河川底質の変異原性をモニタリングするための基礎的検討(2) —至適 S9 量の検討—

安部 明美* 浦野 紘平**

Fundamental Study on Monitoring of Mutagenicity in River Sediments —Optimum Amounts of S9 for the Ames Mutagenicity Assay—

Akemi ABE* and Kohei URANO**

* Kanagawa Environmental Research Center, Water Quality Division, 842, Nakaharashimajuku, Hiratsuka 254 Japan

** Yokohama National University, Department of Safety and Environmental Engineering, 156, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240 Japan

Abstract

The *Salmonella*/microsome assay (Ames test) is a useful method for screening mutagens in complex environmental mixtures such as river water and sediment. However, no quantitative and generalized method to evaluate mutagenicity of complex mixtures like sediment has yet been established. In this study, the relationships between coexisting substances and the optimum amounts of S9 were investigated for the Ames mutagenicity tests of complex sediment extract. The strain *Salmonella typhimurium* TA98 was used.

o-Phenylphenol (o-PP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), which are commonly found in an aquatic environment, and two kinds of sediment extract were used as model coexisting substances. The sediment extract was prepared by extracting with dichloromethane/ethylalcohol (4:1) and refining with reduced-Cu column. The mixtures of these coexisting substances and a fixed amount of the standard mutagens, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2) or 2-aminofluorene (2-AF), were tested in changing amounts of S9.

Consequently, it was found that the coexistence of o-PP and the sediment extracts shifted the optimum S9 amounts of the standard mutagens and much influence on the results of the mutagenicity test. On addition of 20 μ l of S9, o-PP and sediment extracts gave the toxic influence on the TA98 strain, and was more inhibitory in greater amounts. On addition of 50 μ l, the mutagenicity decreased in the coexistence of over 200 μ g of the sediment extract, though 2-AF showed high mutagenicity in the coexistence of c.a. 100 μ g. It was suggested that the influence was associated with the reactions between S9 and coexisting substance, especially medium polar substances.

Key words: Ames test, coexisting chemicals, mutagenicity, optimum S9 amount, sediment

1. はじめに

近年、合成化学物質の使用量の増加および燃焼や塩

素処理等によって生成する非意図的化學物質による汚染の増加に伴い、飲料水、地下水、河川等の水環境において様々な化学物質による汚染が認められている。

* 神奈川県環境科学センター水質環境部 〒254 平塚市中原下宿842

** 横浜国立大学工学部物質工学科 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156

このため、水環境の安全性を確保するためには、人および水生生物に慢性的あるいは遺伝的な悪影響を及ぼす微量化学物質を監視することが重要になってきている。

Ames 試験法¹⁾は、発がん性物質の短期スクリーニング法として開発された方法であるが、環境試料のような多成分系で、かつ未知の成分を含む微量化学物質の安全性を総括的に評価する手法としても有用であるため、大気中浮遊粉じん、排気ガス、飲料水、河川水、底質等の環境試料に適用されてきている²⁾⁻¹³⁾。

底質の変異原性試験では、TA98株で代謝活性化を行った場合に変異原性の検出頻度が高いこと、しばしば菌に対して致死作用を示す場合があることなどが報告されており、その際、S9 が被検試料の菌に対する毒性を弱める傾向があることが示されている^{14),15)}。

代謝活性化を行う Ames 試験では、S9 量の重要性が指摘されており¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、被検試料ごとに S9 添加量を求める必要がある¹⁹⁾といわれている。しかし、試料の採取や抽出・濃縮に手間がかかり、大量の試料を得ることが困難な環境試料では、その都度 S9 添加量を決めるのは实际的でない。すでに「労働安全衛生法」や「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」で採用されている方法では、プレートあたりの S9 添加量を 25~75 μ l と幅をもたせているものの、通常 50 μ l を使用することとしている。ただし両試験が対象としているのは単一物質である。これに対し、混合試料を対象とした「衛生試験法注解」や「大気浮遊粉じんの変異原性試験マニュアル」²⁰⁾でも、S9 量はプレートあたり 50 μ l を基本としている。

