高感度 Ames テスト (microsuspension 法) による環境汚染計測

玉川 勝美, 関 敏彦, 角田 行

仙台市衛生研究所

(〒983 仙台市若林区卸町東2-5-10)

[平成 3 年10月11日受理]

Environmental Monitoring by A Sensitive Mutation Test (Microsuspension Assay)

Katsumi Tamakawa, Toshihiko Seki and Akira Tsunoda

Sendai Municipal Institute of Public Health

(2-5-10, Oroshimachi-higashi, Wakabayashi-ku, Sendai 983)

[Received October, 11, 1991]

Summary

The microsuspension assay developed by N.Y.Kado, which is a simple modification of the Ames test, is very useful in testing environmental samples of limited mass, because of its high sensitivity. The modification consists of adding 10 times more bacteria and 5 to 10 times less metabolic enzyme, compared to the plate incorporation method by Ames. This assay is approximately 10 times more sensitive than the original Ames test based on absolute amounts of samples added for determination.

In this paper, methodology of this assay and examples of environmental monitoring, especially exposure assessments by using urine, studies on airborne mutagens indoors and detections of mutagenic fractions by HPLC, were reviewed.

Key Words : Ames test, mutagenicity, microsuspension assay, airborne particulate, personal exposure, urine, indoor air pollution, HPLC

1. はじめに

化学物質の微生物に対する突然変異誘発能をみる、いわゆる変異原性試験は発癌性評価の簡便な一次スクリーニング法として各方面で利用されている。

我国では、昭和54年「労働安全衛生法」が一部改正になり、新規化学物質の登録に際して、微生物を用いた変異原性試験を行うことが法的に義務付けられた。また、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(いわゆる「化審法」)においても、昭和61年12月の改正で新規化学物質については変異原性試験を行うことが義務付けられている。この他にも、農薬、医薬の登録に際し変異原性試験の成績が要求されているなど、変異原性試

験は発癌性、遺伝毒性を判断する際の重要な手段となっている。

今日、変異原性試験の中で、簡便で、最も信頼性が高く、かつ世界的に広く用いられているのが、*Salmonella typhimurium* を試験菌とした Ames テスト¹⁾である。Ames テストは当初は発癌性試験の一次スクリーニング用として開発されたが、今日ではその特性を活かし、水²⁻⁴⁾、大気⁵⁻¹¹⁾、食品¹²⁻¹⁴⁾など一般環境試料の汚染評価にも利用されつつある。

WHO では IPCS (International Program on Chemical Safety) の一環として「微生物変異原性試験の混合物試料に関する共同研究」(Collaborative Study on Complex Mixture in Microbial Assay) を実施し、環境試料など

の混合物の変異原性試験を行う際の問題点について検討が行われた。また、我国では環境庁が昭和63年から平成3年にかけて、Amesテストを大気汚染モニタリングに適用するための検討を行っている¹⁵⁾¹⁶⁾。一般に変異原性試験などの生物学的計測法では実施機関や時期によって結果が大きくばらつくことが指摘されている。しかし、環境庁の調査の結果、内部標準を用いてデータの補正を行った場合には、異なった試験機関間でも十分に結果の比較が可能であることが示された¹⁶⁾。変異原性試験などの生物学的計測法は、化学計測法に比べ定量性や再現性という点でやや難点はあるが、汚染質全体の生物活性を計ることにより、環境汚染の全体像を把握することができるというメリットを有している。著者らは、これまでこのAmesテストをスパイクタイヤによる環境汚染調査に適用してきた¹⁷⁻²²⁾。しかし、このテストは検出感度の点で難点があり、室内粉塵などの極微量の試料の変異原性を調べることはできなかった。

最近、KadoらはAmesテスト（preincubation法）の変法で高感度の得られるmicrosuspension法を考案し²³⁾²⁴⁾、喫煙者、非喫煙者の尿の変異原性を調べている。この方法はAmesテストに比べ10倍～30倍の検出感度（従って、試料の量は1/30～1/10で済む）が得られ、極微量の試料の変異原性を調べることが可能である。その後、Löfrothら、Lewtasら、Matsushitaらは、この方法を室内空気、個人暴露調査などに適用し、いくつかの興味ある知見を得ている。

本報では、このmicrosuspension法の概要について述べるとともに、いくつかの応用例を紹介したい。

2. microsuspension法とは

Amesテストの感度を上げる試みは、これまで多くの研究者によって行われてきた²⁵⁻²⁹⁾³²⁾。例えば、Falckら³⁰⁾はゴム工場労働者の尿の変異原性を検出するためにFluctuationテストを用い有効なことを示した。また、Mohtashamipurら³¹⁾は、木材起源の化学物質についてAmes/fluctuationテストを用いており、この結果をもとに、木材産業労働者の鼻腔癌発生の可能性について論じている。

しかし、これらの試験結果はAmesテストの結果と直接的に比較することは出来ない。また、このようなテストでは多くの繰り返し試験が必要であり、さらに計測まで3～4日を要するなど、必ずしも簡便であるとは言い難い。

Kadoらは試験系をmicro化し、菌と試料との接触確率を高めることにより変異原性の感度を飛躍的に高めることを示した。すなわち、Amesテストを行う際に、試験菌を10倍濃縮し、サンプル量を100 μ lから5 μ lへと1/20にすることにより、感度が約10～30倍活性が上昇すると報告している（microsuspension法）。Fig. 1にmicrosuspension法とAmesテスト（preincubation法）³²⁾および、Amesテスト（原法）を対比して表わした。また、()内に著者らが用いているLewtasらの試験条件³³⁾を示した。microsuspension法では、まず、培養菌液を遠心集菌（10,000 $\times$ g, 10分）し、これを培養菌液の1/10量の0.15Mのリン酸緩衝液（pH7.4）に再懸濁し、10倍濃縮菌液を調製する。一方、滅菌試験管に試料溶液5 μ lを分注しておき、これにS9mix（あるいは、

Fig. 1. microsuspension法と preincubation法, Amesテスト（原法）の概要

* +S9mix の例を示した。-S9mix ではリン酸緩衝液を用いる。

** () 内に著者らが用いている容量を示した。

0.15M リン酸緩衝液)を100 μ l, 10倍濃縮菌液を100 μ lを添加する。これを37℃で90分ブレインキュベーションした後、軟寒天2mlを重層し、37℃で2昼夜インキュベーションし、出現した復帰変異コロニーを計測する。

我々が用いている Lewtas らの変法³³⁾には、いくつかの改良点がみられる。すなわちサンプル量は5 μ l $\rightarrow$ 2 μ l, 濃縮菌液は100 μ l $\rightarrow$ 50 μ l, S9mix (あるいは、緩衝液)は、100 μ l $\rightarrow$ 50 μ lと容量を1/2に縮小している。また、緩衝液も0.15M リン酸ナトリウム緩衝液に代えて、0.015M リン酸緩衝液を用いている。後述)。

試料の分注は低容量専用 (0.5~10 μ) のマイクロピペットを用いれば比較的容易に行うことが可能であるが、データのばらつきを生じやすいことから、我々の研究室では溶媒転換法を用いている。すなわち、試料を2% dichloromethane (DCM)/ジメチルスルフォキシド (DMSO) の混合溶媒に溶解し、これを試料液として、100 μ l ずつ滅菌試験管に分注する。これを37℃で15~20分間、保温しDCMを留去し、残ったDMSO層 (2 μ l) を試験に用いる方法で、比較的安定した結果を得ている。

Table 1 に化学種変異原を用いた場合の、microsuspension 法と Ames テスト (原法) の検出感度の比較を示した⁴⁸⁾。microsuspension 法は原法に比べ10倍 (B(a)P) から31倍 (2-nitrofluorene) 検出感度が高いことがわかる。また、microsuspension 法では約10倍の試験菌が添加されているにもかかわらず、自然復帰変異コロニー数には殆ど差が認められていない。これは、自然復帰変異コロニー数が培地中のヒスチジン量に依存しているためと考えられている。Fig. 2 に大気浮遊粉塵抽出物について microsuspension 法と Ames テスト (原法) による用量-反応曲線を比較して示した⁴⁸⁾。S9mix の添加の有無にかかわらず、microsuspension 法は原法に比べ

