〈総 説〉

細胞毒性試験による有害化学物質汚染の評価

内海 英雄* 濱田 昭* 大野 泰雄**

Application of Cytotoxicity Test for Toxic Micropollutants

Hideo UTSUMI*, Akira HAMADA* and Yasuo OHNO**

* Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Hatanodai 1-5-8, Shinagawa-ku, Tokyo 142 Japan

** Division of Pharmacology, Biochemical Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158 Japan

Abstract

In environmental water has been reported the occurrence of thousands of chemicals, in which there are many toxic substances including carcinogens. These hazardous micropollutants may be not completely removed by conventional water purification process. To secure the safety of drinking water, it is highly necessary to monitor these toxic substances. For this purpose, simple bio-assay systems such as Ames test have been widely developed to monitor mutagenic micropollutants in water. In the present paper, the principle and limitation of bio-assay system were discussed. Based on the discussion, we examined whether cytotoxicity test is available as bioassay of water micropollutants. Cytotoxicity test using cultured HL-60 cells, liposomal damage test, and Ames mutagenicity test were applied to the substances recovered from tap and raw waters. No correlation was observed between the results of mutagenicity and cytotoxicity, while the results of cytotoxicity related to those of liposomal membrane damage. These results indicate that cytotoxicity tests will be effective to estimate the safety of drinking water and that a concept of cytotoxicity matrix may be available for identification of toxic micropollutants.

Key words : mutagenicity, cytotoxicity, bio-assay, micropollutants, water-safety

1. はじめに

最近、種々の微量の有害化学物質による水環境の汚染が多く報告され、飲料水の安全性確保の意味からその適切な対策が要望されている。しかし、その汚染状況は水系への侵入経路、汚染物質の多様性ともに複雑多岐にわたっており、あらかじめ汚染物質自身が推測できる場合もあれば、廃棄物の焼却処理による生成、農薬等の植物体内や環境中での変化体、また水処理での副成のような複雑な過程で生じる予測困難な汚染物

質が混入する場合もある。さらに廃棄物処分場からの浸出水の場合には廃棄物自身の把握が困難なことも多く、そこに含まれる不揮発性有害微量汚染物質になると定量はおろか定性すら困難な場合がある¹⁾。従って、水環境の質的安全性を高めるためには構造がはっきりしている有害物質以外に、構造が不明あるいは化学分析では簡単には決められない物質についても水環境中の汚染状況を的確に把握し、それらを除去するための対策が必要となる。このためには微量有害汚染物質をその毒性に基づいて評価する生物評価法が有用であ

* 昭和大学薬学部衛生化学 〒142 品川区旗の台1-5-8

** 国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部 〒158 世田谷区上用賀1-18-1

る。しかし、従来 OECD による廃棄物の毒性に対する顧慮も生態毒性に重きをおいてきたこともあり、これまで水環境で用いられてきた生物評価系は生態毒性に主眼をおいたものが多い。一方、最近、有害廃棄物の越境問題に関するバーゼル条約では廃棄物の有害性の定義としてヒトへの毒性も考慮されている点が注目される。本稿ではヒトへの毒性評価という観点から水質汚染物質と生物評価法について全体を捉えると共に、最近我々が検討を進めている培養細胞を用いた細胞毒性試験について水質評価への適用性を考察する。

2. 毒性発現の機序

ヒトへの毒性に基づいた水質評価法を考えるにあたって、まずヒトでの毒性発現の機序を明確にする必要がある。Fig. 1 に有害物質の毒性発現に至る機構を略記した。有害物質による毒性は便宜的に急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性等の一般毒性と催奇形性、発ガン性、皮膚刺激性、免疫毒性などの特殊毒性に分類される。水中の有害物質は消化管などで吸収され血液に移行後、肝臓等で代謝を受け、無毒化されたり、逆に毒化されたりする。もし、有害物質が有効に解毒されない場合や毒化された場合には、標的臓器に達した後臓器の細胞に実質的な障害をもたらす、その障害が修復不可能となった場合に、また、細胞の機能に大きな変化を起こし生物体としての協調に異常を来した場合に個体としての毒性が発現する。ここで、標的細胞での毒性発現機構を分子レベルで解析するためには培養細胞を用いる試験が有用で、しばしば利用されている。

