



Title	海産植物プランクトンの成長に及ぼす界面活性剤ノニルフェノールエトキシレートとその分解産物ノニルフェノールの急性毒性に関する予備的研究
Author(s)	帰山, 秀樹; 池田, 勉
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 53(2), 63-67
Issue Date	2002-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/21968
Type	bulletin (article)
File Information	53(2)_P63-67.pdf



[Instructions for use](#)

海産植物プランクトンの成長に及ぼす界面活性剤ノニルフェノールエトキシレートと その分解産物ノニルフェノールの急性毒性に関する予備的研究

帰山 秀樹¹⁾・池田 勉¹⁾

Preliminary Study on the Acute Toxicity of Nonylphenol Polyethoxylates (NPEO) and Nonylphenol (NP) on the Growth of Marine Phytoplankton

Hideki KAERIYAMA¹⁾ and Tsutomu IKEDA¹⁾

Abstract

Acute toxicity of nonylphenol polyethoxylates (NPEO) and its metabolite (nonylphenol ; NP) on the growth of marine phytoplankton species including *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Pavlova* sp. and *Isochrysis galbana* was studied. Both NPEO and NP were added to the cultures of these algae at growth phase and subsequent changes in cell concentrations were monitored by measuring *in vivo* fluorescence on daily basis up to 3-5 days. Effective concentrations of NPEO causing 50% death of cells in respective 24 h (24 h-EC₅₀) and 48 h (48 h-EC₅₀) were estimated to be 4.1 and 2.4 ppm for *Chaetoceros gracilis*, 29.4 and 23.6 ppm for *Phaeodactylum tricorutum*, 16.9 and 9.8 ppm for *Pavlova* sp. and 17.8 and 17.3 ppm for *Isochrysis galbana*. The 24 h-EC₅₀ and 48 h-EC₅₀ values to the addition of NP were 1.9 and 1.6 ppm for *Chaetoceros gracilis*, both ≥ 3.0 ppm for *Phaeodactylum tricorutum*, ≥ 3.0 and 3.0 ppm for *Pavlova* sp. and 2.5 and 2.3 ppm for *Isochrysis galbana*. For the four species tested, both 24 h-EC₅₀ and 48 h-EC₅₀ of NPEO were higher than those of NP. Dissimilar cell volumes of these four phytoplankton species appear to be not attributed to observed between-species differences in the effective concentrations. The present results are compared with reported data on freshwater and marine organisms.

Key words : Marine phytoplankton, EC₅₀, Nonylphenol polyethoxylates, Nonylphenol

はじめに

ノニルフェノールエトキシレート (nonylphenol polyethoxylate ; NPEO) は非イオン系界面活性剤でアルキルフェノールエトキシレート (APEO) の一種であるが (APEOの中でアルキル基の炭素数が9のものがNPEO), 工業用の洗浄剤, 分散剤として繊維, 製紙, 金属, 農業工業など, 家庭用合成洗剤, また火力発電用燃料 (オリマルジョン) の乳化剤として広く使われてきた (磯部・高田, 1998)。NPEOが環境汚染物質として特に問題視されるようになったのは, 下水や汚泥中に蓄積されたNPEOが分解されて毒性の高いノニルフェノールジエトキシレート (NP2EO), ノニルフェノールモノエトキシレート (NP1EO) に変わることが明らかにされてからである (Giger et al., 1984)。そしてNP1EOが嫌気分解を受けるとさらに毒性の高いノニルフェノール (NP) が生成される (Comber et al., 1993)。NPの内分泌攪乱作用が初めて確認されたのは, 人の乳ガン細胞 (MCF7) の培養実験である (Soto et al., 1991)。また, 環境中においてNPはPCB等の

難分解性の汚染物質程安定ではないが, 他の界面活性剤 (陰イオン界面活性剤の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) 等) に比べると, 環境中に残存する傾向が強い (磯部・高田, 1998)。近年, スイスにおける調査からNPEOおよびNPを含むその分解物は高い濃度で河川, 下水, 汚泥から検出され, 下水処理場で完全に分解されず自然界へ流出していることが指摘されている (Ahel et al., 1994a, b)。