約10倍検出感度が高くなっていることがわかる。すなわち、原法では+S9mix, -S9mix で、各々、6 rev/m³, 3 rev/m³ の変異原性しか得られないのに対し、microsuspension 法では、60 rev/m³, 26 rev/m³ の変異原性が得られている。

ブレインキュベーション時の菌濃度と response について、Kado ら²³⁾は喫煙者の尿の XDA-2 樹脂吸着物を用いて検討を行い、1 $\times$ 10⁹/ml が最適濃度であるとしている。一方、DeMarini ら³³⁾は、5倍濃縮菌液と10倍濃縮菌液で差は認められないとしている。

Fig. 3 に大気浮遊粉塵抽出物について菌の濃縮倍率と response との関係を示した³⁸⁾。培養原液から30倍濃縮菌液までの異なった濃縮倍率の菌液を用いて試験を行った結果、菌の最適濃度は7 $\times$ 10⁸~1.4 $\times$ 10⁹、濃縮倍率で10~20倍であることがわかった。コールタールにおいてもほぼ同様の結果を得られたことから、著者らは10倍菌液を用いることにしている。

DeMarini ら^{33,34)}は試験菌の濃縮、および-S9mix の系で用いる緩衝液について検討している。調べた緩衝液は Vogel Bonner 培地 (VBE), 0.15M, および0.015M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) の3種類で試験時の生菌数と復帰変異コロニー数を計測している。その結果、0.15M リン酸緩衝液、VBE を用いた場合の菌の生存率は23~35%であるのに対して、0.015M リン酸緩衝液を用いた場合は89%と高くなることを示している。また、1-nitropyrene (1-NP) やディーゼルエンジン排出物などの直接変異原については、0.015M リン酸ナトリウム緩衝液やVBEを用いた方が0.15M リン酸緩衝液を用いた場合よりも2~3倍高くなることを示している。これは、0.15M リン酸緩衝液の細胞毒性によると述べている。一方、2-aminoanthracene や環境タバコ煙 (ETS)

Table 1 Comparative Mutagenic Activity of Mutagens in the Plate Incorporation and Microsuspension Procedures⁴⁸⁾

Chemical	Specific mutagenic activity ^a (TA98 rev/nmol)		
	Plate incorporation	Microsuspension	Increase in sensitivity
Benzo(a)pyrene	93 (371/1 μ g) ^b	907 (378/0.1 μ g) ^b	10
2-aminofluorene	199 (573/0.5 μ g) ^b	2,460 (455/0.025 μ g) ^b	13
2-nitrofluorene	61 (633/2 μ g) ^b	1,940 (874/0.05 μ g) ^b	31
4-nitroquinoline-n-oxide	103 (217/0.33 μ g) ^b	1,800 (656/0.067 μ g) ^b	18

^aDetermined from the linear portion of the dose-response curve from a single experiment $r^2 > .84$.

^bMean net revertants per plate (numerator) at dose indicated (denominator). Dose is from the linear portion of the dose-response curve. Spontaneous revertants mean $\pm$ SD: plate incorporation = 27 $\pm$ 3 (+S9) and 25 $\pm$ 8 (-S9); Microsuspension = 33 $\pm$ 5 (+S9) and 17 (-S9).

Fig. 2. Dose-response curves for composite high-volume air particle extract. Determined using the plate incorporation test and micro-suspension procedure a) with and b) without rat liver S9.⁴⁸⁾

などの間接変異原に関しては、どの緩衝液もほぼ同等の結果が得られている。これらの結果から、LewtasらのグループはKadoの原法にある0.15Mのリン酸ナトリウム緩衝液に代えて0.015Mの緩衝液を用いている。一方、Löfrothら³⁵⁾のグループは0.015Mリン酸緩衝液とほぼ同等の結果が得られるVBEを用いている。

ところで、Amesテストでは通常、復帰変異コロニーの培養に2～3日を要している。有元ら^{36,37)}はコロニーの生育を早め、試験に要する期間を短縮するために“アミノ酸添加グルコース最少寒天培地”を考案した。プレートは“グルコース最少寒天培地”にGly, Alaなど15種類のアミノ酸を含むものである。このプレートを大気浮遊粉塵抽出物のmicrosuspension法に使用した結果をTable 2に示した³⁸⁾。アミノ酸添加グルコース

Fig. 3. Effect of population of TA98 bacterial cells on the number of revertants.³⁸⁾

○ ○ : TA98, -S9mix
● ● : TA98, +S9mix

Airborne particulates collected in Sendai in December, 1987 was used as a test sample. The 0.05mg of airborne particle extract was used per each tube. Preparation procedure was previously reported. Bacteria were grown overnight to a approximately 1.4×10^9 cells/ml. The optimal number of bacteria per assay near $7 \times 10^8 \sim 1.4 \times 10^9$ (50 μ l of a 1.4×10^{10} bacteria per ml NaPB solution).

最少寒天培地”を用いた場合 (accelerated micro-suspension法) には復帰変異コロニーの生育が加速されており、18～24時間で計測が可能になることがわかる。

microsuspension法は菌濃度と試料濃度を変えたものであり、各化学物質、菌種に関して、基本的にはAmesテストの場合と同様のresponseを示すと考えられる。

Table 3にaccelerated microsuspension法を用いた場合の、TA98NR (TA98のnitroreductase欠損菌株)、および、TA98/1, 8-DNP₆ (o-acetyltransferase欠損菌株) に対する各変異原のresponseを示した³⁸⁾。2-nitrofluoreneおよび、1-nitropyreneはTA98, -S9mixで強い変異原性を示したが、TA98NRに対してはコロニー数の減少が認められ、Rosenkrantzら³⁹⁾の報告とほぼ同様の結果が得られている。また、大気浮遊粉塵抽出物については、TA98NR, TA98/1, 8-DNP₆の復帰変異コロニー数はTA98のほぼ1/2に減少したことから、ニトロ化

Table 2 Comparison of the numbers of revertant colonies between accelerated microsuspension procedure (AMS) and microsuspension procedure (MS).³⁸⁾

1)TA98, +S9mix				2)TA98, -S9mix			
parti- culate extract (mg/plate)	AMS at the incu- bation period of		MS at 48h	parti- culate extract (mg/plate)	AMS at the incu- bation period of		MS at 48h
	18h	24h			18h	24h	
0	12	12	16	0	13	13	18
0.0125	36	37	45	0.0125	103	103	111
0.025	62	64	54	0.025	140	141	136
0.05	87	89	97	0.05	164	164	158
0.10	182	184	174	0.10	137	139	144

- a) In accelerated microsuspension procedure (AMS), amino acids enriched base was used instead of original minimal glucose-agar base.
- b) Airborne particulate collected in Sendai in December, 1987 was used as a test sample. Extraction procedure was previously reported.