一般に、生体には様々な防御機構や恒常性維持機構があるため、この毒性発現は有害物質がある用量（閾値）以上に達した場合に認められる。従って、体内に

Fig. 1 Mechanism of Toxicity in Whole Body and in Cell

Table 1 Comparison of the Lethal Doses between Mice and Human

Drugs	Mice LD ₅₀	Human LD	Ratio
Scopolamine	163mg/kg	0.13mg/kg	1253
Atropine	90	0.36	250
Dromoran	41	0.39	105
Ouabain	5	0.071	70
Isoflurophate	5	0.11	45
Methadone	16	0.36	44
Methoxamine	30	1.4	21
Nicotine	7	0.35	20

Human LD was estimated from accidental intake or overdose. These values were recalculated from the data of Ekwall (1983)²⁾.

取り込まれた有害物質が有害な状態でどの程度血液中あるいは組織中に存在するか、すなわち血液中濃度や組織内蓄積濃度が重要となる。一方、発ガン性物質では特定の遺伝子に一回でも障害が起こると発ガンに至る可能性があり、この場合には閾値は存在せず、たとえ極く低濃度でも存在しさえすれば有害性を発揮する可能性があると考えられている。

有害物質の毒性は動物の種により大きく異なる。例えば、毒性評価に多用されているマウスにおいても Table 1 に示すように致死量がヒトと大きく異なる場合がある²⁾。従って、毒性発現の有無を評価するには対象とする動物そのものを用いるのが最も良いことは言うまでもないが、それが困難なヒトへの毒性評価にはその物質の毒性発現から見てヒトに近い感受性を有する種を選ぶ必要がある。その際、種は毒物や毒性の種類により異なるのでそれぞれの毒性発現機構を理解した上で動物種の選択を行うことが重要である。

3. 水環境で用いられる生物評価系

Table 2 に水環境で用いられる生物評価系を整理した。多細胞生物を用いた試験、細胞（単離細胞、微生物等）そのものを用いた試験、あるいは細胞内のオルガネラを用いた試験等がある。内容的に分類すると致死毒性物質の混入を判定する緊急試験と慢性毒性物質による長期暴露を判定する試験に大別される。この中で多細胞生物を用いたものは魚や植物あるいは昆虫類を使ってその増殖の程度、あるいは挙動の変化から有害環境汚染物質の侵入を評価しようとするもので生態毒性の面に重点が置かれている^{3),4)}。一方、単一細胞を用いた系では培養細胞試験⁵⁾⁻⁸⁾や酵母⁹⁾を用いたヒトへの一般毒性に注目した評価法もあるが、水環境で最も汎用されているのは Ames 試験^{5),10),11)}やウム試験¹²⁾、レックアッセイ¹³⁾のように、遺伝子障害という観

点から水環境中の変異原性物質を評価するものである。一方、米国環境保護庁で推奨している MICROTOX は海水中の発光バクテリアを用いたもので ATP 合成障害を見る方法である。これと同じ考えで単離したミトコンドリアを用いる方法もある。

Table 2 の生物評価法の多くはいずれも生態影響を評価することに主眼が置かれており、ヒトへの影響を考慮した場合には必ずしも十分とはいえない。例えば、生態毒性試験として OECD 等で提唱されている魚毒性試験では、Table 3 に示すように魚類での薬物代謝活性は通常ウサギ肝の1/10以下であり¹⁴⁾、有害物質に対する感受性も魚と哺乳動物で大きく異なる可能性が高く、魚毒性試験の結果を一義的にヒトへ外挿評価するというわけにはいかない。従って、これまでの生物評価法と異にする試験法、すなわちよりヒトへの外挿により相応しい試験方法を選ぶ必要がある。