また、底質^{15),21)}や産業廃棄物埋立地浸出水^{22),23)}など共存物の多い試料の変異原性試験では、S9 添加量を従来の 50 μ l より少ないプレートあたり 20 μ l とした報告もある。染谷らは産業廃棄物埋立地浸出水の変異原性試験を行った場合、S9 量が多いと変異原性が失われる場合が認められたので、S9 添加量は 20 μ l としたと述べている。

一方、筆者らは別報²⁴⁾で、数種類の標準変異原物質に代表的な環境化学物質を共存させた場合の変異原性試験を行い、化学物質の共存が変異原性の発現を増強または抑制する場合のあること、これらの影響には化学物質の代謝活性化に用いられるラット肝 S9 の量に関係していると推定されることを報告した。

本研究では、底質抽出物のような多種多量の物質が共存する試料に代謝活性化を含む Ames 試験を適用する場合の最適試験条件を定めるための基礎研究として、S9 量と試験結果との関係をモデル共存化学物質および底質抽出物を用いて検討した。

2. 実 験

2.1 使用薬品

標準変異原性物質としては、和光純薬工業(株)の 3-アミノ-1, 4-ジメチル-5H-ピリド [4,3-*b*] インドール (Trp-p-1)、3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド [4,3-*b*] インドール (Trp-P-2)、ベンゾ [a] ピレン (B[a]P) および Aldrich Chemical Co. Inc. 製の 2-アミノフルオレン (2-AF) を用いた。

モデル共存化学物質としては、水環境中に存在が確認されている o-フェニルフェノール (o-PP) およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) を選んだ。これらは変異原性を示さないが、o-PP は高用量で菌に対する毒性を示すことが報告されている²⁵⁾。なお、o-PP は東京化成(株)製、DEHP はジー・エル・サイエンス(株)製の試薬を用いた。

2.2 底質抽出物の調製

底質抽出物は次のように調製した。底質 50g または 100g (湿重量) に対し 200ml のジクロロメタン/エタノール (4 : 1) を加え、超音波抽出を 20 分間行って抽出液を汙別し、残さに 200ml のジクロロメタンを加えて超音波抽出を繰り返した。抽出液を合わせて乾固し、少量の 10% エタノール/ジクロロメタンに再溶解した。次に、試験菌株に対して致死作用を示す分子状硫黄を除くため、既報¹³⁾に準じて還元銅(キシダ化学製)カラムに通し、得られた通過液を乾固した後、DMSO に溶解して 8 mg $\cdot$ ml⁻¹の抽出物溶液を得た。また、還元銅カラム処理液の乾固物の一部を酢酸エチル/ヘキサン (5 : 95) に溶解しシリカミニカートリッジを通し、通過画分 I と、メタノール/酢酸エチル (1 : 1) による溶出画分 II を得た。

2.3 変異原性試験

上記のモデル共存化学物質または底質抽出物の一定量を標準変異原物質に添加して変異原性試験を行った。

試験菌株にはフレームシフト型突然変異を試験するための *Salmonella typhimurium* TA98 株を用い、試験は労働省の微生物に用いる変異原性試験ガイドブック²⁶⁾を基にしたプレインキュベーション法を用いて行った。S9 mix はフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンで誘導した Rat liver-S9 およびコファクター (共にオリエンタル酵母製) を用い、S9 濃度が 0.4~30% (S9 量としてプレートあたり 2~150 μ l) となるよう調製した。

生菌数試験は、TA98 株の培養液をリン酸緩衝液で 10⁵ 倍に希釈し、ニュートリエントアガー培地を用いて変異原性試験と同様に行った。

両試験とも、対照試験を3プレート、その他の試験を2プレートずつ同時に行って、復帰変異コロニー数の平均値をとった。なお、一部の試験は、独立に2回の試験を行って得た計4枚の復帰変異コロニー数の平均値をとった。

3. 結果と考察

3.1 モデル共存系の至適 S9 量

Maron¹⁹⁾は、最適な変異原性試験結果を得るプレートあたりの S9 量は変異原物質によって異なるが狭い範囲にあり、多すぎても少なすぎても復帰変異コロニー数が減少することを報告している。さらに、試験する物質によって至適 S9 量は異なるが、一般的なスクリーニング試験のためにはプレートあたり20 μ l の S9 添加量が適当であるとし、この S9 濃度でネガティブな結果を得た場合に50 μ l の添加量で再試験するよう提案している。