Table 3 Comparison of direct-acting mutagenic activity of 2-nitrofluorene, 1-nitropyrene and composite Sendai hi. vol. air filter extract for TA98, TA98NR and TA98/1, 8-DNP₆ as determined by the accelerated microsuspension procedure.³⁸⁾

	(revertants/plate)		
	TA98	TA98NR	TA98/1, 8-DNP ₆
Blank	23	20	13
2-nitrofluorene(0.5 μ g)	909	168	565
1-nitropyrene(0.05n mol)	1744	77	1611
airborne particulate extract(0.05mg)	602	349	310

芳香族炭化水素（ニトロアレール）を含むことが示唆される。

ところで、最近、nitroreductase 高生産性プラスミド (pYG216) や acetyltransferase 高生産性プラスミド (pYG219) を TA 株に導入した菌株 (YG 株) が、渡辺ら^{40,41)}によって開発されている (Table 4)。これらの菌株はニトロアレールや芳香族アミンに高い感受性を示すことが知られている。このような高感受性菌株を microsuspension 法と組み合わせることにより環境汚染計測に利用しようとする試みが後藤ら^{42,43)}によって行われている。YG 株としては pYG219 を TA98 に導入した YG1024, TA100 に導入した YG1029, pYG216 を TA98 に導入した YG1021, TA100 に導入した YG1026 の 4 種類がよく知られている。Fig. 4 に YG1024, YG1029 を microsuspension 法に用いた場合の浮遊粉塵試料の変異原性試験の結果を示した。併せて各 YG 株の親株 (TA98,

Table 4 新しい形質転換株とその名称

名称	宿主	(プラスミド)
YG1020	TA98	(pBR322-Ap ^s)
YG1021	TA98	(pYG216)
YG1024	TA98	(pYG219)
YG1025	TA100	(pBR322-Ap ^s)
YG1026	TA100	(pYG216)
YG1029	TA100	(pYG219)

TA100) を用いた場合の preincubation 法の結果を示した。microsuspension 法/YG1029 と preincubation 法/TA100 を比較すると約 35 倍、microsuspension 法/YG1024 と preincubatio 法/TA98 を比べると約 56 倍の感

Fig. 4. YG系菌株 / microsuspension法及びTA系菌株 / preincubation法による大気浮遊粉じん試料の変異原性。⁴²⁾

● : microsuspension 法
▲ : preincubation 法

度上昇が認められている。前述のとおり YG 株はニトロアレーンなどに高い感受性を示す菌であることから、このような物質を含む環境試料の計測に本法は有効であると考えられる。

3. 環境大気汚染調査

大気中には $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ にわたるさまざまな浮遊粒子状物質が存在している。これらを Ames テストを用いて調べるには、少なくとも 20mg 程度の粉塵量が必要であり、空気量に換算して約 $300 \sim 400\text{m}^3$ 程度の空気の吸引が必要となる。したがって、変異原性試験用の大気浮遊粉塵の採取には、通常はハイボリュームエアサンプラー (HV) を用いることが多い。HV は毎分 $500 \sim 1500 \ell$ の空気の吸引が可能であり、24時間捕集で試験に必要な粉塵量を採取することができる。

一方、ローボリューム (アンダーセン) エアサンプラー (LV) は、粒系分布などを調べる際に、しばしば用いられるが、吸引流量が $15 \sim 50 \ell / \text{分}$ と比較的少なく、変異原性試験を行うためには $10 \sim 30$ 日と長期間のサンプリングが必要となる。しかし、このように長期間にわたり大量の空気を吸引する場合には、①粉塵中の揮発性物質がろ紙上で揮散すること、②捕集した粒子がろ紙表面で化学変化することが考えられる⁴⁴⁻⁴⁷⁾。

Pitts⁷⁾、Hisamatsu^{45,46)}、Tokiwa⁴⁷⁾らは多環芳香族炭化水素が二酸化窒素やオゾンなどによって、ニトロ体やオキシ体に容易に変換することを示しており、試料採取時にもこのような化学変化が実際に起きる可能性のあることが指摘されている。したがって、浮遊粉塵の

Fig. 5. Diurnal variation of mutagenicity of fine airborne particles collected in Berkeley, California, and measured in the microsuspension procedure a) with and b) without addition of rat liver S9.⁴⁸⁾

変異原性を正確に調べるには、このような artifact の生成を抑える必要がある、そのためにはサンプリング時間を短くする必要がある。変異原性試験の高感度化法 (例えば、microsuspension 法) はこのような場合に有効な手段となる。

また、microsuspension 法は変異原性粒子状物質の粒系分布や個人暴露量測定など、得られるサンプル量が少ない場合に有用である。

Kado⁴⁸⁾はサンフランシスコ湾岸地区の3ヶ所で浮遊粉塵の変異原性の時間変動を調べている (Fig. 5)。粉塵はLVを用い $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微細粒子、 $2.5 \mu\text{m}$ 以上の粗大粒子に分けて、2時間ごとに採取している。その結果、変異原性は+S9mixの方が-S9mixよりも強く、さらに、 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微細粒子の変異原性が粗大粒子よりも強いことがわかった。また、変異原性のピークは、Redoでは午前10時~12時、午後8時~9時、Berkeleyでは午前10~12時、午後9時~午前12時と車のラッシュ時よりやや遅かった。しかし、粉塵中の鉛含有量と変異

原性が強い正の相関性を示したことから、汚染源は車であるとしている。

松本ら⁴⁹⁾は *microsuspension* 法を用いて環境大気中の浮遊粒子状物質の変異原性の粒系分布を求めている。ローボリューアンダーセンエアサンプラーを用い、平均流量28ℓ/分で3～6日の間、9段の分級捕集を行っている。浮遊粒子状物質の変異原性は、Kadoらの報告と同じく微細粒子(1μm以下)が最も強く、2μm以上の粒子ではわずかしめ認められていない。また、粒子の変異原性と多環芳香族炭化水素濃度はほぼ同じ傾向を示したが、完全な一致は認められていない。

環境大気中の粒子状画分と揮発性画分の変異原性について、著者ら⁵⁰⁾は石英フィルターとSEP-PAK C₁₈カートリッジ組み合わせて、それぞれを捕集し、*microsuspension* 法を用いて assay を行っている。

Bellら⁵¹⁾は、*microsuspension* 法を用いて、まきストーブ煙中の粒子状物質の光化学反応生成物の変異原性について調べている。すなわち、NO_xが0.05ppm以下の実験チャンバー内で、温度、湿度条件を変えて、粉塵中に含まれる多環芳香族炭化水素の残存量を調べた。温度、湿度の高い条件下では極性成分が多くなることがわかり、変異原性も約15倍上昇した。この多くがニトロ化芳香族炭化水素(ニトロアレール)によることが確認された。

以上のように、*microsuspension* 法は試料量が少ない場合に有効である。今後、化学分析と併用することにより、環境変異原の分析、同定で有効な手段となる可能性がある。

4. 室内空気汚染調査

米国科学アカデミー⁵²⁾の報告によれば、我々是一日の約90%(夏季:85.6%, 冬季:94.8%)を室内で過ごしているといわれており、室内空気汚染の重要性が注目されている。特に、発癌関連物質による室内空気汚染は近年急増しつつある肺癌発生との関連性の上で公衆衛生上重要な意味をもっている。しかし、室内空気を変異原性を指標に評価しようとする試みは比較的少ない。その原因として、室内空気中の浮遊粒子状物質の量が環境大気中の量に比べ1/50～1/1000と非常に少なく、変異原性試験に必要な試料量を採取できないことがあげられる。

室内空気の変異原性については、Löfroth, Lewtasら、Matsushitaら、Kadoらによって調査が行われてきた。

Löfrothら⁵³⁾はAmesテスト(原法)を用い、室内空気汚染における喫煙の影響を調べている。粉塵の採取は主流煙については自動喫煙装置を、副流煙についてはMedium volume air sampler(MV:170ℓ/分)および、空気清浄機(1500ℓ/分)を用いている。しかし、変異

原性試験としてAmesテスト(原法)を用いる場合には、副流煙のサンプリングに14日間を要し、非常な困難が伴う。

そこで、Ling, Löfrothら⁵⁷⁾は環境大気の場合と同様に、*microsuspension* 法を室内空気汚染調査に適用し、本法が有効なことを確認している。環境試料の採取にはパーソナルサンプラーを用い、2ℓ/分のスピードで、8時間ガラス繊維上に粉塵を採取した。この方法を用い、室内空気汚染においてタバコ煙が非常に大きく影響していることを示した。

Löfrothら⁵⁴⁾は、また、タバコ煙では塩基性画分の変異原性が全体の約50～70%を占めており、一般環境大気に比べ非常に高いことを示した(Table 5)。タバコ煙の指標としては、ニコチンが用いられているが、ニコチンは物質の表面に吸着しやすいため、タバコ煙による室内空気汚染を過少評価している可能性がある。これらのことから、タバコ煙の指標としては、塩基性画分の変異原性も有効であることを示している。