Table 2 Bioassay Systems Used for Estimation of Toxic Pollutants in Water

Test System		Endpoints
Organism	Fish	viability
	Plants	growth
	Insects	behavior abnormality
Cells	Cultured Cell	viability, growth biological function chromosomal aberration
	Bacteria	mutagenicity (Ames Test) ATP synthesis (MICROTOX)
	Yeast	viability, growth, mutagenicity
	Algae	growth
Organelle	Mitochondria	MTT reduction
artificial systems	Liposomes	membrane permeability

4. わが国における毒性評価

わが国における化審法では急性毒性というよりも長期暴露した場合のヒトへの毒性を考慮した種々の毒性試験が義務付けられている¹⁵⁾。また、新規化学物質についてはまず、スクリーニング毒性試験として Table 4 に示す2種類の毒性試験が必要である。すなわち、バクテリアや培養細胞による変異原性試験とげっ歯類を用いる28日間の反復投与試験である。また、生産量や環境中での蓄積量に基づき、その他の長期毒性等の試験が行われる。医薬品ではその使用期間に応じた長さの反復投与毒性試験が行われ、その使用目的や薬理学的、毒性学的特性に基づいて発ガン性や依存性などの試験が要求される¹⁶⁾。水環境中の有害物質においてもヒトへの影響という観点から毒性評価を行うためには哺乳動物での反復投与試験や変異原性試験等の結果をもとにした評価が望まれる。しかしながら、動物個体を用いた反復投与試験は長期間を要し、汚染状況が複雑に変化する水試料に適用することは不可能に近い。一方、人体内へ埋挿する医用材料の安全性評価に用いられている生物評価法では、変異原性試験に加えて哺乳動物細胞を用いた細胞毒性試験が提唱されている¹⁷⁾。そこで、水環境中の有害物質に対しても哺乳動物から得た培養細胞を用いた新しい毒性試験を考案し、従来より行われている変異原性試験などと併用することにより有害物質モニタリングの向上を計ることが実際的であると思われる。

5. 個体レベルでの毒性と細胞毒性

Fig. 1 に示すように動物個体での毒性と細胞系での毒性の最も大きな違いは吸収代謝過程の有無である。先に述べたように個体においては吸収代謝された後標的臓器の細胞に作用するのに対して、培養細胞試験では直接細胞に作用する。また、一般的に培養細胞自身の薬物代謝活性も動物個体内での細胞と比べかなり低い。ここで、吸収代謝過程が関係しないような毒性の

Table 3 Hepatic Microsomal Enzyme Activities in Marine Species, Rat, and Rabbit

Species	cytochrome P-450 (nmols • mg protein ⁻¹)	NADPH-cyt. c reductase (nmols • min ⁻¹ • mg protein ⁻¹)	7-ethoxycoumarin O-deethylase (nmols • min ⁻¹ • mg protein ⁻¹)
rat	1.04	70.0	—
rabbit	1.52	48.0	3.5
winter flounder	0.17	—	0.32
sheepshead	0.29	56.0	0.19
mullet	0.47	53.0	0.15
stingray	0.43	49.0	0.08

Table 4 Guidelines for Screening Toxicity Testing of Chemicals in Japan

{ I } 28 days repeated dose toxicity test in mammalian species	
Total; 60 rats male and female rats (5-6 weeks)	
oral administration	
5 rats per each dose group and recovery group	
3 dose levels and control (highest; overt toxic, lowest; non toxic)	
Observation; mortality, body weight,	
food and water consumption,	
hematology, clinical biochemistry of blood, urinalysis,	
pathology (necropsy, organ weight) etc.	
{ II } mutagenicity test	
1. Reverse-mutation assay in bacteria	
Ex.; Ames test with <i>Salmonella typhimurium</i>	
2. Chromosomal aberration test in mammalian cells	
Ex.; Chinese hamster fibroblast cell lines	

