は、継代飼育と試験で統一すべきだが、ミジンコの飼育における安定性や飼育管理のしやすさの面から今回はこの方法を採用した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 オオミジンコ急性遊泳阻害試験 (EDTA あり)

EDTA ありの M4 培地で試験した場合の結果を Fig. 1 に示した。また、EC<sub>50</sub> と NOAEL は Table 2 に示した。この結果は、以前に示した結果よりグラフや表を作成した<sup>13)</sup>。EC<sub>50</sub> は、日本環境毒性学会より配布されている Ecotox-Statics Version2.6 を用いて算出した。Probit 法を用いるか Logit 法を用いるかは、得られた曲線や値をみて判断した。NOAEL は、試験に使用した濃度区でミジンコに影響が見られなかった最大の濃度として示した。ミジンコに対し最も影響したのは塩化セシウムで、影響が少なかったのは塩化ナトリウムだった。塩化ルビジウムの NOAEL は、最も影響の少ない濃度 (\*) を NOAEL とした。この濃度での阻害率は 10% だった。

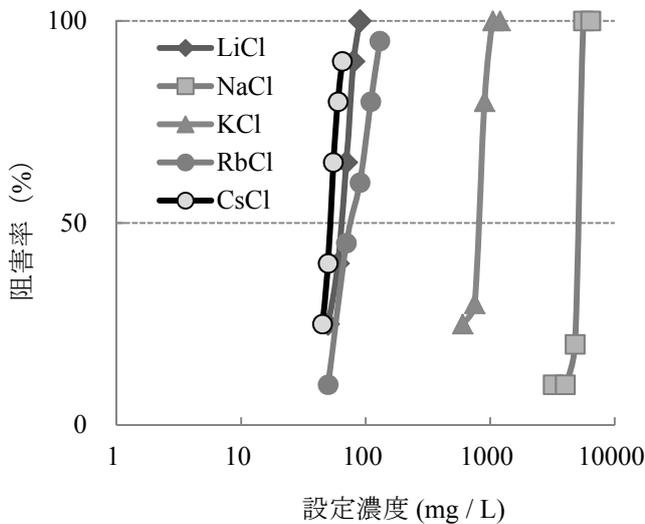


Fig. 1 急性遊泳阻害試験 (EDTAあり)

Table 2 急性遊泳阻害試験 (EDTA あり)

試験物質	EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOAEL (mg/L)
LiCl	61.6	32
NaCl	5100	1600
KCl	769.7	600
RbCl	77.8	50(*)
CsCl	51.5	25

#### 3.2 オオミジンコ急性遊泳阻害試験 (EDTA なし)

EDTA なしの M4 培地で試験した場合の試験結果を Fig. 2 に示した。また、EC<sub>50</sub> と NOAEL を Table 3 に示した。ミジンコに対して最も影響したのは塩化リチウムで、影響が少なかったのは塩化ナトリウムだった。塩化ナトリウムの NOAEL は、最も影響の少ない濃度 (\*) を NOAEL とした。この濃度での阻害率は 10% だった。影響は、LiCl > CsCl > RbCl > KCl > NaCl の順となった。EDTA ありの場合では、影響は、CsCl > LiCl > RbCl > KCl > NaCl の順であったことをみると、LiCl の影響の変化が顕著である。しかし、影響濃度の違いは、ほぼ同様の傾向がみられており、いずれかの実験結果から影響値の予測が可能であることが示唆された。また、いずれも EDTA なしの培地で試験した場合に影響が強くなる (EC<sub>50</sub> あるいは NOAEL が小さくなる) 傾向がみられた。

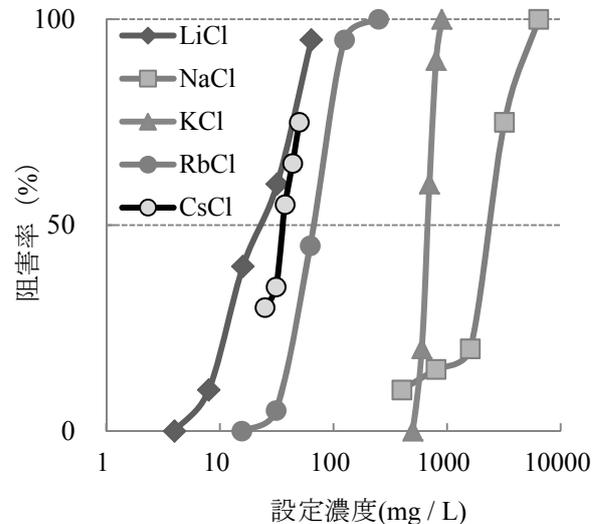


Fig. 2 急性遊泳阻害試験 (EDTAなし)

Table 3 急性遊泳阻害試験 (EDTA なし)