ところで、わが国の成人の喫煙率は主要先進国中(概ね、25～35%)では群を抜いて高く、男性約60.5%、女性14.3%(平成2年5月、(株)JT調べ)に達している。また、推計喫煙人口も男性2,600万人、女性600万人に達しており、室内環境がタバコ煙で絶えず汚染されていることもめずらしくない。

著者ら⁵⁵⁾は、室内空気の汚染源としてのタバコ煙の影響を調べる目的で、仙台市内の一般家庭で調査を行った。試料は1989年の2月の一週間、同一家庭の居間、台所、屋外で各24時間ずつ採取した。サンプリングには室内用低騒音サンプラー(20ℓ/分、50dB以下)を用いた。居間の空気中の粉塵量は喫煙日と非喫煙日で最大27倍(270μg/m³～9.5μg/m³)の変動が認められた。同じ期間中の台所、屋外の粉塵量の変動は、それぞれ5倍、7倍であった。一方、変異原性は居間では喫煙日と非喫煙日で81倍の差が認められたが、台所では10倍、屋外では5倍であり、喫煙が非常に大きく影響していることが推察された。

タバコ煙中の発癌物質の量は主流煙よりも副流煙の方がはるかに多いことから、非喫煙者の受動喫煙による健康被害が注目されている⁵⁶⁾。

Lingら⁵⁷⁾はタバコの受動喫煙の影響について *microsuspension* 法を用いて調べている。粉塵の採取は喫煙者のいるアパートおよび事務室において電池駆動のパーソナルサンプラーを用いた。サンプラーは2ℓ/分の速度で吸引し、8時間試料採取を行っている。この調査ではアパートで3,200rev/m³、事務室では400rev/m³の変異原性(TA98, +S9mix)が検出されている。

Löfrothら^{58,59)}はタバコ煙をはじめ、調理の煙、お香、蚊取り線香の煙、等の変異原性を *microsuspension* 法で調

Table 5 Mutagenic Response in TA98 of Unfractionated and Fractionated Extracts of Cigarette Sidestream Particulate Tar and an Urban Particulate Matter Sample in The Regular Plate Incorporation Assay and Microsuspension Assay and The Activity of Concurrent Positive Control Compounds ⁵⁴⁾

Sample	Unit	Plate incorporation			Microsuspension	
		-S9	+S9-4%	+S9-10%	-S9	+S9-10%
<i>Sidestream smoke</i> ^a	Rev./cig.					
Crude extract		2700	- ^c	37000	70000	240000
Basic fraction		1000	-	25000	26000	110000
Non-basic fraction		1500	-	5400	19000	75000
<i>Urban particulates</i> ^b	Rev./mg					
Crude fraction		450	520	-	3000	4200
Basic fraction		20	30	-	100	120
Non-basic fraction		460	430	-	2700	2200
<i>Positive controls</i>	Rev./plate					
5.0 μ g quercetin		-	-	-	257	-
25.0 μ g quercetin		318	-	-	-	-
0.5 μ g benzo[a]pyrene		-	-	-	-	267
2.5 μ g benzo[a]pyrene		-	385	207	-	-
<i>Spontaneous control</i>	Rev./plate	26	33	36	26	36

^a The responses have been evaluated with 6 doses in the range 0.001-0.1 cig./plate in the plate incorporation and in the range 0.00025-0.024 cig./plate in the microsuspension assay.

^b The responses have been evaluated with 6 doses in the range 25-1600 μ g/plate for both assays.

^c -, not tested.

Fig. 6. Daily variations of airborne particulate concentration (μ g/ m^3) and mutagenic activity (revertants/ m^3) of airborne particulate extracts in indoor ⁵⁵⁾

—●— : living room, —△— : kitchen,
—○— : outdoor

べている。各々の煙の変異原性 (+S9mix) は、タバコで 200,000~350,000rev/g、お香で 40,000~140,000rev/g、蚊取り線香では 150,000rev/g であった。しかし、豚の挽き肉をフライにする際に出る煙は 500rev/g であり比較的弱いものだった。しかし、調理の煙については不明な点が多く、さらに検討を要すると述べている。

室内空気汚染に関する調査としては、この他、モビルホームに関する報告 ⁶⁰⁾、微細粒子 (<10 μ m) の個人暴露量と室内空気汚染との関係について論じたもの ⁶¹⁾、環境タバコ煙の特性について述べたもの ^{62,63)} などがある。

ところで、室内中の浮遊粉塵の採取には通常、各種のサンプラーが用いられているが、室内において長時間にわたって粉塵を採取する場合には、ポンプの発する音が日常生活を送る上で非常な障害となる。著者ら ³⁸⁾ は、室内空気汚染の状況を大まかに知る手段として、エアコンの除塵フィルターに附着した粉塵に着目し、その変異原性を調べた。附着している粉塵量が極微量であることから試験は microsuspension 法を用いた。また、試験期間の短縮化を図るために、前述の "アミノ酸添加最少グルコース寒天培地" を用いた。研究所内の 6 ケ所のエアコンの除塵フィルターに附着した粉塵の変異原性を調べた結果、喫煙室の粉塵が最も強く、次いで、執務室、原子吸光室、ガスクロ室、等の順だった。また、変異原性、粉塵抽出物量、benzo (a) pyrene 含有量とも各部

屋における火の使用頻度と強い正の相関性が認められた。エアコンのフィルターに付着した粉塵を試料とする事は、室内空気汚染の定量的な評価ができないという欠点はあるものの、汚染を大まかに把握する上で有効であろうと考えられた。

5. 尿を用いた個人暴露量調査

ヒトの尿の変異原性をモニターすることは、環境変異原による暴露評価を行う上で非常に重要である。これまで、喫煙、薬物投与、職業的暴露に伴う、尿変異原性のモニタリングが、Amesテストにより行われてきた⁶⁴⁻⁶⁶⁾。しかし非暴露群の尿は殆どが検出限界以下で、変異原性は認められず、尿の変異原性のバックグランド値を正確に求めるに至っていない。

前記のとおり、Kadoら²³⁾はmicrosuspension法を考案し、喫煙者、非喫煙者の尿を比較し、有意に差が認められることを示した。また、非喫煙者の尿は明らかに実験ブランク値(蒸留水)より高く($P < 0.005$)、本法がバックグランド値を求めるのに有効であることを示した。さらにKadoらは、尿中変異原をXAD-2樹脂に吸着させたものについて、その変異原性を調べている。その結果、軽度の喫煙者では、喫煙開始後、4～5時間で変異原性が増加し、バックグランド値にもどるまで12時間を要することを明らかにした。一方、ヘビースモーカーでは、18時間を要している。この研究から、タバコ煙中の変異原は3～5時間で体内に吸収され、その後、一次関数的に減少することが示された(半減期:約7時間)。

Williamsら⁶⁷⁾は、試験に用いる尿の保存試験にmicrosuspension法を用いている。喫煙者の尿を -80°C で175日間、凍結保存した場合の変異原性の安定性について調べ、統計的に変化の認められないことを示した。

Doolittleら⁶⁸⁾は、ラットを用い、喫煙と変異原の尿中排泄についてmicrosuspension法を用いて調べている。ラットではタバコ煙濃縮物(CSC)を腹腔内投与、経口投与した場合に、尿の変異原性の上昇が認められている。しかし、タバコ煙を呼吸器系から吸入した場合には、尿の変異原性の上昇は認められなかった。このことから、喫煙と変異原の尿中排泄の関係を調べるのに、ラットは適さないと結論付けている。Doolittleら⁶⁹⁾は、また強い変異原性を有する2-acetylaminofluorene(AAF)をラットに経口投与した場合の尿の変異原性を調べている。この場合には、薬剤の投与量に依存して尿の変異原性の上昇を認めた。