場合には細胞毒性は個体レベルでの毒性と良く相関する。例えばドレーズの眼粘膜への刺激性試験結果は培養細胞を用いた代替試験法が良く対応する¹⁸⁾。しかし、多くの場合に吸収代謝過程は密接に毒性と関係していることから、培養細胞を用いた毒性試験の動物個体の毒性評価への応用は限定されている。

一方、有害物質の標的臓器への毒性発現機序を探る上で様々な特性を有する細胞株を適切に用いた細胞毒性試験は非常に有用である。特に、薬物代謝活性が体内にあったときに近い遊離直後の肝細胞や腎細胞等が多く用いられている¹⁹⁾。しかしながら水中汚染物質の場合には標的臓器は必ずしも限定できない。また、水中有害物質はほとんどの場合経口的に摂取されることから吸収代謝経路を無視することは適切でない。従って、水質汚染物質を細胞毒性で評価するに際しては動物実験の代替法という概念ではなく、その特徴を十分生かした形で導入することが必要と考えられる。逆に、細胞そのものを一個の単細胞生物とみなして毒性評価に応用することを考えてもよいであろう。

6. 細胞毒性試験方法

Table 5 に細胞毒性試験方法を毒性発現指標の面から整理した²⁰⁾。最も用いられている毒性指標は細胞の生存率で、その生死の判定には細胞内酵素（乳酸脱水素酵素 (LDH; lactate dehydrogenase など) の遊離⁶⁾や色素の排除試験⁵⁾や取込試験²¹⁾がよく用いられている。この場合には細胞膜の障害による物質透過障壁の崩壊を観察している。

医用材料の分野でも用いられるコロニー形成阻害試験は細胞の増殖が十分に行われているかどうかを判定する方法で、各コロニーは一個の細胞が数百まで分裂した群落で肉眼的に計数できる。従って細胞がただ単

Table 5 Endpoints of Cytotoxicity Tests

toxicity index	methods
viability	dye-exclusion
	dye-uptake
	release of cytoplasmic macromolecules
	morphology
biofunction	uptake of radio-active tracer (protein, DNA synthesis)
	MTT-reduction (function of mitochondria)
	metabolic enzymes (induction of enzyme)
	adhesion activity (cancer promotor etc.)
	generation of active oxygens
	phagocytosis
	chromosomal aberration
cell division (growth)	colony formation

に生きているだけでなく、細胞の生理・生化学的機能が十分保持され、遺伝子の複製を含む増殖機能が十分保たれるとき初めてコロニーを形成する。この場合一過的な障害を受けても修復機構が正常に働けばコロニー形成も可能となる。従って細胞毒性試験としてはコロニー形成阻害試験が最も感受性が高く厳格な毒性評価となろう。

特定の細胞機能を生化学的に調べる方法は毒性発現の機序との関連から、また未知有害物質の大まかな分類を予測する意味からも有用である。細胞機能の指標としてはタンパク質、脂質、核酸等の生体物質の合成能を調べたり、ミトコンドリアによる MTT 還元能、リソゾームへの色素の取込能、糖代謝応答能⁹⁾、薬物代謝酵素の誘導²²⁾なども有効である。さらに、貪食性細

胞⁷⁾や活性酸素産生細胞, 接着性細胞, 分泌性細胞ではその特有の機能を指標に評価できる。培養細胞を用いた変異原性試験やガン原性試験などもある特定の細胞での機能試験の一つとみなされる²⁰⁾。

水環境中の微量有害物質の評価にどの細胞毒性試験が適しているかその選択はおおいに検討を要するであろう。一般的な細胞機能に対する影響を全体としてみうためにはコロニー形成阻害試験が最適であると考えられるが, 個々の生化学的な機能に関する指標や臓器あるいは細胞特異的な機能を指標とする試験方法と組み合わせることによって, 有害物質の大まかな様子を推定することも可能と思われる。

