〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (5) 268-274 (1984)

水中フルオランテンの塩素処理時における挙動と変異原性

高橋淳子,^a 木村栄作,^a 岩原繁雄,^a安藤正典,^b 佐谷戸安好^b財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所^a国立衛生試験所^bMutagenicity of Reaction Product and Reaction between
Fluoranthene and Aqueous ChlorineATSUKO TAKAHASHI,^a EISAKU KIMURA,^a SHIGEO IWAHARA,^aMASANORI ANDO,^b and YASUYOSHI SAYATO^b*Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center,^a**729-5, Ochiai, Hadano 257, Japan and National Institute**of Hygienic Sciences,^b 1-18-1, Kamiyoga,**Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan*

(Received January 27, 1984)

Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) with chlorine were examined under various conditions. The chlorination products of fluoranthene were fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC) with a ultraviolet (UV) detector. The structure of each fraction separated by HPLC was analyzed by gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS), and the mutagenicity of each fraction tested by the Ames *Salmonella* assay.

1) Eleven products were obtained by the above procedure and extracted with *n*-hexane. 2) The formation rate of chlorinated substances varied with changes in pH, chlorine concentration and temperature. 3) The fraction of peak No. 5 was found to be a substituted product of fluoranthene by chloro- and hydroxy-group by GC-MS. That of peak No. 7 was mono-chloro-fluoranthene, peak No. 10, di-chloro-fluoranthene and peak No. 11, tri-chloro-fluoranthene. The fractions of peaks 1, 2, 3 and 4 could not be determined precisely by GC-MS, but were considered to be substances produced by the breaking of aromatic carbon rings. 4) The fractions of peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 9 were purified by HPLC and found to be mutagenic toward TA 98 and TA 100 strains in the absence of S-9 Mix. But, in the presence of S-9 Mix, fractions of peaks 1, 2, 7, 10 and 11 were all mutagenic toward TA 98 and TA 100 strains.

The experimental results indicate that many other hydrocarbons in water may be possibly changed to mutagenic compounds by chlorine reactions.

Keywords — chlorination; fluoranthene; polynuclear aromatic hydrocarbons; high performance liquid chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; Ames test; mono-chloro-fluoranthene; di-chloro-fluoranthene; tri-chloro-fluoranthene

緒 言

発癌性を有する多環芳香族炭化水素¹⁾ (以下 PAH と略す) のヒトへの曝露については、今まで大気あるいは

食品を介した曝露の面が問題とされて来た。²⁾ しかしながら、PAH はこれら汚染経路ばかりでなく、水を介した曝露の可能性が示唆されて来ている。すなわち、自

然水域の底質中^{3,4)}には多量の PAH が存在していることが報告されており、特に工場排水の混入の著しい河川水及び底質中には、高い濃度が検出されている。⁵⁾ また、水道水中や東京湾⁶⁾においても PAH の存在が確認され、アメリカ国内10ヵ所の浄水場における原水の調査では、PAH として 300—600 $\mu\text{g/l}$ も含有されていることが報告されている。⁷⁻¹⁰⁾

また、これら原水由来による汚染ばかりでなく、送水管として使われるアスファルト塗装鉄管を通過した水道水中にもアスファルトから溶出した PAH が確認されている。¹¹⁾ このことから、WHOは1983年に、飲料水中 PAH の許容基準を提案している。¹²⁾ このように、水道原水中には、数種類の PAH が含まれているが、その主な PAH は、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾフルオランテン類、フルオランテン、アントラセン、ベリレンなどが確認され、このうちフルオランテンにおいては全 PAH の 2—7 割も占めることが確認されており、PAH の中で常に検出される物質である。^{2,4,10,11)} そこで、著者らは、水道水中にフルオランテンが混入した場合の挙動を検討するため、フルオランテンの塩素処理に伴う変化を衛生化学的見地から、その消長、変化、その化学構造及び変異原性等について検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬 フルオランテン(東京化成)、次亜塩素酸ナトリウム(ツルクロン、有効塩素12%)及びその他の有機試薬(和光純薬)は、すべて特級品を使用した。

2. 試験溶液の調製及び塩素処理 フルオランテン 2g を少量のアセトニトリルに溶解し、更に蒸留水で 100 ml とした。塩素水は、次亜塩素酸ナトリウム 12% を蒸留水で希釈し、遊離塩素濃度を 10 mg/l, 150 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l, 1500 mg/l 及び 2000 mg/l になるよう調製した。なお、本溶液の塩素濃度の測定は、ヨウ素滴定法¹³⁾によった。