筆者らが、いくつかの標準変異原物質について、S9 添加量を変えて変異原性試験を行った結果を Fig. 1 に示す。Maron らはアロクロール1254誘導 S9 を用いているが、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで誘導した S9 を用いた本実験の結果でも至適 S9 量の中は10~20 μ l とかなり狭かった。

Malaveille¹⁷⁾らは、S9 量20 μ l 以上での変異原性の低下の理由として、変異原性物質の親電子的な代謝物が過剰な S9 中のタンパク質や細胞質成分の親核部と反応し、試験菌株の DNA との反応を阻害する可能性を指摘している。

しかし、プレートあたりの S9 添加量をそれぞれ20

μ l および50 μ l とした場合の Trp-P-2と2-AF の用量—反応曲線は、Fig. 2 に示すようになり、どちらの場合にもある程度の濃度まで直線関係が成立しており定量的な評価が可能であった。

次に、モデル共存化学物質である o-PP を Trp-P-2 (25ng) または2-AF (2 μ g) と共存させた場合の S9 添加量の影響を、Fig. 3 に示す。変異原性は Trp-P-2または2-AF を単独で試験して得られた最も高い値に対する相対百分率として表した。

Fig. 1 Changes of TA98 revertants with amounts of S9 at a constant dose of standard mutagens (Liver S9 was made from phenobarbital & 5, 6-benzoflavone-induced rats)

Fig. 2 Dose-response curves of Trp-P-2 and 2-AF at the addition of 50 μ l or 20 μ l of S9

Fig. 3 Influences of the coexistence of o-phenylphenol (o-PP) on the optimum S9 amounts for the mutagenicity of Trp-P-2 or 2-AF

(□) 25ng Trp-P-2 without o-PP, (○) 2μg 2-AF without o-PP, (△) with 16.9μg o-PP, (▲) with 169μg o-PP, solid line: net revertants, broken line: survival ratio

Fig. 4 Influences of the coexistence of di-2ethylhexyl phthalate (DEHP) on the optimum S9 amounts for the mutagenicity of Trp-P-2 or 2-AF

(□) 25ng Trp-P-2 without DEHP, (○) 2μg 2-AF without DEHP, (△) with 20μg DEHP, (▲) with 200μg DEHP

Fig. 3-a に示すように、o-PP を Trp-P-2 と共存させた場合には、Trp-P-2 の至適 S9 量はプレートあたり 20μl から 50μl 程度にシフトし、Trp-P-2 を単独で試験した場合に認められた S9 の高用量側での相対的な変異原性の低下が認められなくなった。しかし、o-pp を 169μg と大量に共存させた場合には、S9 量によらず変異原性は低くなった。

この結果を、先の Malaveille らの考え方に添って解釈すると、S9 が o-pp の代謝に利用されるため、少量

の o-PP の共存は過剰な S9 量を消費して至適 S9 量に近づけるのに対して、多量の o-PP の共存は S9 量の不足を招き変異原性の発現を減少させたと考えられた。

Fig. 3-b に示すように、o-PP が 2-AF と共存した場合には Trp-P-2 と共存した場合に比べて、共存による影響は小さかったが、o-PP が 169μg と多量に共存したときには、Trp-P-2 に o-PP が 16.9μg 共存したときと同様の影響を示した。これは、Trp-P-2 や 2-AF に固

有の代謝活性化機構や効率が、共存物 o-PP との反応にも関与しているためであると推定された。

また、Fig. 3-a, b には、それぞれ o-PP を 169 μ g 共存させた場合の菌の生存率も示したが、S9 量が 20 μ l 以下の場合に o-PP が菌の生存率をやや低下させることが認められた。

一方、DEHP を共存させて同様の実験を行った結果を Fig. 4 に示す。DEHP は、Trp-P-2、2-AF どちらの変異原物質と共存させた場合にも至適 S9 量を変化させる程の影響は与えなかった。すなわち、DEHP では S9 による代謝効率や代謝産物の反応性が o-PP とは異なるためと考えられた。