7. 細胞毒性試験の水質評価への適用と今後の課題

我々はこれまで Table 6 に示すような種々の細胞毒性試験を用いて実際に水道原水や環境水の有害汚染物

質の存在を検討してきた^{5)~8)}。その一例として水道原水およびその塩素処理水からの濃縮物での結果を Table 7 に示す⁵⁾。変異原性は有しないものの細胞毒性が認められる試料がかなりある。また, 中塩素処理や急速汜過, 活性炭吸着による除去効率も細胞毒性と変異原性で大きく異なる^{7), 23)}。水中有害物質のヒトへの毒性評価のための生物評価法として, 変異原性試験が

Table 6 Cells Used for Cytotoxicity Test

cells	origin	endpoints
HL-60	human leukemia	morphological change, viability
macrophage	mouse peritoneal	immune response, phagocytosis
hepatocyte	rat liver	metabolism of chemicals
		viability, glucagon responsibility
L929	connective tissue	colony formation assay
liposome	artificial membranes	membrane permeability

Table 7 Comparison among Cytotoxicity, Liposomal Damage and Mutagenicity of Micropollutants in Raw and Tap Water

Sample	methanol			acetone			dichloromethane		
	Liposome	HL-60	Ames	Liposome	HL-60	Ames	Liposome	HL-60	Ames
1-X-R	35%	40	8.5	—	—	—	—	—	—
1-X-T	33	51	4.2	—	—	—	—	—	—
2-X-R	—	64	5.0	—	—	—	—	—	—
2-X-T	—	—	4.6	—	—	—	—	—	—
3-X-R	100	86	22.0	—	—	—	—	—	—
3-X-T	100	75	7.7	—	42	2.5	—	—	—
4-X-R	100	53	2.5	—	—	—	—	36	—
4-X-T	47	84	3.5	—	—	—	—	—	—
5-X-T	100	95	6.5	—	—	—	—	75	—
1-C-R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-C-T	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-C-R	—	—	—	—	—	—	60	38	—
2-C-T	—	—	—	—	—	—	58	52	—
3-C-R	—	—	—	—	—	—	37	51	—
3-C-T	—	—	—	—	—	—	51	36	—
4-C-R	—	—	—	—	—	—	35	48	—
4-C-T	—	—	—	—	—	—	42	65	—

Abbreviation of sample means (sampling time: 1; Oct. 2; Nov. in 1981, 3; Feb. 4; Sep. 5; Oct. in 1982)-(adsorbant: X; XAD-2, C; activated carbon)-(R; raw water, T; chlorinated water).

Symbol “—” in the table indicates no significant difference between the data of sample and negative control (DMSO only). Number in the column of liposome indicates the percentage of carboxy fluorescein released from liposomes after treatment of recovered substances, where 100% is the amount of fluorescein from liposomes after complete lysis and 0% is that of DMSO only. Number in the column of HL-60 is the percentage of dead HL-60 cells which were examined with trypan-blue exclusion test. Number in the column of Ames is the ratio of the revertant number of TA98 with S9mix to those of negative control.

これまで数多く報告されているが、細胞毒性試験の導入は水質の安全性向上に一層寄与するものと期待される。しかし、急性的に毒性を発現する物質のモニタリングにはできるだけ培養時間が短い細胞毒性試験（例えば、24時間急性毒性試験）を用いる必要がある。この場合には魚毒性試験やMICROTOX、リポソームの膜崩壊試験のような必ずしもヒトへの毒性と一義的に対応しないという問題があるものの、より短時間でかつ自動計測できるシステムが必要となろう。従って、細胞毒性試験がより有効となる対象は数時間から数日間の暴露により毒性を発現する微量有害物質ということになる。