塩素処理は、フルオランテン溶液 0.5 ml (10 mg) に塩素水 100 ml (遊離塩素濃度 10—2000 mg/l) を加え、10 N-塩酸で pH 4 に調整し、更に反応温度 20°C, 1 時間反応させた後、それぞれの塩素濃度に応じて 20% チオ硫酸ナトリウム溶液を加えて塩素化反応を停止させた。

反応生成物及び未反応フルオランテンは、*n*-ヘキサン 100 ml で 3 回抽出した。*n*-ヘキサン層は、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、Kuderna-Danish 濃縮器で濃縮を行い、高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC と略す)用試料及び変異原活性測定用試料とした。また、水層についても濃縮を行い、変異原活性測定用試料とした。

3. フルオランテン及び反応生成物の HPLC 反応生成物及びフルオランテンを含む *n*-ヘキサン抽出液は、日立 635 型高速液体クロマトグラフ、日立 200-0520 型フローセル付ダブルビーム分光光度計(254 nm)及び日立 204 S 型蛍光光度計を用いて分析を行った。

カラムは、Merck Lichrosorb RP-18 (10 μm) を平衡スラリー法で 8.0 ϕ mm $\times$ 250 mm のステンレスカラムに充填したものを用いた。移動相は、アセトニトリル+水(60+40)を、流速 3 ml/min, カラム圧力 25 kg/cm² に設定した。

4. HPLC による各フラクションの分取 フルオランテン溶液 0.5 ml (10 mg) に塩素水 100 ml (遊離塩素濃度 2000 mg/l) を加え pH 4 に調整し、反応温度 20°C, 1 時間反応後の Kuderna-Danish 濃縮した *n*-ヘキサン抽出物を 0.5 ml アセトニトリルを加えて溶解し、上記と同一の充填剤を充填した分取カラムに 50 μl ずつ注入し、Table I のごとく各ピークを分画採取した。

次に分取した各ピークの分画溶液は、一定量(各ピークの溶液量の 1/3 容量)の酢酸エチルを加えて抽出し、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、Kuderna-Danish 濃縮器を用いて濃縮を行い、ガスクロマ

TABLE I. The Volume of Mobile Phase Containing Chlorinated Fluoranthene which Were Fractionated by HPLC

Time	Fraction No. (ml)											
	1	2	3	4	F	5	6	7	8	9	10	11
1	5.5	8.2	4.9	7.0	26.0	24.8	7.3	34.8	18.7	33.0	42.0	40.0
2	4.5	9.0	3.8	7.0	22.2	23.6	6.2	32.5	14.8	34.8	33.2	39.0
3	4.7	8.7	4.0	6.5	21.6	20.7	7.4	29.9	16.2	36.5	40.0	41.0
4	5.5	9.8	5.8	5.2	24.5	22.0	8.9	31.2	19.2	34.0	35.6	42.0
5	4.0	9.8	5.0	6.0	23.3	22.0	8.8	33.5	18.0	33.6	37.2	40.7
Total	24.2	45.5	23.5	31.7	117.6	113.1	38.6	161.9	86.9	171.9	188.0	202.7

Column and conditions as mentioned in the text.

トグラフィー・マススペクトロメトリー（以下 GC-MS と略す）用試料及び変異原活性測定用試料とした。

5. GC-MS による HPLC ピークの同定 HPLC によって得た各ピークの Kuderna-Danish 濃縮物は、ガスクロマトグラフ・マススペクトロメトリー島津 LKB 9000B 型を用いて物質の同定を行った。充填剤は、2% SE-52/Gaschrom Q, 80—100 mesh を $3\phi\text{mm} \times 1.0\text{mm}$ ガラスカラムに充填し、分離条件は、カラム温度 170°C 、注入口温度 250°C 、He キャリアーガス流量 30 ml/min で行った。マススペクトロメトリー条件は、イオン化電流 $60\text{ }\mu\text{A}$ 、イオン化電圧 70 eV で行った。

6. 変異原性試験 1) 使用菌株——*Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 の2菌株を用いた。