以上の結果から、変異原物質に対する至適 S9 量が狭い範囲にあるために、共存物と S9 との反応によって変異原物質の代謝活性化を行う環境が変化し、変異原性試験の結果が大きく変わる可能性のあることが示された。しかし、共存物の存在下における変異原物質の代謝活性化には、それぞれ固有の代謝活性化機構や代謝効率および代謝産物の反応性も関与していることが推定された。

3.2 モデル共存系の用量-反応関係

1 ml 中に Trp-P-2 を 500ng と o-PP を 169 μ g 含む試料と同量の Trp-P-2 と o-PP 1,690 μ g を含む試料を、それぞれ 3 段階希釈し、その 0.1ml を S9 添加量を 50 μ l または 20 μ l で試験して、用量-反応関係を求めた結果を Fig. 5 に示す。S9 添加量 20 μ l では、Trp-P-2 は至適 S9 量付近で試験されているため変異原性の活性が高く、o-PP が多量に共存し、Trp-P-2 の用量が

大きい場合にのみ S9 が不足して活性が抑制された。一方、S9 添加量 50 μ l では、169 μ g の o-PP が共存した場合には過剰な S9 量が減少したために活性が増強され、o-PP が 1,690 μ g と大量に共存した場合には S9 の不足により Trp-P-2 の高用量時に活性が低下するなど、共存物量によって変異原活性への影響がまちまちであった。以上の結果は、通常のコ存物量では、変異原性を正しく測定するためには、S9 添加量を 20 μ l とし試験する方が望ましいことを示唆している。しかし、S9 量が 20 μ l 以下では Fig. 3 に示したように o-PP のような殺菌性物質の影響を受けやすくなるので注意が必要である。

3.3 底質抽出物が至適 S9 量に与える影響

次に、モデル共存化学物質で認められた至適 S9 量の変化が、実際の底質抽出物中の共存物質によっても起こるかどうかを検討した。

3.3.1 共存物量の影響

使用した 2 種の底質の性状および抽出物量は、Table 1 に示すとおりである。それぞれの底質抽出物の還元銅カラム処理液の 50 μ g から 300 μ g または 400 μ g を、2 μ g の 2-AF に共存させ、S9 量を変化させて試験した結果を Fig. 6-a, b に示す。2 種の底質抽出物の変異原性は、Table 1 に示すとおり 100 μ g あたりの正味の復帰変異コロニー数が 17~18 と低く、ほとんど無視できると考えられたが、Fig. 6-a, b に示した底質抽出物共存時の 2-AF の復帰変異コロニー数は各 S9 量における底質抽出物自身の復帰変異コロニー数を差し引いたものである。底質抽出物の共存によって

Fig. 5 Dose-response curves of the model samples containing Trp-P-2 and o-phenylphenol at the addition of 20 μ l or 50 μ l of S9
(□) 500ng Trp-P-2 in 1ml, (△) 500ng Trp-P-2 and 169 μ g o-PP in 1ml,
(▲) 500ng Trp-P-2 and 1,690 μ g o-PP in 1ml

Table 1 Properties of sediment samples and the mutagenicity of their extract treated by reduced-Cu column

	Sampling river	Appearance	Water Content (%)	Ignition Loss (%)	Amounts of extract (mg/100g-dry)	Net rev*/100 μ g of extract
Sediment (A)	Sagami	Sand	17	3.4	99.5	18
Sediment (B)	Tsurumi	Mud	37	10	453	17

* TA98 in addition of 50 μ l of S9

Fig. 6 Influence of the amounts of the coexisting substances in sediment A or B on the optimum S9 amount for the mutagenicity of 2-AF
 (□) 2 μ g 2-AF with 50 μ g extract, (■) 2 μ g 2-AF with 100 μ g extract,
 (△) 2 μ g 2-AF with 200 μ g extract, (▲) 2 μ g 2-AF with 300 μ g (A) or 400 μ g (B) extract,
 Net revertants were substrated the original revertants of extract