細胞毒性試験を水質評価に適用する場合の具体的な利用目的として

- 1) 有害物質汚染の総合評価指標
- 2) 水処理の有効性評価系
- 3) 毒性物質の同定のための予試験

の3つが考えられる。

有害物質の総合評価指標として、あるいはその除去のための水処理法の評価系に適用するうえで最も重要なことは、複数の微量汚染物質が混在したときに細胞毒性試験の測定結果に定量的に反映されるか否かということである。すなわち、1つの微量汚染物質についての定量性は当然であるが、複数種の微量汚染物質が検水中に混在した場合に細胞毒性試験の結果もそれに応じて相加的である必要がある。現在、この複合汚染に関して毒性発現が相加的か相乗的かを含め未解明の点が多い。相乗的な複合汚染があるとすると、単一物質のリスク評価を基にした化学分析だけでは十分でなく、毒性に基づいた生物評価手法が不可欠となる。一方、変異原性試験で示されている抗変異原性物質のように細胞毒性を低減させる物質の存在もありうるであろう。今後、既知の微量汚染物質を用いてその複合汚染を細胞毒性試験の定量性と関連づけて詳細に検討する必要がある。

有害物質の同定のための予試験としては複数種の培養細胞を用いて種々の細胞機能を調べることが有効であろう。先に述べたように、我々はこれまで水中にその存在が報告されている40種の有害化学物質の細胞毒性をヒト白血球由来細胞であるHL-60細胞の生存率、マウス腹腔マクロファージの貪食能、ラット肝実質細胞の生存率とグルカゴン応答能、結合組織由来のL929細胞のコロニー形成阻害により調べてきた。その結果、細胞の種類や評価指標を基にした細胞毒性マトリックスを描いた場合、物質ごとに特徴的な様子を示すことが明らかとなった^{8),24)}。さらに、毒性発現が細胞機能のいずれの欠如に由来するかを調べることでより毒性物

質の特徴が一層はっきりするであろう。従って、この細胞毒性マトリックスをより多くの物質について統計的に作製したならば、そのマトリックスから水系に存在している毒性物質の大まかな分類が可能となるかもしれない。もしそれが可能であれば微量汚染物質の同定に有用となろう。

次に、水環境評価系に複数種の細胞を用いるかあるいは1種類の細胞を用いるかと言う点については、当然標的臓器が異なることから、複数種の細胞を用いることが重要であることに異論はない。しかし、培養細胞系を複数種、常に保存培養するといっても限界がある。特に、水質の総合評価指標に適用する場合には細胞を1つに限定することも必要と思われる。この場合には培養細胞としてHL-60のような非常に特殊な未分化細胞よりも正常に近い状態で保持されている2倍体細胞などが適当であろう。

以上のように細胞毒性試験は水環境の安全性確保の上で評価系として有用と思われるが、試験を行う上で特殊な装置と熟練を必要とする。今後、操作の簡便性、迅速性、高感度化などの点についても考慮した検討が必要であろう。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、種々の有益な御助言をいただいた北里大学薬学部井村伸正教授に謝意を表します。本研究の一部は文部省科学研究費重点領域研究「人間環境系」(N13-01)の補助を受けて行われた。

(原稿受付 1992年6月10日)

(原稿受理 1992年8月10日)

参 考 文 献

- 1) 安原昭夫(1992) 浸出液中の未規制物質, 都市清掃, 45, 36-42.
- 2) Ekwall, B. (1983) Correlation between cytotoxicity *in vitro* and LD50-values, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 52, 80-99.
- 3) Herricks, E.E. (1992) Optimizing bioassay use in environmental management through test system selection, *Water Sci. Tech.*, in press.
- 4) van der Gaag, M.A. (1992) Combined effects of chemicals: An essential element in risk extrapolation for aquatic ecosystems, *Water Sci. Tech.*, in press.
- 5) 内海英雄, 味蓼史麻, 鈴木澄子, 中澤裕之, 藤田昌彦, 濱田昭 (1989) 水中微量汚染物質のマスとしての生物評価法の確立—細胞毒性, 変異原性, 発がんプロモーター活性—, 衛生化学, 35, 273-282.
- 6) Murayama, J., Utsumi, H. and Hamada, A. (1990) Comparative Acute Cytotoxicities of 37 Xenobiotics Detected in Drinking Water to Rat Hepatocyte Primary Culture, *Eisei Kagaku*, 36, 267-276.
- 7) Utsumi, H., Kiyoshige, K., Mitade, C., Han, S.-K., Hakoda, M., Manabe, H. and Hamada, A. (1992) Mutagenicity and Cytotoxicity of Tap and Raw Water and Their Poten-