NPEOおよびNPの急性毒性, 慢性毒性, 繁殖毒性に関するこれまでの知見は主として, 陸上哺乳類, 淡水産魚類・無脊椎動物に集中しており, 海産生物についての知見は著しく少ない (環境省, 2001)。本研究は, NPEOおよびNPが海洋生態系へ与える影響を解明するための第一歩として, 基礎生産者である植物プランクトンの成長に対する急性毒性作用を明らかにする目的で行った。

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科多様性生物学講座
(Laboratory of Marine Biodiversity, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

材料ならびに方法

植物プランクトン

珪藻の *Chaetoceros gracilis* (細胞容積: $194 \mu\text{m}^3$) および *Phaeodactylum tricornutum* ($205 \mu\text{m}^3$), ハプト藻の *Pavlova* sp. ($74.5 \mu\text{m}^3$) および *Isochrysis galbana* ($91.2 \mu\text{m}^3$) の4種類を使用した。何れも F/2 培養液で光強度 $82.5 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 明期 12 時間, 暗期 12 時間, 温度 20°C の条件下で継代培養されたもので, それぞれの細胞容積は無作為に選んだ 20 細胞について顕微鏡下でその長径, 短径, 高さを測定して求めたものである。実験ではマルエム培養チューブ (パイレックス製ガラス, 内径 25 mm) に F/2 培養液 28 ml を入れ, 滅菌処理 (オートクレーブ, 120°C , 60 min) を行った後, 前培養株 7 ml を接種し培養を開始した。実験期間中の植物プランクトンの増殖による細胞濃度の増加は, *in vivo* クロロフィル蛍光強度を測定することによって追跡した。実験期間中は毎朝一回, 培養液をよく攪拌した後, 培養チューブをそのまま分光蛍光光度計 (日本分光, FP-550 A 型) のセルホルダーに入れて蛍光強度を測定した。蛍光強度は以下に述べるそれぞれの植物プランクトンで求めた蛍光強度—細胞濃度関係式を用いて細胞濃度に換算した。なお, 予備実験を行い, 植物プランクトン細胞を含まない F/2 培養原液に NPEO, NP のみを加えたときの蛍光値はその濃度に関係なく, 0.5 ± 0.1 ($n=8$) であったので, これをブランクとして以後の実験の植物プランクトン培養液の蛍光測定値よりさし引いた。

蛍光強度—細胞数の検量線

4 種の植物プランクトンの対数増殖期後期の細胞を含む培養液について *in vivo* 蛍光値を測定した後, その 5 ml を採取し, 1% ルゴール溶液で固定した後, 血球計数盤を用いて顕微鏡下 (倍率: $\times 300$) で細胞数を計数した。次に, 同じ細胞を含む培養液を滅菌処理した F/2 培養原液で 6 段階 (約 80, 60, 40, 30, 20, 10%) に希釈し, 同様に蛍光値の測定と細胞数の計数を行った。これらの測定と計数を 1 試料当たり 5 回くり返した。このようにして得られた蛍光値—細胞数資料をグラフ上にプロットし, 原点を通る単回帰分析を行い, 検量線を作成した。

添加実験

毎日の細胞数測定結果から, 植物プランクトンが対数増殖期中期付近まで増えたことを確認した後, 培養液に, NPEO の場合は最終濃度 0 (無添加), 0.30, 3.0, 30 ppm, NP の場合は最終濃度 0 (無添加), 0.03, 0.30, 3.0 ppm になるように添加し, 以後 3~5 日間の蛍光強度の変化を測定した。実験は NPEO, NP 添加, 無添加それぞれについて 2 連で行った。なお, 本実験で使用した NPEO, NP は北海道大学水産学部化学海洋学講座榎木勇博士により調整されたものである。

半数影響濃度 (EC_{50}) の解析

NPEO, NP を添加した培養チューブの 24 時間および 48 時間後の細胞濃度の変化をそれぞれの時間における無添加 (対照) 培養チューブのそれとの相対値 (%) で表わし, 添加濃度に対し % 値 (2 連の平均) を log-probit グラフ上にプロットした後 (Sokal and Rohlf, 1995), 添加 24 時間後 (24 h- EC_{50}) および 48 時間後 (48 h- EC_{50}) に細胞濃度が 50% に減少する NPEO, NP 濃度を読みとった。