2-AFの変異原性に対する至適S9量は大きくシフトした。いずれの底質抽出物でも50~100 μ g程度の共存では至適S9量は50 μ l付近にあるが、共存物量が200~400 μ g程度と多量の場合には至適S9量は100 μ l以上にシフトし、これらの傾向は採取場所の特性の大きく異なる2種の底質で同様に認められた。2-AFを単独で試験した場合の至適S9量は10 μ lから20 μ l付近であったことから、共存物がS9を競争的に消費した結果、より多量のS9が必要になったと考えられた。また、プレートあたりのS9添加量を50 μ lとした場合、2 μ gの2-AFに底質抽出物Bが50 μ gから100 μ gまで共存しても2-AFの変異原性の発現は大差なかったが、400 μ g共存した場合には2-AFの変異原性は5分の1以下になってしまうことが分かった。また、S9量が20 μ l以下では生菌数がやや低下することを確認した。

3.3.2 共存物の極性の影響

共存物の量が一定の場合、極性の異なる底質抽出物

の共存が至適S9量に与える影響について検討した。還元銅カラムで処理した底質抽出物Bをシリカミニカートリッジで極性の異なる2つの画分(I, II)に分離し、それぞれ200 μ gを2 μ gの2-AFに共存させ、S9量を変化させて試験した結果をFig. 7に示す。抽出物の共存により至適S9量は50 μ lから100 μ l付近にシフトするが、中極性画分Iの共存の影響が大きく極性画分IIの共存の影響は小さかった。このことから、3.3.1で述べた底質抽出物中の共存物とS9との反応には中極性画分Iがより多く寄与していると推定された。

4. ま と め

モデル共存物質としてのo-フェニルフェノール(o-PP)とフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)および底質抽出物を用い、これらを標準変異原物質であるTrp-P-2または2-AFと共存させた場合に、S9量による変異原性試験結果の変化を検討した結果、次のこと

Fig. 7 Influence of the polarity of the coexisting substances in sediment B on the optimum S9 amount for the mutagenicity of 2-AF

- (■) 2μg 2-AF with 200μg extract
(○) 2μg 2-AF with 200μg medium polar fraction
(●) 2μg 2-AF with 200μg polar fraction

が明らかとなった。

1) 変異原物質に対する至適 S9 量が狭い範囲にあるために、モデル共存物質 o-PP の存在は至適 S9 量を変化させ、変異原性試験の結果も大きく変化した。しかし、DEHP の共存では、o-PP の場合ほど、顕著な影響は認められなかった。

2) S9 添加量が 20μl 以下では、o-PP や底質抽出物の殺菌作用の影響を受けやすく生菌数が減少した。

3) S9 添加量が 50μl では、底質抽出物が 100μg 程度まで共存しても感度良く試験できた。共存物量が 200μg 程度以上と多量の場合には、変異原性は低下した。

4) 底質抽出物中の中極性共存物質が S9 との反応により大きく関与していると推定された。従って、底質抽出物を分画してそれぞれ変異原性試験を行う場合には、中極性分画と S9 添加量の関係に特に注意をする必要があることがわかった。

謝 辞

本研究にあたり、試験菌株の分与および貴重なコメントをいただきました静岡県立大学の松下秀鶴教授および国立公衆衛生院の久松由東博士に深謝いたします。

(原稿受付 1994年 5月23日)

(原稿受理 1994年 8月31日)