ところで、ディーゼルエンジン排出物は強い変異原性をもつことが知られており、ヒト肺ガンの発生の増加要因のひとつとなっていることが指摘されている。

Schenkerら⁷⁰⁾は、鉄道労働者を対象にディーゼルエンジン排出物の個人暴露量を明らかにする目的で

microsuspension法を用い尿の変異原性を計測している。浮遊粒子状物質はディーゼルエンジン排出物として特徴的ではあるが、環境中にタバコ煙が存在する場合には攪乱要因となり、ディーゼル汚染の指標にはなりえない。一方、phenanthreneはディーゼル排出物暴露量と強い正の相関性が認められており、変異原性も疫学研究の有効な手段になりうると述べている。

Hamiltonら⁷¹⁾は、変異原の尿中排泄と癌予防の関係について興味深い報告を行っている。十字架植物の野菜はアフラトキシンB₁(AFB₁)による肝癌の予防に役立つことが知られている。しかし、その機構については明らかではない。Hamiltonら⁷¹⁾は、十字架植物のひとつである芽キャベツをFischer-344ラットに与えた場合の、AFB₁の尿中排泄をmicrosuspension法を用いて調べている。AFB₁投与前に芽キャベツを含むエサ(BSAD:20%の凍結乾燥品を含む)を与えたラットは、芽キャベツを与えない場合に比べ、尿の変異原性が約5倍強かった(TA100, +S9mix)。一方、BSDAを与えたラットでは肝細胞のArylhydrocarbon hydroxylase(AHH), Aldrin epoxidase(ALD), 7-ethoxy coumarin o-deethylase(7-EOD)の活性が数倍増加していた。これらの結果から十字架植物の肝癌予防作用は、代謝酵素の誘導と、それに伴う無毒化、排泄作用に起因する可能性を指摘している。

6. その他

1) 一般環境水域の汚染調査

環境水域の変異原性調査は富田ら²⁾、内海ら⁷⁴⁾、Maruoka^{75,76)}などによって主にAmesテスト(原法)を使って行われている。しかし、環境水中の変異原物質の量は微量であることから、比較的清浄な水域の変異原性をモニタリングするには、高感度な試験法の利用が必要となる。

著者らは仙台市内を流れる河川の変異原物質汚染調査にmicrosuspension法を用いた。河川水中の変異原物質の吸着回収には早津ら^{72,73)}のブルーレーヨンを用いている。ブルーレーヨンやブルーコットンは銅フタロシアニン誘導体をリガンドとして持つ固体吸着剤で、3環系以上の縮合芳香環をもつ化合物を特異的に吸着することが知られている。最近、この吸着剤は尿、食品、水中の変異原物質の捕集に多用されている。

ブルーレーヨン吸着物についてmicrosuspension法を行った結果⁷⁷⁾、preincubation法と比べ約5倍(+S9mix)程度、感度が高くなることがわかり、本法は微量の試料を扱うのに有用なことがわかった。さらに、変異原性と化学的酸素要求量(COD)などとの関係を調べた結果、両者に相関性は認められなかった。このことは、従来の水質汚染指標で水中の変異原性の有無を予測できないこと

を示しており、変異原性を指標とした環境水域の汚染評価の重要性を示唆している。

2) 高速液体クロマトグラフィーによる変異原物質の分画

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により環境試料を分画精製し、変異原性の強い画分について、GC-MSやFT-IRなどを用いて、環境変異原の構造を調べる試みが行われている。この方法は環境中に無数に存在する環境変異原を同定する上で非常に有効な手段となっている。

しかし、変異原性試験を行うためには、HPLCで分取できる物質の量が極めて微量であるため、試料の量を大量に集めるか、高感度な assay 法を用いる必要がある。

Tokiwa ら⁷⁸⁾は、石油ストーブなどの燃焼生成物について HPLC を用い、変異原の分画を行い、ジニトロピレン類の分離同定を行っている。HPLC は各変異原を分離するために30秒ごとに分取し、変異原性試験に必要な試料量を確保するために、この操作を少なくとも10回以上、繰り返し行っている⁷⁹⁾。

Hisamatsu ら^{45,46)}は二酸化窒素存在下におけるピレンの光化学反応生成物の変異原の構造決定を行う際に、同じく HPLC を繰り返し行い、変異原性画分をプールしている。

Alheim らは、まきストーブ燃焼物を HPLC で分画し、その変異原性を調べている。この際、通常広く用いられている100mmのシャーレに代えて、60mmφの小型シャーレを用いている。

Bagley ら⁸⁰⁾は60mmφ×15mmの小型シャーレを用い、microsuspension 法を行っている。ソフトアガーとして0.7ml、グルコース最少寒天培地は10mlを用いている。Standard Reference Material (SRM) を用いた試験から、この方法を用いることにより、通常の Ames テストに比べ、サンプル量は約1/20で済むとしている。

この他にも、分取用 HPLC を用いる方法、シャーレ数を1用量1枚としたものなど、種々の方法が用いられている。

Lewtas ら⁸¹⁾は1-nitropyrene (1-NP) の代謝物を HPLC で分画し、その変異原性を microsuspension 法によって調べている (HPLC/microsuspension 法) (図7)。カラムは、Zorbax ODS (9.4×50mm) を用い、メタノール-水 (60-100%, 1%/分) のグラジエントをかけて溶出している。この実験では用量が2nmol 以上では変異原性に直線性が見られなかったため、試験は各画分中の代謝物濃度が2nmol になるようにして行っている。物質量は内部標準として添加した¹⁴C-1-NP から求めている。各画分はバイアルに分取した後2μlのDMSOを添加し、窒素気流下、37℃で濃縮し、溶媒転換をし、これを試験までの間-80℃で保存している。各画分の変異原

性はUV吸収およびRIのカウント (d.p.m) の HPLC パターンとよく対応している。

King ら⁸²⁾は、ヒト、ラット、マウスの腸内細菌による1-NPの代謝について、HPLC/microsuspension 法を用いて比較している。その結果、1-NP は1-aminopyrene, N-acetyl-1-aminopyrene, N-formyl-1-aminopyrene および、2種の未同定の代謝物に分解することがわかった。また、腸内細菌による分解に関しては特に大きな種差は認められていない。

以上のように、microsuspension 法は、HPLC で分画したフラクションをプールすることなく直接試験できるという点で非常にすぐれた試験法である。この方法を用いることにより、今後、環境中に存在する数々の変異原物質の同定が容易になると考えられる。

7. おわりに

以上のように microsuspension 法は少量の濃縮菌液と少量の試料を用いることにより試料と試験菌との接触確率を高め、Ames テストの感度上昇を計ったものである。microsuspension 法は Ames テストと比べ、以下のような利点が挙げられる。

- ①高感度であり、試料の量が少なくて済む。
- ②S9、補酵素の量が約1/10で済み、経済性が高い。
- ③”アミノ酸添加グルコース最少寒天培地”を用いた場合、試験期間を約半分にすることができる。

しかし、microsuspension 法の一番大きなメリットは、この方法が Ames テストの変法であるため、Ames テストとの相関性が高く、Ames テストのデータベースがそのまま利用できるという点にある。

Ames テストは復帰変異 (back mutation) を測定するものであるが、逆に前進変異 (forward mutation) を測定する方法の改良を Lewtas⁸³⁾、後藤ら⁸⁴⁾が行っている。

前進変異は一般に、復帰変異に比べ感度がいいといわれているが、Lewtas、後藤ら⁸³⁾はさらにこれを micro 化することにより (micro-forward mutation テスト)、Ames テストに比べて約10倍、感度が上昇することを確認した。その結果、20l/分、24時間サンプリングでも室内空気の変異原性を測定できることを示した。高木、後藤ら^{85,86)}はこの方法をさらに micro 化することにより (ultramicro-forward mutation テスト)、Ames テストより約100倍、感度が上昇することを認めている。この方法を用いることによって、パーソナルサンプラーによる個人試料の変異原性の測定が可能になった。後藤ら^{88,89)}は、この方法を応用することによって、吸気と吐息中の粒子状物質の変異原性を比較することにより、変異原性粒子状物質の肺内沈着量の測定を試みている。