2) 肝ホモジネートの上清分画 (S-9) の調製——Ames¹⁴⁾らの方法に従って、PCB $500\text{ mg/kg body wt.}$ を投与したラット (SD 系, 雄性, 7 週齢, 体重 210 g , 日本チャールズリバー) から得た肝臓ホモジネートを $9000 \times g$, 20 分遠心後, 上清分画 (S-9) を集めた。更にこの S-9 0.1 ml に MgCl_2 $8\text{ }\mu\text{mol}$, KCl $33\text{ }\mu\text{mol}$, G-6-P (オリエンタル酵母) $5\text{ }\mu\text{mol}$, NADH (オリエンタル酵母) $4\text{ }\mu\text{mol}$, NADPH (オリエンタル酵母) $4\text{ }\mu\text{mol}$, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え, S-9 Mix 1 ml とした。

3) 試験方法——Ames¹⁴⁻¹⁶⁾らの plate 法に準じて行った。DMSO を用いて希釈した試験溶液 0.1 ml , S-9 Mix 0.5 ml または Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml , Nutrient Broth (Difco) を用いて 37°C , 16 時間培養した菌液 0.1 ml 及び L-ヒスチジン 0.045 mM , ビオチン 0.045 mM を含む Top agar 2 ml を小試験管内でよく混合した後, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。そして, 37°C , 48 時間培養し, His⁺ 復帰変異コロニー数 (revertants) を数えた。判定基準は, 対照 (自然復帰変異コロニー数) の2倍以上の変異コロニーを認めた場合に変異原性陽性と判定した。

結 果

1. フルオランテンと塩素との反応

フルオランテン溶液 0.05 ml (1 mg) に塩素水 100 ml (遊離塩素濃度 10 mg/l) を加えて経時的に反応液を n ヘキサン抽出し, HPLC を行ったところ, Fig. 1 に示すごとくフルオランテンは, 1—6 時間で急激に減少することが認められた。しかしながら, 蛍光検出器 (Ex. 370 nm) を用いた場合, フルオランテン自身以外には, 反応生成物の蛍光ピークは検出されなかった。一方, UV 検出器 (254 nm) を使用して反応生成物の HPLC を行ったところ, Fig. 2 に示すごとく 11 のピークが認

Fig. 1. Time Course of Fluoranthene with Cl_2

Reaction condition (fluoranthene 1 mg , Cl_2 10 mg/l , pH 4, 20°C).

Fig. 2. High-Performance Liquid Chromatogram of Chlorinated Substances

Reaction condition (fluoranthene 10 mg , Cl_2 2000 mg/l , pH 4, 1 h , 20°C).

Peaks from No. 1 to No. 11 were kinds of chlorinated fluoranthene mentioned precisely in the text and peak F was unreacted fluoranthene.

められた。

2. フルオランテンと塩素との反応における生成物の挙動

フルオランテン及び遊離塩素濃度を増加させ, フルオランテンの消長と反応生成物の生成条件を HPLC を用いて検討した。すなわち, フルオランテン溶液 0.5 ml (10 mg) に塩素水 100 ml (遊離塩素濃度 2000 mg/l) を加え, 室温 (20°C), 5 時間反応させた場合の pH 変

Fig. 3. Effect of pH on Chlorination of Fluoranthene

Reaction condition (fluoranthene 10 mg, Cl_2 2000 mg/l, 5 h, 20°C).

Peak No. 2, 5, 7 and 10 were chlorinated fluoranthene and peak F was unreacted fluoranthene fractionated by HPLC as previously referred to Fig. 2.

Fig. 4. Effect of Chlorine Concentration on Chlorination of Fluoranthene

Reaction condition (fluoranthene 10 mg, pH 4, 5 h, 20°C).

Peak No. 2, 5, 7, 10 and F the same as in Fig. 3.

化に伴う各ピークの生成量についてみると、Fig. 3 に示したごとくである。その結果、フルオランテンは、pH 8 以上では大部分が未反応で存在しているが、pH の低下と共にフルオランテンが減少していくことが見られ、pH 3 付近ではほとんど存在しないことを示した。一方、反応生成物のパターンは、pH 8 以上ではほとんど存在を認めないのに対し、酸性領域になるに従い、反応生成物の増加が見られ、特に、ピーク 7, 2, 5, 10 はその変化が顕著であることを認めた。

遊離塩素濃度の影響については、Fig. 4 に示すように、遊離塩素濃度が高くなるに従い、フルオランテンは

Fig. 5. Reaction Temperature Dependence on Chlorination of Fluoranthene

Reaction condition (fluoranthene 10 mg, Cl_2 2000 mg/l, pH 4, 5 h).

Peak No. 2, 5, 7, 10 and F the same as in Fig. 3.

Fig. 6. Time Course on Substances Produced from Chlorination of Fluoranthene

Reaction condition (fluoranthene 10 mg, Cl_2 2000 mg/l, pH 4, 20°C).