試験物質	EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOAEL (mg/L)
LiCl	21.7	4
NaCl	2254	400(*)
KCl	674	500
RbCl	64.5	16
CsCl	35.4	12.5

### 3. 3 培地中のキレートの影響

2種の培地での試験結果と EDTA による減少率と EDTA の各金属イオン（たとえば LiCl なら  $\text{Li}^+$ ）に対するキレート生成定数 ( $\log K_f$ )<sup>14)</sup>を Table 4 にまとめた。

Table 4 2種の培地での試験物質の  $\text{EC}_{50}$  の変化

試験物質	$\text{EC}_{50}$ (mg / L)		減少率 (%)	$\log K_f$
	EDTA あり	EDTA なし		
LiCl	61.6	21.7	65	2.79
NaCl	5100	2254	56	1.66
KCl	770	674	13	—
RbCl	77.8	64.5	17	—
CsCl	51.5	35.4	31	0.15

$\log K_f$ : キレート生成定数

M4 培地には、金属キレートである EDTA（正確には、 $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）が含まれている。金属イオンの影響がキレートにより、物質の毒性を低減させた可能性が考えられた。そこで、本研究では、使用している M4 培地を調整する際に EDTA を入れずに培地を作り、その他は同じ条件で試験溶液を調製して試験した。 $\text{EC}_{50}$  を比較すると、EDTA を含まない培地で試験した場合、全ての試験物質でオオミジンコに対して影響が増加していた。

各金属イオンの EDTA に対するキレート生成定数は、Table 4 の通りでカリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) とルビジウムイオン ( $\text{Rb}^+$ ) は、記載が無かったため（—）で示した。 $\log K_f$  は、リチウムイオン ( $\text{Li}^+$ ) が最も高く、セシウムイオン ( $\text{Cs}^+$ ) が最も低い値である。キレート生成定数の値が大きいということは、この EDTA と錯生成しやすいということである。このことから、EDTA を含む培地で試験した場合、LiCl は水溶液中で  $\text{Li}^+$  となり EDTA と比較的多く錯体を形成して、オオミジンコに対する影響が減少していたと考えられる。その結果、EDTA を含む培地で試験

した場合と、EDTA を含まない培地で試験した場合で、 $\text{EC}_{50}$  の差が他の試験物質と比べて大きくなったのではないかと考えられる。この傾向は、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Cs}^+$  でもみられ、その減少率は  $\log K_f$  の大きさに比例していた。一方で、キレート生成数の値が出ていない  $\text{K}^+$  と  $\text{Rb}^+$  は、減少率はそれほど大きくなく、EDTA の影響があまりなかったと考えられた。

上記のように無機化学物質を試験する場合、EDTA が試験結果に影響している可能性が考えられた。EDTA（キレート剤）は、ミジンコに有害となる重金属イオン（クロムイオンや銅イオン）と錯形成してこれの有害性を影響しにくくする効果がある反面、試験物質の実際の濃度も低減させてしまっていることが予想される。ただ、キレート剤によりミジンコの飼育が安定し管理しやすくなっているのも事実である。しかし、EDTA を培地に含有しなければ、ミジンコの飼育管理が安定せず困難になるという可能性が高くなるだろう。ミジンコの培地には、活性炭濾過した水道水や地下水など、本研究で用いた培地以外で試験した例も数多く存在する。今回は、M4 培地から EDTA のみを入れないという、少々乱暴なやり方を採用した。無機化学物質においては、石油化学物質や農薬など有機化合物で用いられる培地以外の異なるさまざまな培地について検討する必要があるが、ミジンコの安定性や馴化・耐性獲得も考慮に入れなければならない。

### 3. 4 金属イオンの影響

ミジンコ急性遊泳阻害試験の結果、LiCl ( $\text{EC}_{50} = 21.7 \text{ mg / L}$ ) と CsCl ( $\text{EC}_{50} = 35.4 \text{ mg / L}$ ) の影響が比較的大きかった。特に  $\text{Cs}^+$  は内向き  $\text{K}^+$  チャネルを持つ細胞に害をなすことが考えられる。たとえば、心筋、骨格筋、神経、グリア、血球、上皮（腸管上皮など）である。セシウムは、細胞内に必要なく、また、それほど有害でないため体外に排泄されず細胞外に集積、電流的な障害を受けると考えられる<sup>15)</sup>。16)。 $\text{Cs}^+$  については、 $\text{Na}^+$  あるいは  $\text{K}^+$  チャネルに 15% 程度入るとも言われており<sup>17)</sup>、ミジンコに対して電