一般に、forward mutation テストは操作が難しく、Ames テストより多くの労力を必要とする。すなわち、

Fig. 7. Mutagenicity of rabbit lung S9-generated metabolites of [^{14}C] 1-NP as measured in strain TA98 in the presence and absence of S9. When adequate amounts of ^{14}C were present per fraction, each fraction was normalized to contain 2 nmol ^{14}C . The net rev/plate are plotted and were obtained by subtracting the DMSO control values from those produced by each HPLC fraction. DMSO control values (rev/plate) were 47 (–S9) and 75 (+S9).⁸¹⁾

Amesテストにおいては研究者一人当たり一日で200～300枚のプレート进行处理することが可能であるが、forward mutationテストの処理枚数は一日当たり20～30枚が限度といわれている。これはforward mutationテストでは、変異数/生菌数（mutation frequency）を求める必要があるため、これが、このテストの普及を妨げる原因のひとつとなっている。

本文中でもたびたび述べたとおり、高感度変異原生試験の開発は個人暴露量評価や少量の環境試料を扱う際に不可欠である。現在、さまざまな方法が提示されてきて

おり、まだ、開発途上の感が強い。しかし、今後、さらに信頼性の高い試験法が考案されれば、発癌関連物質のリスク評価の上で非常に大きな武器になっていくものと思われる。

要 旨

環境中の極微量の試料の変異原性を調べるには、高感度な試験法が必要となる。本報では、Amesテストの変法で高い感度の得られるmicrosuspension法についてについて概説し、その応用例を紹介した。

microsuspension法は試験菌を10倍濃縮し、試料と菌

との接触確率を高め、感度の上昇を計ったものである。この方法はAmesテストと比べ、約10倍程度高感度であり、それだけ試験に用いる試料の量も少なくて済む。また、S9mix量が1/10～1/5で済むことから、経済性にも優れている。しかし、最も大きな利点は、micro-suspension法がAmesテストの変法であるという点で、これまで、世界各国で行われてきたAmesテストの膨大なデータベースを活用することができる。

本法によって、大気浮遊粉塵の変異原性の時間計測、粒系分布や室内空気汚染計測が可能になり、さらに、種々の個人暴露量調査を行うことが可能になった。特に、尿中変異原を指標とした個人暴露量調査では、micro-suspension法が重要な役割を果たしている。

変異原性試験の高感度化法は、現在、開発途上にあるが、さらに信頼性の高い方法が開発されれば、発癌関連物質のリスクアセスメントを行う上で大きなメリットを持つと考えられる。

文 献

- Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian-microsome mutagenicity test., *Mutation Res.*, Vol. **31**, 347-364, (1975)
- 富田基郎, 真鍋 仁, 浜田 昭: 河川水および塩素処理水の変異原性について, 水質汚濁研究, Vol. **3**, 187-192, (1980)
- Cheh, A.M., Skochdopole, J., Koski, P. and Cole, L.: Non-volatile Mutagens in drinking water: Production by chlorination and destruction by sulfite., *Science*, Vol. **207**, 90-92, (1980)
- Honer, W.G., Ashwood-Smith, M.J. and Warby, C.: Mutagenic activity of swimming-pool water., *Mutation Research*, Vol. **78**, 137-144, (1980)
- Talcott, R., and Wei, E.: Brief communication: Airborne mutagens bioassayed in *Salmonella typhimurium*., *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. **58**, 449-451, (1977)
- Tokiwa, H., Morita, K., Takeyoshi, H., Takahashi, H., Ohnishi, Y.: Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants., *Mutation Research*, Vol. **48**, 237-248, (1977)
- Pitts, J.M., Cauwenberghe, K.A.V., Grosjean, D., Schmid, J.P. and Fitz, D.R.: Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science*, Vol. **202**, 515-519, (1978)
- Tokiwa, H., Kitamori, S., Takahashi, K. and Ohnishi, Y.: Mutagenic and chemical assay of extracts of air borne particulates. *Mutation Research*, Vol. **77**, 99-108, (1980)
- Ohnishi, Y., Okazaki, H., Wakisaka, K., Kinouchi, T., Kikuchi, T. and Furuya, K.: Mutagenicity of particulates in small engine exhaust. *Mutation Research*, Vol. **103**, 251-256, (1982)
- 大江武: 大気浮遊粉じん中タールの突然変異原性に関する研究 - *Salmonella typhimurium* TA98およびTA100による年間を通じての測定結果., 日本公衆衛生学会誌, Vol. **29**, 261-272, (1982)
- 後藤純雄, 加藤幸彦, 折井章子, 田中一彦, 久松由東, 松下秀鶴: 大気浮遊粉じんの経日変動, 大気汚染学会誌, Vol. **17**, 295-303, (1982)
- Takahashi, Y., Nagao, M., Fujino, T., Yamaizumi, Z. and Sugimura, T.: Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids., *Mutation Research*, Vol. **68**, 117-123, (1979)
- Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Seino, Y., Honda, M., Matsukura, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Tsuji, K. and Kosuge, T.: Mutagens in foods, especially pyrolysis products of protein., pp259-264, "Progress in Genetic Toxicology" Edited by Scott, D., Bridges, B.A., Bridges, F.H. and Sobels, Elsevier / North Holland, Amsterdam, (1977)
- Commoner, B., Vithayathil, A.J., Dolara, P., Nair, S., Madyastha, P. and Cuca, G.C.: Formation of mutagens in beef and beef extract in cooking. *Science*, Vol. **201**, 913-916, (1978)
- 環境庁大気保全局委託業務報告書「大気汚染に係わる重金属等による長期暴露影響(遅発性影響)評価の手法に関する調査研究(変異原性調査) - 昭和63年度結果報告書」, 結核予防会結核研究所など
- 清水英祐: サルモネラ菌を用いる変異原性試験の規格化について, 第30回大気汚染学会講演要旨集, p145 (1989)
- Tamakawa, K., Takahashi, Y., Mishima, Y., Seki, T. and Tsunoda, A.: Mutagenicity of road-coating-materials., *Rep. Sendai Munic. Inst. Publ. Hlth.*, Vol. **13**, 246-256, (1983)
- 玉川勝美, 高橋陽子, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行: 仙台誌における道路体積土砂の変異原性とベンゾ(a)ピレン含有量: スパイクタイヤ粉塵の影響, 衛生化学, Vol. **31**, 329-333, (1985)
- 玉川勝美, 久松由東, 松下秀鶴: 二酸化窒素存在下におけるアスファルトの光化学反応生成物の変異原性, 大気汚染学会誌, Vol. **21**, 521-526, (1986)
- 玉川勝美, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行, 久松由東, 松下秀鶴: アスファルトタールによるベンゾ(a)ピレンの変異活性抑制作用: ベンゾ(a)-3-水酸化酢