Peak No. 2, 5, 7 and 10 the same as in Fig. 3.

急激に減少するのが見られた。一方、反応生成物の挙動は、ピーク 5, 7 においては、低遊離塩素濃度で多量に生成するが、更に遊離塩素濃度が増加すると特にピーク 5 は、急激に減少していく特徴あるパターンを示した。また、その他のピークは、遊離塩素濃度 1000 mg/l 以上においてはほぼ一定の生成量が見られた。

各反応温度における各ピークの生成率の変化を Fig. 5 に示す。温度が高くなるに従い、フルオランテンは減少することが見られた。反応生成物のうちピーク 7 は、高温になるに従い、生成量が減少するのが示されたが、他の反応生成物については、反応温度による生成量に大きな

変化は見られなかった。

また、塩素処理に伴う経時変化は、Fig. 6 に示すようにピーク 7 が短時間で多量に生成した後、急激に減少して行くことを認めた。一方、ピーク 2, 10 では 6 時間までは反応生成物は増加したが、その後はほとんど変化は認められなかった。

3. 反応生成物の GC-MS

HPLC による各ピークの画分を Kuderna-Danish 濃縮した GC-MS 用試料に酢酸エチルを加えて溶解し、GC-MS によるマススペクトルの測定を行った。このうち、同定された MS パターンを Fig. 7 に示す。

Fig. 2 のピーク 5 の MS パターンは、Fig. 7-(A) に示すごとく、 m/z 252 は、クロル基 (Cl^{35})、水酸基 (O^{16}H) 置換体のフルオランテンの分子イオンであり、 m/z 236 は、M-OH のフラグメントイオン、 m/z 218 は、M-Cl のフラグメントイオンであると考えられた。

同様に、ピーク 11 に対応する MS パターンは、Fig. 7-(B) に示すごとく、 m/z 304, 306, 308 は、それぞれ 3Cl^{35} , $2\text{Cl}^{35}\cdot\text{Cl}^{37}$, $\text{Cl}^{35}\cdot 2\text{Cl}^{37}$ の置換したトリクロルフルオランテンの分子イオンであり、 m/z 269, 271 は、M-Cl のフラグメントイオン、 m/z 234, 236 は、M-2Cl のフラグメントイオン、 m/z 199 は、M-3Cl のフラグメントイオンであると考えられた。

また、ピーク 10 の MS パターンは、Fig. 7-(C) に示すように、 m/z 270, 272 は、 2Cl^{35} , $\text{Cl}^{35}\cdot\text{Cl}^{37}$ の置換したジクロルフルオランテンの分子イオンであり、 m/z 235 は、M-Cl のフラグメントイオン、 m/z 200 は、M-2Cl のフラグメントイオンであると考えられた。

ピーク 7 の MS パターンを Fig. 7-(D) に示す。すなわち、 m/z 236, 238 は、 Cl^{35} , Cl^{37} の置換したモノクロルフルオランテンの分子イオンであり、 m/z 201 は、M-Cl のフラグメントイオンであると識別された。

また、ピーク 1, 2, 3 及び 4 は、MS スペクトルのみでは、構造決定できないが、環が開裂した可能性が示唆される MS パターンも観察された。

4. 反応生成物の変異原性

反応生成物及び未反応フルオランテンを *n*-ヘキサン抽出した際の水層においては、TA 98 及び TA 100 の菌株を用いて Ames 試験を行ったところ、S-9 Mix の存在の有無にかかわらず、変異原性を示さなかった。一方、*n*-ヘキサン抽出物においては、TA 98 及び TA 100 の両菌株共、Fig. 8 のごとく、S-9 Mix の有無に関係なく、変異コロニーの著明な増加が認められた。

そこで、*n*-ヘキサン抽出物の HPLC から得られた各ピーク画分について、Ames 試験を行い、その結果を

Fig. 7. GC-MS Spectra of Peaks Fractionated by HPLC on Chlorinated Fluoranthene

Peak No. 5, 7, 10 and 11 as referred to Fig. 2 were assigned respectively to A, D, C and B.

Fig. 8. Dose-response Curves on Chlorinated Fluoranthene

With (.....) and without (—) S-9 Mix
Reaction condition (Cl_2 2000 mg/l, pH 4, 1 h, 20°C).