結 果

蛍光値—細胞数の原点を通る単回帰分析の結果, 以下の回帰直線が得られた。

Chaetoceros gracilis

$$N = 30772I \quad (r^2 = 0.997, n = 8, p < 0.0001)$$

Phaeodactylum tricornutum

$$N = 28273I \quad (r^2 = 0.995, n = 8, p < 0.0001)$$

Pavlova sp. $N = 30126I \quad (r^2 = 0.998, n = 8, p < 0.0001)$

Isochrysis galbana

$$N = 31321I \quad (r^2 = 0.988, n = 8, p < 0.0001)$$

ここで I は蛍光読み取り値, N は 1 ml あたりの細胞数である。

NPEO の添加実験については, 添加前の 4 日間の予備培養では植物プランクトン 4 種何れも時間の経過に伴い細胞濃度は増加した。4 日目の測定の後所定の濃度の NPEO を添加したが, 4 種何れも対照 (無添加) では継続して細胞濃度の増加が持続した (Fig. 1)。

Chaetoceros gracilis の細胞濃度は NPEO 添加 1 日後では 0.30 ppm 添加でわずかに増殖が抑制されたものの以後回復し, 4 日後には対照培養と同等の細胞密度に増殖した。一方, 3.0, 30 ppm 添加では 1 日後から細胞数は減少し, 3 日後の細胞濃度は対照培養のそれに比べて 3.0 ppm で約 22%, 30 ppm で約 6% まで減少した。*Phaeodactylum tricornutum* は 0.30 ppm 添加では 3 日間にわたり細胞濃度は増加を続け対照培養のそれと差は殆ど見られなかった。3.0 ppm でわずかに対照培養よりも細胞濃度の増加が若干低下し, 30 ppm では添加 1 日後から細胞濃度の急激な減少がみられ 3 日後には対照培養のその 32% まで減少した。*Pavlova* sp. の細胞濃度は NPEO 添加後 0.30 ppm では対照培養のそれと殆ど差がなく増加し続けた。3.0 ppm で添加後 1 日目から細胞濃度の増加が鈍り, 2 日目から減少し, 3 日目では対照培養のその 39% まで低下した。30 ppm では添加後 1 日目に細胞濃度は大きく減少し, 以後も徐々に減少して 3 日目には対照培養の細胞濃度の 3% となった。*Isochrysis galbana* は 0.30, 3.0 ppm の添加で 1 日後に細胞濃度がわずかに減少したが以後回復した。30 ppm の添加では細胞濃度は 1 日後に急激に減少し, 以後も緩やかな減少を続け 3 日後には対照培養の細胞濃度の 4% まで大きく減少した。