- 素の阻害, 衛生化学, Vol. **32**, 344-349, (1986)
- 21) 玉川勝美, 相原良之, 高橋陽子, 関 敏彦: 大気浮遊粉塵の変異原性の季節変動: スパイクタイヤによるアスファルト粉塵の影響, 大気汚染学会誌, Vol. **23**, (1988)
 - 22) Tamakawa, K., Takahashi, Y., Seki, T., Tsunoda, A. and Matsushita, H.: Synergistic and / or antagonistic effects of asphalt on the mutagenic activity of 1-nitropyrene., *Rep. Sendai Munic. Inst. Publ. Hlth.*, Vol. **19**, 304-312, (1989)
 - 23) Kado, N.Y., Langley, D. and Eisenstadt, E.: A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay: Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Res.*, Vol. **121**, 25-32, (1983)
 - 24) 玉川勝美: 変異原性試験のmicro化による室内空気汚染の評価. 環境研究, Vol. **69**, 155-165, (1988)
 - 25) Gletten, F., Weeks, V. and Brusick, D.: In vitro metabolic activation of chemical mutagens: I. Development of an in vitro mutagenicity assay using liver microsomal enzymes for the activation of dimethylnitrosamine to a mutagen. *Mutation Research*, Vol. **28**, 113-122, (1975)
 - 26) Green, M.H.L., Bridges, B.A., Rogers, A.M., Horspool, G., Muriel, W.J., Bridges, J.W. and Fry, J.R.: Mutation screening by simplified bacterial fluctuation test: Use of microsomal preparation and whole liver cells for metabolic activation. *Mutation Research*, Vol. **48**, 287-294, (1977)
 - 27) Mallig, H.V.: Dimethylnitrosamine: Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsome. *Mutation Research*, Vol. **13**, 425-429, (1977)
 - 28) Andrew, A.W., Thibault, L.H. and Lijinsky, W.: The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, Vol. **51**, 311-318, (1978)
 - 29) Mitchell, I. de G.: Microbial assays for mutagenicity: A modified liquid culture method compared to the agar plate system for precision and sensitivity. *Mutation Research*, Vol. **54**, 1-16, (1978)
 - 30) Falck, K., Sousa, M. and Vainio, H.: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutation Research*, Vol. **79**, 45-52, (1980)
 - 31) Mohtashamipour, E. and Norpoth, K.: Non-mutagenicity of some wood related compounds in the bacterial / microsome plate incorporation and microsuspension assays., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Vol. **54**, 83-90, (1984)
 - 32) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*., *Mutation Research*, Vol. **48**, 121-129, (1977)
 - 33) DeMarini, D.M., Dallas, M.M. and Lewtas, J.: Cytotoxicity and effect on the mutagenicity of buffers in a microsuspension assay. *Tetragenes, Carcinogenesis, and mutagenesis*, Vol. **9**, 287-295, (1989)
 - 34) Dallas, M.M., Forehand, L.R. and DeMarini, D.M.: Cytotoxicity of three buffers to *Salmonella* strain TA98 in a microsuspension of reverse mutation assay and the effect of three buffers on the mutagenic potencies of complex mixtures and pure compounds. Genotoxicity and Environmental Mutagen Society, Fifth Annual Meeting, Program and Abstracts, 21p, (1987)
 - 35) Löfroth, G., Ling, P.I. and Agurell, E.: Public exposure to environmental tobacco smoke. *Mutation Res.*, Vol. **202**, 103-110, (1988)
 - 36) 有元佐賀恵, 根岸和雄, 早津彦哉: 「せっかち Ames 法」について, 環境変異原研究, Vol. **3**, 51, (1981)
 - 37) Arimoto, S., Negishi, K. and Hayatsu, H.: A modification of the Ames test procedure: Accelerated growth of the His revertants. *Mutation Res.*, Vol. **91**, 407-411, (1981)
 - 38) 玉川勝美, 松本久美子, 高橋陽子, 関 敏彦, Lewtas, J.: 高感度 Ames テスト (accelerated microsuspension 法) の室内空気汚染計測への適用 - エアコンの除塵フィルターに付着した粉塵の変異原性 - . 大気汚染学会誌, Vol. **24**, No. 1, 37-44, (1989)
 - 39) Rosenkranz, H.S. and Mermelstein, R.: Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: All nitro-containing chemicals were not created equal., *Mutation Research*, Vol. **114**, 217-267, (1983)
 - 40) Watanabe, M., Nohmi, T. and Ishidate, M. Jr.: New Tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. **147**, 974-979, (1987)
 - 41) Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase over-producing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 AND TA100, *Mutation Res.*, Vol. **216**, 211-220, (1989)
 - 42) 後藤純雄: 遺伝子工学的手法を用いたサルモネラ指標菌株の開発と応用 - Microsuspension 法及び

- Spiral assay 法への応用 - 環境変異原研究, Vol.12, 67-74, (1990)
- 43) 松下秀鶴, 後藤純雄, 田辺 潔, 遠藤 治, 小谷野道子, 杉田和俊: YG 株による大気浮遊粉塵の変異原性. 日本環境変異原学会第19回大会抄録集, p168, (福岡, 1990)
 - 44) Peters,J. and Seifert,B.: Losses of benzo (a) pyrene under the conditions of high-volume sam pling., *Atoms. Environ.*, Vol. **14**, 117-119, (1980)
 - 45) Hisamatsu,Y., Nishimura,T., Tanabe,K. and Matsushita: Mutagenicity of the photochemical reaction products of pyrene with nitrogen dioxide. *Mutation Res.*, Vol. **172**, 19-27, (1986)
 - 46) 久松由東, 山口麻美, 斎藤裕之, 門井守夫, 松下秀鶴: フルオランテンとの光化学反応生成物の変異原性. 第31回大気汚染学会講演要旨集, p560, (金沢, 1990)
 - 47) Tokiwa,H., Nakagawa,R., Morita,K. and Ohnishi,Y.: Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide., *Mutation Research*, Vol. **85**, 195-205, (1981)
 - 48) Kado,N.Y., Guirsius,G.N., Flessel,C.P., Chan,R.C., Chang,K. and Wesolowski,J.: Mutagenicity of fine ($< 2.5 \mu m$) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environmental Mutagenesis*, Vol. **8**, 53-66, (1986)
 - 49) 松本 理, 安藤 満, 田村憲治, 片桐和子: 高感度 Ames テストによる年大気浮遊粒子状物質の変異原性の粒系別分布. 日本薬学会第111年会要旨集, p174, (東京, 1991)
 - 50) 玉川勝美, 関 敏彦: 環境大気中の粒子状物質と揮発性物質の変異原性. 第31回大気汚染学会講演要旨集, p561, (金沢, 1990)
 - 51) Bell,D.A.: The effect of atomospheric photoreaction on the mutagenicity of chemical fractions from wood smoke particle extracts. *Diss.Abstr.Int.*, Vol. **49**, No.12, 5208, (1989)
 - 52) National Academy of Science: Indoor Pollutants., Washington D.C., National Research Council (1981)
 - 53) Löfroth,G. Nilsson,L. and Alfheim,I.: Passive smoking and urban air pollution: Salmonella /microsome mutagenicity assays of simultaneously collected indoor and outdoor particulate matter. pp515-525, "Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III "Edited by Waters,M.D., Sandhu,S.S., Lewtas,J., Claxton,L. Chernoff,N. and Nesnow,S., Plenum Press, New York (1983)
 - 54) Löfroth,G., Ling,P.I., and Agurell: Public exposure to environmental tobacco smoke. *Mutation Research*, Vol. **202**, 103-110, (1988)
 - 55) 玉川勝美, 高橋陽子, 関 敏彦, 角田 行, 後藤純雄, 松下秀鶴: 高感度変異原性試験 (microsuspension 法) による室内空気汚染の評価 - 仙台市における室内空気汚染調査, 仙台市衛生試験所報, Vol. **18**, 273-283, (1989)
 - 56) Stock,S.L.: Risks the passive smokers runs. *The Lancet*, Vol. **II**, 1082, (1980)
 - 57) Ling,P.I., Löfroth,G. and Lewtas,J.: Mutagenic determination of passive smoking. *Toxicology Letters*, Vol. **35**, 147-151, (1987)
 - 58) Löfroth,G. and Stensman,C.: Common and uncommon indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter. *Mutation and the Environment, Part E*, 21-30, (1990)
 - 59) Löfroth,G., Stensman,C. and Brandhorst-Satzkorn,M.: Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. *Mutation Res.*, Vol. **261**, 21 : 26, (1991)
 - 60) Mumford,J.L., Lewtas,J., Burton,R.M., Svendsgaard, D.B. and Houk,V.S.: Unvented kerosine heater emissions in mobile homes: Studies on indoor air particles, semivolatile organics, cabon monooxide, and mutagenicity. pp257-262, "Indoor Air '90, Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate", (Toronto, 29 July-3 August, 1990)
 - 61) Kado,N.Y.: Indoor-outdoor and personal mutagenic activity associated with particles less than $10 \mu m$ aerodynamic diameter (PM10) in nonsmokers' homes, pp305-310, "Indoor Air '90, Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate", (Toronto, 29 July-3 August, 1990)
 - 62) Kado,N.Y., McCurdy,S.A., Tesluk,S.J., Hammond,S.K., Hsieh,D.P.H., Jones,J. and Schenker,M.B.: Mesuring personal exposure to airborne mutagens andnicotine in environmental tobacco smoke. *Mutation Res.*, Vol. **261**, 75-82, (1991)
 - 63) Löfroth,G., Burton,R.M., Forehand,L., Hammond,K., Seila,R.L., Zweidinger,R.B. and Lewtas,J.: Characterization of environmental tobacco smoke. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. **23**, 610-614, (1989)
 - 64) Yamasaki,E. and Ames,B.N.: Concentration of mutagens from urine by absorption with the non polar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. **74**,