TABLE II. Mutagenicity of HPLC Fractions of Chlorinated Fluoranthene

Fraction No.	No of revertant colonies/plate (mean)											
	TA-100						TA-98					
	S-9 (-)			S-9 (+)			S-9 (-)			S-9 (+)		
1	689	816	(753)	249	271	(260)	1208	1378	(1293)	178	182	(180)
2	514	534	(524)	269	284	(277)	1522	1535	(1529)	356	366	(361)
3	283	324	(304)	142	189	(166)	483	484	(484)	86	111	(99)
4	191	221	(206)	130	154	(142)	211	223	(217)	70	70	(70)
F	127	128	(128)	168	173	(171)	99	102	(101)	54	60	(57)
5	477	494	(486)	165	188	(177)	459	480	(470)	98	101	(100)
6	476	505	(491)	155	164	(160)	163	168	(166)	111	119	(115)
7	145	145	(145)	486	492	(489)	70	81	(76)	288	293	(291)
8	245	275	(260)	180	189	(185)	281	291	(286)	68	91	(80)
9	229	254	(242)	147	157	(152)	174	205	(190)	45	50	(48)
10	107	128	(118)	420	476	(448)	50	63	(57)	107	112	(110)
11	98	118	(108)	434	460	(447)	26	49	(38)	150	157	(154)
Control	95	103	(99)	114	117	(116)	25	37	(31)	42	54	(48)

Dose per plate : 1/10 amount of each fraction was used for the test.

HPLC fractions formed from 5 mg fluoranthene chlorination.

Fraction numbers corresponded to peak numbers in Fig. 2.

Table II に示した。ただし、各ピークの採取量が少ないため、用量依存性についての検討は行わなかった。

両菌株に対して、S-9 Mix の有無にかかわらず、ピーク 1, 2 が、また、S-9 Mix 非存在下では、ピーク 3, 4, 5, 6, 8 及び 9 で変異原性を認めた。また、ピーク 7, 10 及び 11 については、両菌株共に S-9 Mix 存在下において、変異原性を認めた。

考 察

Rook¹⁷⁾ らは、1972 年、塩素処理によって水中有機物がトリハロメタンを生成することを示した。また、塩素処理はトリハロメタン以外にも多くの不揮発有機ハロゲン化合物を生成していることが示されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ このことから、U.S. EPA²⁰⁾ は水中全有機ハロゲン化合物 (TOX) の測定方法を策定し、塩素処理に伴う TOX 生成の実態を明らかにしつつある。この観点から見ると、PAH も塩素処理によって化学変化を受けることが考えられ、Carlson²⁴⁻²⁷⁾ らは、水中に確認される PAH 12 化合物について塩素処理を行ったところ、PAH の塩素化合物が生成することを確認した。しかしながら、塩素処理によって生成した TOX の生体影響等については、研究が着手されたばかりである。すなわち、Grimm-Kiblo,²¹⁾ Grabow²²⁾ あるいは、Loper²³⁾ らは、水道水中の有機塩素化合物を抽出し、これに Ames 試験を行ったところ、塩素処理によって変異原活性が増加することを認めた。このように、塩素処理過程は、水中有機化合物に種々の化学変化をもたらす、生物活性を有する化合

物を生成する可能性が示唆された。

そこで、著者らは PAH としてフルオランテンを取り上げ、その生成条件、副生成物について検討し、生成パターン及び構造の解明を行うと共に、生物活性に対する評価等として、Ames 試験による変異原性を検討した。

Fig. 1 より明らかなごとく、フルオランテンは塩素によって分解消失していることが見られた。そこで、分解物の生成パターンについて検討するため、反応液を *n*-ヘキサン抽出後、HPLC を行ったところ、Fig. 2 のように 11 ものピークが確認された。このように、フルオランテンと塩素との反応は、Carlson²⁴⁻²⁷⁾ らが報告したように、単純な反応による単一物質の生成だけではなく、複雑な反応によって種々の化合物が生成されることを認めた。また、これらピークの構造について GC-MS によって検討したところ、ピーク 5, 7, 10 及び 11 は、フルオランテン骨格に塩素が付加した塩素化物であることを認めた。ピーク 1—4 については、MS フラグメントからフルオランテン環の開裂が示唆された。更に、これらピークの生成条件について検討したところ、Fig. 3, 4, 5 及び 6 のごとく、いずれの場合も酸性領域で生成量が多く、塩素の処理濃度あるいは時間によって生成する物質の割合が異なることを示した。特に、モノクロル置換体であるピーク 5, 7 においては、特異的な生成パターンが見られ、塩素との反応の初期段階に多量生成し、温度、遊離塩素濃度あるいは時間の増加に伴って減少し、他の化合物に変化して行くことが示唆され、フルオラン