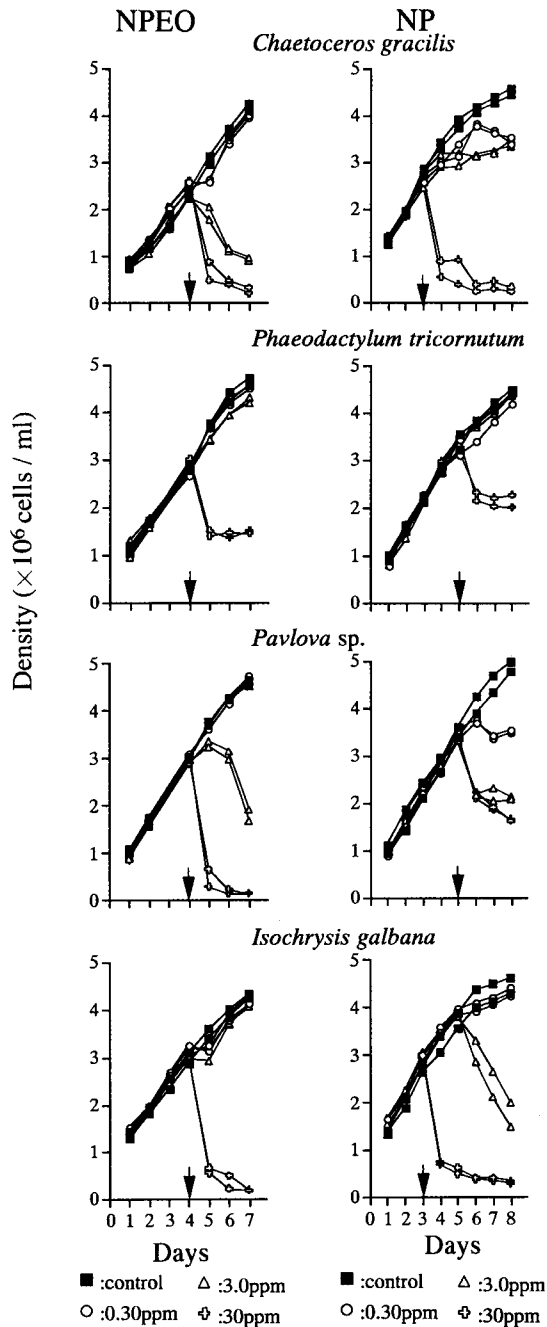


Fig. 1. Changes in cell concentrations of four phytoplankton species during static batch culture. The dates of NPEO (left panels) or NP addition (right panels) was indicated by arrows.

NPの添加実験では、添加に先立ち *Chaetoceros gracilis* および *Isochrysis galbana* については3日間、*Phaeodactylum tricornutum* および *Pavlova* sp. については5日間の予備培養を行った (Fig. 1)。 *C. gracilis* の細胞濃度の増加は0.03, 0.30 ppmの添加で1日後から減少し、添加後5日目の細胞濃度は対照培養のそれぞれのそれぞれ77%, 76%であった。一方、3.0 ppmの添加では1日後に細胞濃度は大きく減少し、その後も徐々に減少して5日後には対照

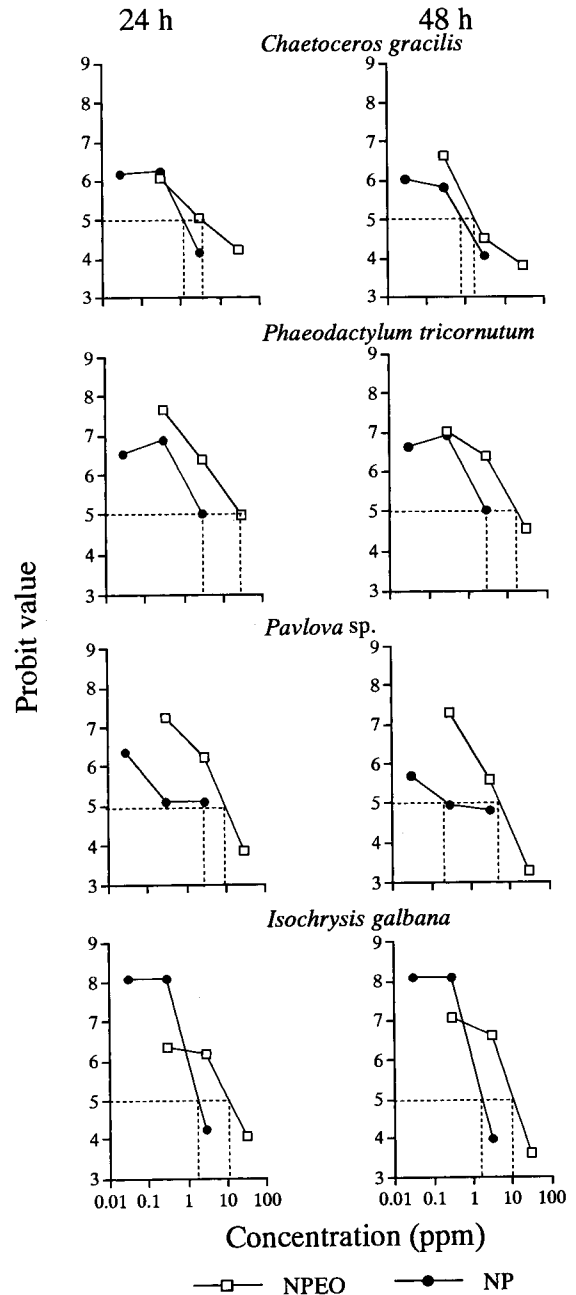


Fig. 2. Log-probit plots between dose (NPEO or NP concentrations) and mortality (cell concentrations decreased to 50% of the control) of four phytoplankton species during 24 h (left panels) or 48 h (right panels) exposure.