引用文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised method for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- 2) Hughes, T., Pellizzari, E., Little, L., Sparacino, C. and Kolber, A. (1980) Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing, *Mutation Research*, **76**, 51-83.
- 3) Salmeen, I.T., Durisin, A.M., Prater, T.J., Riley, T. and Schuetzle, D. (1982) Contribution of 1-nitropyrene to direct-acting Ames assay mutagenicities of diesel particulate extract, *Mutation Research*, **104**, 17-23.
- 4) Sayato, Y., Nakamuro, K. and Ueno, H. (1987) Studies on preconcentration methods for detecting the mutagenicity of organics in drinking water, *Eisei Kagaku*, **33**, 328-336.
- 5) 浦野紘平, 高梨啓和, 金沢伸浩, 藤江幸一 (1994) 水道水の Ames 変異原性に関する研究 第 1 報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤, 水環境学会誌, **17**, 41-50.
- 6) 浦野紘平, 高梨啓和, 金沢伸浩, 藤江幸一 (1994) 水道水の Ames 変異原性に関する研究 第 2 報 高性能吸着剤を用いた変異原性物質の濃縮・回収方法, 水環境学会誌, **17**, 51-59.
- 7) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H. and Arimoto, S. (1983) Adsorption mutagens to cotton bearing covalently bound tris(4-copper-phthalocyanine), *Mutation Research*, **119**, 230-238.
- 8) 内海英雄, 浜田昭, 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.
- 9) 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野仁, 丈達泰史, 後藤里花, 長谷川達也, 早津彦哉, 坂本博 (1991) 水中変異原物質のブルーレイオン及び XAD-2 樹脂による前処理濃縮法の比較検討及び濃縮物の変異原特性, 衛生化学, **37**, 197-204.
- 10) Sato, T., Momma, T., Ose, Y., Ishikawa, T. and Kato, K. (1983) Mutagenicity of Nagara river sediment, *Mutation Research*, **118**, 257-267.
- 11) West, W.R., Smith, P.A., Booth, G.M. and Lee, M.L. (1988) Isolation and detection of genotoxic components in a Black river sediment, *Environmental Science and Technology*, **22**, 224-228.
- 12) 吉野秀吉, 浦野紘平 (1993) 廃棄物焼却炉飛灰の変異原性試験のための試料調製方法, 廃棄物学会論文誌, **4**, 64-71.
- 13) 吉野秀吉, 浦野紘平 (1994) 一般廃棄物焼却灰の変異原性の実態と特性, 廃棄物学会論文誌, **5**, 11-18.
- 14) 安部明美, 杉山英俊, 井口潔, 久松由東, 西村哲治, 松下秀鶴 (1987) 河川底質の変異原性をモニタリングするための基礎的検討(1)—致死作用の除去について—, 水質汚濁研究, **10**, 49-55.
- 15) Grifoll, M., Solanas, A.M., Pares, R., Centellas, V., Bayona, J.M. and Albaiges, J. (1988) Assessment of mutagenic activity of coastal sediments Off Barcelona, *Toxicity assessment: An International J.* **3**, 315-329.
- 16) Mitchell, I. de G. (1978) Microbial assay for mutagenicity: A modified liquid culture method compared with agar plate system for precision and sensitivity, *Mutation Research*, **54**, 1-16.
- 17) Malaveille, C., Kuroki, T., Brun, G., Hautefeuille, A., Camus, A. and Bartsch, H. (1979) Some factors determining

- the concentration of liver proteins for optimal mutagenicity of chemicals in the Salmonella/microsome assay, *Mutation Research*, **63**, 245-258.
- 18) Kuroki, T., Malaveille, C., Drevon, C., Piccoli, C., Macleod, M. and Selkirk, J.K. (1979) Critical importance of microsome concentration in mutagenesis assay with chinese hamster cells, *Mutation Research*, **63**, 259-272.
- 19) Maruoka, S., Yamanaka, S. and Yamamoto, Y. (1985) Mutagenic activity in organic concentrate from Nishitakase river water in Kyoto city, and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography, *Water Research*, **19**, 249-256.
- 20) 日本環境衛生センター (1991) 環境庁委託業務結果報告書：浮遊粉じんの変異原性試験方法に関する調査研究。
- 21) Fabacher, D.L., Schmitt, C.J. and Besser, J.M. (1988) Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the Great Lakes, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**, 529-543.
- 22) 染谷孝, 鯉川寿美子, 立藤綾子, 松藤康司, 花嶋正孝(1992) 変異原性試験による廃棄物埋立処分場浸出水中の微量汚染物質サーベイランス, 水環境学会誌, **15**, 244-253.
- 23) 染谷孝, 鯉川寿美子, 立藤綾子, 松藤康司, 花嶋正孝(1992) 廃棄物最終処分場の浸出水処理過程における変異原活性の消長, 水環境学会誌, **15**, 321-326.
- 24) Abe, A. and Urano, K. (1994) Influence of chemicals commonly found in a water environment on the mutagenicity test, *The Science of Total Environment*, **153**, 169-175.
- 25) 石館基(1991) 微生物を用いる変異原性試験データ集, シー・アイ・エル, 東京。
- 26) 労働省化学物質調査課 (1986) 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 187pp, 中央労働災害防止協会, 東京。