テンの塩素化の第1段階と考えられた。

次に、これら反応生成物についての生物活性について検討した。その結果、*n*-ヘキサン抽出した際の水層中には変異原性物質の存在を認めることはできなかったが、*n*-ヘキサン抽出物中には、Fig. 8 に示すごとく Dose response を示す変異原活性が見られた。そこで、*n*-ヘキサン抽出物を HPLC で各々のピークに分画採取し、各ピークについて TA 98 及び TA 100 菌株について S-9 Mix の有無による変異原性を検討した。その結果、Table II のごとく、すべてのピーク画分において、いずれかの Ames 試験の条件で変異原性を有することを観察した。特に、ピーク1及び2においては非常に強く、TA 98 菌株の S-9 Mix の非存在下において他のフルオランテンの塩素化物の変異原活性に比べて数倍も強いことを認めた。

これらの事実より、フルオランテンは塩素処理によって、塩素化物並びにフルオランテン環の開裂したものまで種々の化合物が生成し、しかもこれら化合物は強い変異原性を示すことを認めた。

以上のことより、ベンゾ(*a*)ピレンに代表されるような PAH 発癌物質ばかりでなく、発癌あるいは変異原性を有しない PAH が水中に混入した場合においても、PAH の水処理過程における挙動、生物活性について検討しておくと共に、それらの物質について測定監視して行く必要を有することを認めた。

謝辞 本研究を行うにあたり、GC-MS 測定に協力していただいた(財)食品薬品安全センター 伊東 富晴氏に厚く感謝いたします。

引用文献および注

- 1) J.N. Pitts, Jr., D. Grosjean, T.M. Mischke, *Toxicol. Lett.*, **1**, 65 (1977).
- 2) J.C. Means, S.G. Wood, J.J. Hassett, W.L. Banwart, *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 1524 (1980).
- 3) W. Giger, C. Schaffner, *Anal. Chem.*, **50**, 243 (1978).
- 4) J.J. Black, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 161 (1982).
- 5) R.M. Harrison, R. Perry, R.A. Wellings, *Water Res.*, **9**, 331 (1975).
- 6) 森田昌敏, 三村秀一, 東京衛研年報, **28-1**, 248 (1977).
- 7) D.K. Basu, J. Saxena, *Environ. Sci. Technol.*, **12**, 795 (1978).
- 8) W.M. Lewis, *Water Treat. Exam.*, **24**, 243 (1975).
- 9) J. Borneff, H. Kunte, *Arch. Hyg. (Berlin)*, **148**, 585 (1964).
- 10) A.D. Thruston, Jr., *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 254 (1978).
- 11) H.C. Miller, W.J. Barrett, R.H. James, *J. Am. Water Works Assoc.*, **74**, 151 (1982).
- 12) World Health Organization, "International Standards for Drinking Water" 3rd ed., Geneva, Switzerland, 1971.
- 13) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, 金原出版, 東京, 1980, p. 839.
- 14) B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975).
- 15) B.N. Ames, W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2281 (1973).
- 16) J. McCann, N.E. Spingarn, J. Koborl. B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 979 (1975).
- 17) J.J. Rook, *Water Treat. Exam.*, **21**, 259 (1972).
- 18) J.M. Symons, *J. Am. Water Works Assoc.*, **67**, 634 (1975).
- 19) G.N. Pedygraft, *J. Am. Water Works Assoc.*, **71**, 118 (1979).
- 20) U.S. EPA, Total Organic Halide Method 450, 1, Cincinnati Ohio 45268, Nov. 1980.
- 21) S.M. Grimm-Kibalo, B.A. Glatz, J.S. Fritz, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 188 (1981).
- 22) W.O.K. Grabow, *Water Res.*, **15**, 1037 (1981).
- 23) J.C. Loper, *Mutat. Res.*, **76**, 241 (1980).
- 24) R.M. Carlson, R. Caple, A.R. Oyler, K.J. Welch, D.L. Bodenner, R. Liukkonen, "Water Chlorination," Vol. 2, ed. by R.L. Jolley, Ann Arbor Science, 1978, p. 59.
- 25) P.B.D. Mare, N.V. Klassen, R. Koenigsberger, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 5285.
- 26) P.B.D. Mare, E.A. Johnson, J.S. Lomas, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 5317.
- 27) G. Cum, P.B.D. Mare, M.D. Johnson, *J. Chem. Soc.*, **1967**, 1590.