培養のそのの6%まで減少した。*P. tricornutum* は0.03, 0.30 ppmの添加で1日後若干細胞濃度の増加が減少したがその後回復した。3.0 ppmの添加では1日後に細胞濃度が減少し、減少は2日目からは極緩やかになり、添加3日後の細胞濃度は対照培養のそのの49%であった。*Pavlova* sp. は0.03 ppmの添加で1日後から細胞濃度の増加が停止した。0.30, 3.0 ppmの添加では1日後に細胞濃度は減少し、緩やかな減少がその後も持続して添加3日後の細胞濃度は対照

Table 1. Effective concentrations (EC₅₀) of NPEO or NP which caused 50% reduction of cell concentrations of each phytoplankton species during 24 h or 48 h exposure.

Phytoplankton	Pollutants	EC ₅₀	
		24 h	48 h
<i>Chaetoceros gracilis</i>	NPEO	4.1	2.4
	NP	1.9	1.6
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	NPEO	29.4	23.6
	NP	>3.0	>3.0
<i>Pavlova</i> sp.	NPEO	16.9	9.8
	NP	>3.0	0.3
<i>Isochrysis galbana</i>	NPEO	17.8	17.3
	NP	2.5	2.3

培養のそれぞれのそれぞれ 43%, 33% となった。*I. galbana* の細胞濃度は 0.03 ppm 添加では対照培養のそれと差異は見られなかった。0.30 ppm では添加 2 日後までは対照培養のそれと差異は見られなかったが、3 日後から減少した。3.0 ppm では添加 1 日後に細胞濃度は急激に減少し、その後も緩やかな減少を続けて添加 5 日後には対照培養の 7% となった。

所定の濃度の NPEO, NP を添加した 2 連の培養チューブと無添加の培養チューブ間の細胞濃度には添加時点で有意な差がないことを植物プランクトン 4 種全てで確認し (F-test, $p > 0.1$), 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ を log-probit グラフ (Fig. 2) から読み取った。その結果, NPEO に対する 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ は *Chaetoceros gracilis* でそれぞれ 4.1, 2.4 ppm, *Phaeodactylum tricornutum* で 29.4, 23.6 ppm, *Pavlova* sp. で 16.9, 9.8 ppm, *Isochrysis galbana* で 17.8, 17.3 ppm となった (Table 1)。NP に対する 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ は *Chaetoceros gracilis* でそれぞれ 1.9, 1.6 ppm, *Phaeodactylum tricornutum* で何れも ≥ 3.0 ppm, *Pavlova* sp. で $\geq 3.0, 0.30$ ppm, *Isochrysis galbana* で 2.5, 2.3 ppm となった (Table 1)。*Phaeodactylum tricornutum* の 24 h-EC₅₀, 48 h-EC₅₀ 値, *Pavlova* sp. の 24 h-EC₅₀ 値は最大 NP 添加濃度 (3.0 ppm) において細胞濃度が対照培養のその 50% に減ずる probit 値 (5.00) に達していなかったため正確な解析はできなかったが、それぞれ 5.02, 5.01, 5.08 と 5.00 に極めて近似していたことから、大きな過小評価となっていないと思われる。

考 察

急性毒性の生物試験において、植物プランクトン (単細胞藻類) の致死判定は動物ほど明確ではない。Yamane et al. (1984) は合成洗剤中の界面活性剤が淡水産植物プランクトンの成長に与える影響を解析するため、予め所定の濃度の界面活性剤を培地に混入し、培養株を接種後 48 h-72 h までの細胞濃度の増加速度 (成長速度) を電気粒子算定機