- 3555-3559, (1977)
- 65) Aeschbacher, H.U. and Chappuis: Nonmutagenicity of urine from coffee drinkers compared with that from cigarette smokers, *Mutation Research*, Vol. **89**, 161-177, (1981)
 - 66) Kriebel, D., Henry, J., Gold, J.C., Bronsdon, A. and Commoner, B.: The mutagenicity of cigarette smokers' urine. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, Vol. **6**, 157-170, (1985)
 - 67) Williams, R.W., Watts, R., Inmon, J., Pasley, T. and Claxton, L.: Stability of the mutagenicity in stored cigarette smokers' urine and extract. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. **16**, 246-249, (1990)
 - 68) Doolittle, D.J., Rahn, C.A. and Lee, C.K.: The effect of exposure to nicotine, carbon mono-oxide, cigarette smoke or cigarette smoke condensate on the mutagenicity of rat urine. *Mutation Res.*, Vol. **260**, 9-18, (1991)
 - 69) Doolittle, D.J., Lee, D.A. and Rahn, C.A.: The use of rat urine extracted on XAD-2 resin and assayed in a microsuspension-modified Ames test as an in vivo indicator of genotoxic exposure., *Mutation Research*, Vol. **206**, 141-148, (1988)
 - 70) Schenker, M.B., Samuels, S.J., Kado, N.Y., Hammond, S.K., Smith, T.J. and Woskie, S.R.: Markers of exposure to diesel exhaust in railroad workers. *Res. Rep. Health Eff. Inst.*, Vol. **33**, 1-64, (1990)
 - 71) Hamilton, C., Allen, K., Holmes, R., Bakke, J., Garin, K., Steinmetz, K., Stoewsand, G. and Mirsalis, J.: The effect of dietary *Brussels Sprouts* on metabolism, S-phase synthesis, and genotoxicity of aflatoxin B₁ (meeting abstract), *Environmental Mutagenesis*, Vol. **15** (Suppl. 17), 24, (1990)
 - 72) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H. and Arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfocopper-phthalocyanine, *Mutation Research*, Vol. **119**, 233-238, (1983)
 - 73) 早津彦彦: 青綿を用いる環境変異原の検出法. 環境変異原研究, Vol. **6**, 117-124, (1984)
 - 74) 内海英雄, 濱田 昭, 早津彦彦, 橋本徳蔵, 相沢靖: 河川水中変異原性の季節・流域変動—青綿法による検討および従来の水質汚濁指標との比較, 水質汚濁研究, Vol. **13**, No. 4, 227-234, (1990)
 - 75) Maruoka, S. and Yamanaka, S.: Comparative studies using the Ames Salmonella / microsome test on mutagenicity of the XAD extract recovered from the river waters in Kyoto city. *Environmental Science & Technology*, Vol. **17**, 177-180, (1983)
 - 76) Maruoka, S. and Yamanaka, S.: Mutagenicity in Salmonella typhimurium tester strains of XAD-2 extract, recovered from Katsura River water in Kyoto city, and its fractions. *Mutation Research*, Vol. **102**, 13-26, (1982)
 - 77) 玉川勝美, 高畑寿太郎, 相原良之, 関 敏彦: 高感度 Ames テスト (microsuspension 法) による一般環境水域の汚染調査. 仙台市衛生研究所報, Vol. **20**, (印刷中)
 - 78) Tokiwa, H., Nakagawa, R. and Horikawa, K.: Mutagenic / carcinogenic agents in indoor pollutants: the dinitropyrenes generated by kerosine heaters and fuel gas liquefied petroleum gas burner. *Mutation Res.*, Vol. **157**, 39-47, (1985)
 - 79) 世良暢之, 堀川和美, 甲斐麻美子, 村上光一, 常磐寛: 大気粒子状物質からのジニトロベンツピレンの検出とその性質. 日本環境変異原学会第19回大会抄録集, p166, (福岡, 1990)
 - 80) Bagley, S.T., Stoltz, S.L. and Becker, D.M.: Characterization of organic extracts from standard reference materials 1649-urban dust / organics and 1650-diesel particulate matter using a modified micro-suspension assay. "IPCS Collaborative Study on Complex Mixtures, Abstract Booklet", (Rome, Italy, Nov. 5-10, 1990)
 - 81) Lewtas, J., King, L.C., Williams, K., Ball, L.M., and DeMarini, D.M.: Bioassay-directed fractionation of 1-nitropyrene metabolites: generation of mutagrams by coupling reverse-phase HPLC with micro-suspension assays. *Mutagenesis*, Vol. **5**, No. 5, 481-489, (1990)
 - 82) King, L.C., Kohan, M.J., George, S.E., Lewtas, J. and Claxton, L.D.: Metabolism of 1-nitropyrene by human, rat, and mouse intestinal flora: mutagenicity of isolated metabolites by direct analysis of HPLC fractions with a microsuspension reverse mutation assay. *J. Toxicol. Environ. Health*, Vol. **31**, No. 3, 179-192, (1990)
 - 83) Lewtas, J., Goto, S., Williams, K., Chuang, J.C., Peterson, B.A. and Wilson, N.K.: The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilotfield study: Application and evaluation of new methodologies. *Atmospheric Environment*, Vol. **21**, No. 2, 443-449, (1987)
 - 84) 高木敬彦, 後藤純雄, 村田元秀, 松下秀鶴, Lewtas, J.: 室内空気浮遊粒子の変異原性測定への microforward-mutation 法の適用, 大気汚染学会誌, Vol. **23**, 24-31, (1988)
 - 85) 高木敬彦, 後藤純雄, 郭 錦堂, 杉田佐和子, 松下

- 秀鶴, Lewtas J.: Ultramicro forward mutation 法を用いた微量室内空気浮遊粒子の変異原性. 大気汚染学会誌, Vol.24, 244-251, (1989)
- 86) Goto,S., Takagi,Y., Endo,O., Lewtas,J. and Matsushita,H.: Highly sensitive bioassays for evaluating airborne mutagens indoors. pp163-168, "Indoor Air '90, Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate", (Toronto, 29 July-3 August, 1990)
- 87) 小林敬二, 後藤純雄, 遠藤 治, 石井忠浩, Lewtas,J., 松下秀鶴: 個人暴露空気浮遊粒子試料の変異原性(Ⅱ), 日本環境変異原学会第19回大会抄録集, p166, (福岡, 1990)
- 88) 福田裕子, 後藤純雄, 遠藤 治, 田辺 潔, 小谷野美智子, 片山 敬, 松下秀鶴: 空気中の変異原性浮遊粒子の肺内沈着量の測定法. 日本環境変異原学会第19回大会抄録集, (福岡, 1990)
- 89) 後藤純雄, 遠藤 治, 田辺 潔, 小谷野道子, 松下秀鶴: 空気中の変異原性粒子状物質の肺内沈着率の測定に関する研究. 第32回大気汚染学会講演要旨集, (印刷中)(北九州, 1991)
- 90) Matsushita,H., Goto,S., Endo,O., Tanabe,K. and Koyano,M.: Biological and chemical methodologies for assessing human exposure to airborne mutagens indoors. pp225-230, "Indoor Air '90, Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate", (Toronto, 29 July-3 August, 1990)
- 91) 松下秀鶴: 空気中の変異原の暴露評価. 環境変異原研究, Vol.12, 47-55, (1990)