氣的な影響を与えるとも考えられた。Li<sup>+</sup>については、中枢神経系や神経伝達物質に作用するため、Cs<sup>+</sup>と同様な作用が考えられた<sup>18)</sup>。また、同じ1価のイオンでありイオン半径も小さいため K<sup>+</sup>チャンネルにより入りやすく、強く影響したと考えられる。ただし、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>については、生体物質であるので、あまり影響しなかったと考えられた。また、Rb<sup>+</sup>も生体に微量であるが必要な元素であり<sup>1)</sup>同様のことが考えられる (Rb<sup>+</sup>は、Na<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>よりもミジンコに対して影響は強かった)。

一方、3価のタリウムでは、ごく微量でミジンコに影響することが分かっている (48-h LC<sub>50</sub> = 61 µg/L)<sup>19)</sup>。このことから、今回調べた1価以外の金属イオンやその他の無機化学物質についても調べる必要がある。しかしながら、すべての化学物質について、しらみつぶ的に調査するのは得策ではない。無機化学物質についても、化学物質の生産量や影響の強さを考慮したリスクアセスメント手法や構造活性相関 (QSAR) など系統立てて実施していく事が重要となるだろう。

本研究は、設定濃度で試験を行い、結果を報告した。一般的にミジンコの試験では、100 mL 程度のガラス容器を用いる。金属イオンは、ガラス面に吸着するとも言われており、金属イオンの濃度が設定濃度の10分の1程度しかない可能性がある (硝酸化合物での試験溶液で、試験前後で ICP および AAS で測定した場合、データ未公表)。このため、測定濃度で EC<sub>50</sub> 等を算出した場合、リチウム、ルビジウム、セシウムの各イオンの影響値は表に示した濃度の10分の1の濃度となり、必ずしも低いとは言えない可能性もあることは、考慮に留めておかななくてはならない。

### 3. 5 急性遊泳阻害試験の水質

オオミジンコ急性遊泳阻害試験 (EDTA あり) の水質は、pH 7.5 – 8.8 および 7.7 – 10.5 DO mg/L (試験開始時)、pH 7.3 – 8.0 および 7.8 – 9.0 DO mg/L (試験終了時、48 時間後) の範囲だった。また、オ

オミジンコ急性遊泳阻害試験 (EDTA なし) の水質は、pH 7.2 – 9.0 および 8.7 – 9.9 DO mg/L (試験開始時)、pH 7.4 – 7.8 および 8.4 – 9.8 DO mg/L (試験終了時、48 時間後) の範囲だった。pH および DO の変化は、いずれも大きくなく、ミジンコに影響を及ぼすほどの水質レベルではないと考えられた。

### 3. 6 塩化物イオンの影響

今回の試験は、無機化学物質である塩化物 (塩) を用いて、金属イオンの影響を調べることを主目的とした。塩化物イオンのみの影響を調べることは、本来の目的ではなく濃度の測定も行わなかったが、今後の研究では塩化物イオンや遊離塩素の濃度を測定すれば、もっとミジンコに対してどのような影響があったのか解明できるかもしれない。生体内には、塩化物イオンチャンネルが存在している<sup>20)</sup>。塩化物イオンも生体内細胞の物質の調節において重要な役割を果たしており、重要な生体維持のシステムのひとつである。しかし、塩化物イオン濃度のみがミジンコに対する影響について支配的であれば、NaCl の EC<sub>50</sub> = 2254 mg/L (EDTA なしの場合) というのは、ミジンコに影響した濃度として説明しづらい。金属イオンとの相互作用も合わせて考える必要があるだろう。一方、硝酸塩 (硝酸イオン) の影響については、イソバカニに対する影響について調べた報告がある<sup>21)</sup>。塩化物イオンは、M4 培地中に硝酸イオンの2000倍の濃度で存在している。塩化物には、正塩が多く、その代表的なものは食塩 (NaCl) だろう。これらは、環境中にも生物内にも多く存在しており、微量で生体に重篤な影響を及ぼすとは考えにくい。このため、近年は系統立ててはあまり調べられてこなかったのかもしれない。また、OECD テストガイドラインや GLP 対応による試験等の普及以降の報告例が少ないのも気がかりである<sup>4),5)</sup>。また今回は、1属の塩化物だけを調べたが、上記に示したように硝酸イオンの影響も考えられ、塩化物のほか硝酸化合物、あるいは塩化物と硝酸化合物といった複合影響についても調査する必要がある。

#### 4. 結論

本研究で試験を行った無機化学物質のうち、M4培地（EDTAあり）で試験した場合には、CsClがオオミジンコに対し最も影響が強く（ $EC_{50} = 51.5 \text{ mg/L}$ ）、NaClが最も影響が少なかった（ $EC_{50} = 5100 \text{ mg/L}$ ）。M4培地（EDTAなし）で試験した場合には、LiClがもっとも影響が強く（ $EC_{50} = 21.7 \text{ mg/L}$ ）、NaClが最も影響が少なかった（ $EC_{50} = 2254 \text{ mg/L}$ ）。この傾向は、以前の報告とほぼ同様であった。特に今回使用した試験物質の中では、LiCl、CsClが比較的強くミジンコに対し影響することが分かった。また、EDTAのキレート生成定数の大きさとミジンコに対する影響に関連性があることが分かった。さらに、測定濃度の値が設定濃度と大きく異なれば、これらの値も既報の値と近くなる可能性が示唆された。