(コールターカウンター) または、本研究と同様に *in vivo* 蛍光強度で測定した。本研究では、培養当初は細胞濃度が低くそのため細胞濃度測定の精度が低い理由により、NPEO または NP は予め成長期に入った培養に添加し、添加 24 h, 48 h 後の対照培養と添加培養間の細胞濃度の差から効果を解析した。その結果、植物プランクトン 4 種の成長における NPEO および NP の急性毒性の発現に 3 つのパターンが見られた。その 1 は高濃度添加で一般的なもので、まず添加 24 時間後に急速な細胞密度の低下が見られ、その後緩やかな減少が持続する、その 2 は、細胞濃度の顕著な変化が添加 2-3 日後に発現する (NPEO 3.0 ppm を添加した *Pavlova* sp., NPEO 0.30 ppm を添加した *Isochrysis galbana*)、その 3 は添加 24 時間後に成長が低下したがその後回復する (NPEO 0.30 ppm, 3.0 ppm を添加した *Isochrysis galbana*) (Fig. 1)。植物プランクトンの *in vivo* 蛍光強度で示されたこれらの毒性発現パターンの詳細な解釈には今後細胞レベルでのクロロフィル色素の合成と分解における NPEO, NP の作用機序の研究が必要であるが、この発現パターンの相違が本研究のデータが log-probit グラフ上で必ずしも直線上に乗らなかった理由の一つと考えられる (Fig. 2)。

NP は NPEO に比べて毒性が高いことが知られているが (Giger et al., 1984; Ahel et al., 1994a, b; 磯部・高田, 1998)、本研究で海産植物プランクトンの得られた 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ 値の結果も NP が NPEO に比べて最小 1.5 倍 (*Chaetoceros gracilis* の 48 h-EC₅₀ 値) から最大 32.7 倍 (*Pavlova* sp. の 48 h-EC₅₀ 値) 毒性が強いことを示した (Table 1)。また、NPEO と NP の同一添加濃度において、24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ 値を見ると、後者においてより低濃度で毒性が発現する傾向が見られた (Table 1)。このように、長時間の暴露時間においてより低濃度で毒性が発現する現象は他の界面活性剤を用いた生物試験でも報告されている (菊池, 1993)。

本研究で用いた植物プランクトン 4 種で 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ で評価した NPEO, NP の成長に対する急性毒性は種によって異なり、添加によって細胞濃度が 50% に減ずる濃度は NPEO では *Phaeodactylum tricornutum* > *Pavlova* sp. > *Isochrysis galbana* > *Chaetoceros gracilis* となり、NP では *Phaeodactylum tricornutum* > *Isochrysis galbana* > *Chaetoceros gracilis* > *Pavlova* sp. となった (この順序は 24 h と 48 h の暴露時間では変わらない)。この種間の EC₅₀ 濃度の違いは珪藻 (*P. tricornutum*, *C. gracilis*)、ハプト藻 (*Pavlova* sp., *I. galbana*) の形態学的な違い (鞭毛の有無など) では説明できない。これら 4 種の 24 h-EC₅₀ および 48 h-EC₅₀ とそれぞれの種の細胞の大きさ (容積) との相関を見たところ NPEO の 24 h-EC₅₀ との間には $r = 0.04$ ($p > 0.05$), 48 h-EC₅₀ との間には $r = 0.06$ ($p > 0.05$), また NP の 24 h-EC₅₀ との間には $r = 0.31$ ($p > 0.05$), 48 h-EC₅₀ との間には $r = 0.60$ ($p > 0.05$) となり全て有意ではなかった。従って、4 種間でみられた EC₅₀ 濃度の差は細胞の大きさに

よるものではない。現在、 EC_{50} 濃度に見られた種間差の原因を特定することはできないが、同様な種間差は淡水産植物プランクトンに対する界面活性剤の成長阻害実験でも観察されている (Yamane et al., 1984)。