- tial Risk, *Water Sci. Tech.*, **26**, 247-254.
- 8) Utsumi, H., Hakoda, M., Kiyoshige, K., Manabe, H., Mitade, C., Murayama, J., Han, S.-K. and Hamada, A. (1992) Cytotoxicity and Mutagenicity of Micropollutants in drinking Water, *Water Sci. Tech.*, in press.
- 9) Aoyama, I., Ludo, A. and Veliky, I.A. (1986) Effect of covalt-magnesium interaction on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxicity Asses., Internat. Quart.* **1**, 211-226.
- 10) 内海英雄, 濱田昭 (1987) 安全性評価を指向した新しい水質指標, *水質汚濁研究*, **10**, 86-90.
- 11) 内海英雄, 濱田昭, 早津彦哉, 橋本徳蔵, 相沢靖 (1990) 河川水中変異原活性の季節・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*, **13**, 227-234.
- 12) 小野芳朗, 宗宮功, 河村正純 (1991) 化学酸化処理での反応生成物の遺伝毒性に関する研究, *水質汚濁研究*, **14**, 633-641.
- 13) 松井三郎, 徳川正弘, 小出芳久 (1985) 枯草菌 Rec-assay 液体法による水環境変異原の検出方法, *水質汚濁研究*, **8**, 162-171.
- 14) Bend, J.R., James, M.O. and Pritchard, J.B. (1980) Aquatic toxicology, "Introduction to Environmental Toxicology" (Ed. F.E. Guthrie and J.J. Perry), 172-185, Blackwell Sci. Publ.
- 15) 大森義仁編 (1992) 化審法「毒性試験法の解説」改訂版, 化学工業日報社, 東京.
- 16) 厚生省薬務局新医薬品課監修 (1991) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説1991, 薬事日報社, 東京.
- 17) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.A., Sato, M., Toyoda, K. and Ohsawa, N. (1990) Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials, *Biomaterials*, **11**, 92-94.
- 18) Kennah, H.E. (1989) A critical evaluation of predicting ocularirritancy potential from an *in vitro* cytotoxicity assay, *Fund. Appl. Toxicol.* **12**, 281-290.
- 19) 大野泰雄 (1987) 肝および腎遊離細胞を用いる毒性試験法, トキシコロジーフォーラム, **10**, 144-152.
- 20) 日本組織培養学会編 (1991) 細胞トキシコロジー試験法, 朝倉書店, 東京.
- 21) Kunimoto, M., Aoki, Y., Shibata, K. and Miura, T. (1992) Differential cytotoxicity effects of methylmercury and organotin compounds on mature and immature neuronal cells and non-neuronal cells *in vitro*, *Toxicol. in vitro*, in press.
- 22) Ohno, Y., Hirota, K., Kawanishi, T., Sunouchi, M. and Takanaka, A. (1990) Correlation of *in vitro* and *in vivo* induction of drug metabolizing activities by methylcholanthrene type-inducers, *Alternatives to animal testing and experimentation*, **1**, 51.
- 23) 内海英雄 (1992) 4.6章 健康影響「水処理」(佐藤敦久編), 62-84, 技報堂出版, 東京.
- 24) 清重康二, 内海英雄, 新原智子, 濱田昭 (1992) 微量水中汚染物質による L-929細胞のコロニー形成試験, *水環境学会誌*, **15**, 748-755.