無機化学物質の生物に対する影響は、まだ調査されていない物質および生物が多く、陸上や水圏を問わず生態系リスクおよび生態影響を調べる上で今後のさらなる研究が重要である。とくに最近では、複合新素材やナノ物質が盛んに開発されており、金属イオンや陰イオン（塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンなど）に対する影響を調べることは、非常に重要になっている。今後、有機-金属複合の新素材開発やナノテクノロジー（ピコ未満のさらに微少な材料技術を含む）の発展とともに本研究分野も無視できない課題となるだろう。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、オオミジンコを分譲していただいた（独）国立環境研究所 環境リスク研究センターおよび（株）三菱化学安全科学研究所（現在、三菱化学メディエンス（株）環境リスク評価センター）、ミジンコの飼育および実験に協力した鶴岡工業高等専門学校 本科学士の諏訪瑞季氏、その他ご厚意を頂いた方々に感謝の意を表します。また、無機化学物質のミジンコに対する影響についてコメント

を頂いたインディアナ大学公衆衛生環境学領域（SPEA）准教授 Joseph Shaw 博士に感謝します。

#### 参考文献

- 1) Hay, R., W., (太田次郎、竹内敬人、室伏きみ子 共訳), 生体無機化学, オーム社, (1986)
- 2) 西田雄三, 無機生体化学, 裳華房, (1994)
- 3) 米国環境保護庁 (USEPA) ECOTOX Database [http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick\\_query.html](http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.html)
- 4) Baudouin, M., F., Scoppa, P., "Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **12** (6) 745-751, (1974)
- 5) Anderson, B.G., "The Apparent Thresholds of Toxicity to *Daphnia Magna* for Chlorides of Various Metals When Added to Lake Erie Water", *Transactions of the American Fisheries Society*, **78** 96-113, (1950)
- 6) Khangarot, B., S., Ray, P., K., "Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **18** (2) 109-120, (1989)
- 7) Biesinger, K., E., Christensen, G., M., "Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*", *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29** (12) 1691-1700, (1972)
- 8) Bringmann, G., Kuhn, R., "The toxic effects of waste water on aquatic bacteria, algae, and small crustaceans. *Gesundheits-Ingenieur* **80** (4): 115-120 (1959)
- 9) 日本環境毒性学会編, 生態影響試験ハンドブック, 朝倉書店, (2003)
- 10) 花里孝之, ミジンコ —その生態と湖沼環境問題—, 名古屋大学出版会, (2000)

- 11) 花里孝之, ミジンはすごい! (岩波ジュニア新書), 岩波書店, (2006) *Environmental Toxicology and Chemistry* **26** 1955-1962, (2007)
- 12) OECD, "Daphnia sp. acute immobilization test. Test guideline 202.", Paris, France, (1981)
- 13) 高橋峻, 阿部達雄, "オオミジンは急性遊泳試験による無機化学物質の生態影響評価", 鶴岡工業高等専門学校研究紀要, 65-68, (2013)
- 14) 同仁化学研究所, "キレート安定度定数一覧表", プロトコル集 付録1, (2014)
- 15) Emsley, J., (山崎昶 訳), 元素の百科事典, 丸善, (2003)
- 16) 久保義弘, "内向き整流製カリウムチャネルの構造と機能", 蛋白質 核酸 酵素, 40 (15) 2288-2296, (1995)
- 17) 時政孝行, 蓮尾博, 鷹野誠, 柳 (西原) 圭子, 続よくわかる心電図 ver.4.0 β, 久留米大学, p19, (2013)  
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2/textbook/wakaru4/wakaru4.html>
- 18) chocovanilla のページ, セシウム 133 の毒性の盲点とセシウムの与える悪影響【心臓編】, <http://minkara.carview.co.jp/userid/863031/blog/24535105/>
- 19) Cheng-Hang Lan, Tser-Sheng Lin, "Acute toxicity of trivalent thallium compounds to *Daphnia magna*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **61** 432-435, (2005)
- 20) Jentsch, T., J., "CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure", pathology and physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **43** (1) 3-36, (2008)
- 21) Romano, N., Zeng, C., "Acute toxicity of sodium nitrate, potassium nitrate and potassium chloride and their effects on the hemolymph composition and gill structure of early juvenile blue swimmer crabs (*Portunus pelagicus*, Linnaeus 1758) (Decapoda, Brachyura, Portunidae).",