環境省 (2001) が「藻類」として纏めた NP に対する 72 h または 96 h- EC_{50} 値は 0.027-1.3 ppm で、最小は海産植物プランクトン *Skeletonema costatum* (珪藻) についての Ward and Boeri (1990) の報告である。上述のように、暴露時間が長い程 EC_{50} 値が低下するので直接の比較はできないが、この *S. costatum* の結果は本研究で得られた NP 添加の 48 h- EC_{50} 値 (Table 1) よりも 1-2 桁低い。「藻類」の他の値は淡水産植物プランクトン、ウキクサ類についてのもので、おおむね本研究の結果に近い。合成洗剤の非イオン界面活性剤 (ポリオキシエチレンアルキルエーテル) に対する淡水産植物プランクトン 3 種 (緑藻 *Selenastrum capricornutum*, 藍藻 *Microcystis aeruginosa*, 珪藻 *Nitzschia fonticola*) の 72 h- EC_{50} 値は 5-50 ppm であり (Yamane et al., 1984), 本研究で NPEO を添加した海産植物プランクトンの結果 (48 h- EC_{50} 値: 2.4-23.6 ppm) と同程度である。一方、小型の水棲無脊椎動物の NP に対する耐性については、潮間帯に生息する海産端脚類 *Corophium volutator* の 96 h- EC_{50} は 1.7 ppm (Brown et al., 1999), 淡水産動物プランクトンの 1 種 *Daphnia magna* (枝角類) の 24 h- EC_{50} , 48 h- EC_{50} はそれぞれ 0.3, 0.2 ppm であり (Comber et al., 1993), 後者の値は本研究の *Pavlova* sp. の結果に近く (Table 1), 前者は他の 3 種の植物プランクトンの値に近い。なお、魚類等 (主として淡水魚) で報告されている NP の 96 h- EC_{50} 値は 0.1-0.3 ppm 程度である (環境省, 2001)。実験条件 (水温, 暴露時間, 致死判定基準など) が異なり, 資料も限られているので比較は難しいが, 植物プランクトンはより大型の動物プランクトンや魚類に比べて NP に対する耐性は高い傾向が伺える。

米国, ヨーロッパの下水汚泥中の NP 濃度は数百-数千 ppm であり, 下水・下水処理水中では <1-数 10 ppb (ppb=0.001 ppm) 程度である (磯部・高田, 1998)。河口域の海水中の NP 濃度の資料は極めて少ないが, ヨーロッパでは <1-数 ppb である。日本の沿岸域における調査結果によれば, 東京湾 (0.59 ppb), 播磨灘 (0.83 ppb), 大阪湾 (0.63 ppb) を除けば, 西日本での NP 濃度はすべて <0.4 ppb もしくは検出限界以下 (<0.05 ppb) であった (環境庁, 1999)。このように, 本研究で海産植物プランクトン 4 種で得られた NP の EC_{50} 値に比べると, 現在日本沿岸域で報告されている NP 濃度は 3 桁以上低い。しかしながら, 今回の結果は植物プランクトンの成長を阻害する急性毒性であり, 慢性毒性や繁殖障害はより低濃度で発現することを考慮すれば (環境省, 2001), さらに長時間にわたる低濃

度での暴露実験が今後必要となろう。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 調整したノニルフェノールエトキシレート, ノニルフェノールを提供していただき, さらに原稿の校閲の労をとられた北海道大学水産学部化学海洋学講座榎木勇博士に感謝します。

文 献

- Ahel, M., Giger, W. and Koch, M. (1994a) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.*, **28**, 1131-1142.
- Ahel, M., Giger, W. and Schaffner, C. (1994b) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-2. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.*, **28**, 1143-1152.
- Brown, R.J., Canradi, M. and Depledge, M.H. (1999) Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). *The Science of the Total Environment*, **233**, 77-88.
- Comber, M.H.I., Williams, T.D. and Stewart, K.M. (1993) The effect of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Wat. Res.*, **27**, 273-276.
- Gigier, W., Brunner, P.H. and Schaffner, W. (1984) 4-Nonylphenol in swage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, **225**, 623-625.
- 磯部友彦・高田秀重 (1998) 水環境中におけるノニルフェノールの挙動と影響。水環境学会誌, **21**, 203-208.
- 環境庁水質保全局水質管理課 (1999) 水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) 実態状況調査。116 pp., <http://www.env.go.jp/chemi/end/ref3-1.pdf>
- 環境省総合環境政策局環境保険部 (2001) ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (案)。44 pp., <http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1301/02.pdf>
- 菊池幹夫 (1993) 界面活性剤の生分解性および水生生物に対する毒性。水環境学会誌, **16**, 302-306.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1995) *Biometry*. 3rd edition. W.H. Freeman and Company, England. 887 pp.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991) p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.*, **92**, 167-173.
- Ward, T.J. and Boeri, R.L. (1990) Acute static toxicity of nonylphenol to the marine alga (*Skeletonema costatum*). Report prepared for Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts Study No. 8970-CMA.
- Yamane, N.A., Mitsumasa, O. and Ryuichi, S. (1984) The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. *Wat. Res.*, **18**, 1101-1105.