〈論 文〉

umu test 自動分析装置の構築と性能評価小 林
宗 宮麗*
功***小 野 芳 朗**
平津(毛利)紫乃*****Development and Characteristic Performance of the Automatic Detection Device for *umu* test**Urara KOBAYASHI*, Yoshiro ONO**,
Isao SOMIYA*** and Shino HIRATSU (MOHRI)***

- * Graduate School of Engineering, Kyoto University, (Kurita Water Industries LTD., Corporate Research & Development Center), Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 Japan (7-1, Wakamiya, Morinosato, Atsugi-city, Kanagawa 243-0124 Japan)
- ** Dept. Environmental and Civil Engineering, University of Okayama, 2-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530 Japan
- *** Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 Japan

Abstract

The new method for *umu* test using the automatic detection device is constructed as a simple method to monitor the safety of the environmental water. This device applies the CFA (Continuous Flow Analysis) method using AutoAnalyzer II (Bran+Luebbe). After addition of samples and phosphate-buffer, the culture is incubated for 1.5 hours in the teflon tube wound in a coil in the 36°C water bath. Then β -galactosidase enzymatic reaction is acted in the teflon-tube coil. The absorbance is measured at 600nm and 420nm in the spectrophotometers with a flow cell which are controlled by Visual Basic program. AF-2, 4-NQO and 2-AA which are major mutagens were measured by both this new method and the usual manual method of *umu* test. The automatic detection device was more sensitive than usual method and had higher accuracy (CV=5.5~12.1%) than usual method (CV=11.1~14.9%). This result suggests that this automatic detection device can be used as the monitoring methods.

Key words: *umu* test, Continuous Flow Analysis, Mutagen, automatic detection device

1. 背景・目的

都市域水源の化学物質による汚染について、様々な研究がなされており、その評価方法は現在も摸索段階にある。環境中の化学物質は非常に微量であると同時に多種多様な物質が混在しており、その微量化学物質の混在による毒性の相互作用は未解明の部分が多いことから、水の安全性を評価することは非常に困難である。単一の試験で評価することは、特定の物質群を過大に評価したり、特定の物質群を検出できず過小評価する可能性があることから、数種の水質試験とバイオアッセイを組み合わせることにより簡易にスクリーニングおよびモニタリングしようとする動きが主流である。

バイオアッセイの中で、*umu* test はサルモネラ菌の SOS 応答を利用して DNA 損傷を測定する手法であり、

Ames 試験と並んで変異原性試験として上水試験方法に記載されている¹⁾。また1997年発行の下水試験方法にも Ames 試験, Rec assay と並んで採用されており、簡易毒性試験として広く実施されると考えられる²⁾。さらに Ames 試験に先んじて1997年に ISO に採用された³⁾。

現在、世界で最もよく用いられている変異原性試験は Ames 試験であり、データの蓄積も非常に豊富である。しかし、Ames 試験がコロニー形成のための培養だけで48時間を要するのに対し、*umu* test は試験開始から終了までの時間が標準法で約8時間であり、短時間で結果が得られるという利点を有している。操作手順に関しても、Ames 試験が寒天培地上にコロニーを形成させ、その数を計数して変異原性を評価するのにに対し、*umu* test は液体培地を用い、評価は吸光度計の測定結果から算出する値を用いるため、簡便であるという利点も有する。ま

* 京都大学大学院工学研究科 (現 栗田工業(株)技術開発センター) 〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町 (〒243-0124 神奈川県厚木市森の里若宮 7-1)

** 岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科 〒700-8530 岡山県岡山市津島中 2-1-1

*** 京都大学大学院工学研究科 〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町

た、*umu* test の試験結果は Ames 試験と約90%の一致がみられるため、他の多くの試験方法と比して、遺伝子毒性評価法として遜色のない手法であると考えられる⁴⁾。現在では特性の物質群に対する高感度株が作成されているとともに、蛍光検出法を用いた高感度化⁵⁾、発光遺伝子群を利用した高感度化⁶⁾など各種変法も開発されている。本研究では、今後の *umu* test の汎用化を考慮して、生物試験に習熟していない人でも簡単に操作できるように試験の自動化を試みた。

遺伝毒性試験の自動化を考慮したとき、Ames 試験が寒天培地を用いるのに対し、*umu* test は液体培養という手法を用いていることが大きな利点となる。液体培地をポンプを用いてチューブ内を連続的に流し、途中その培地に被験物質および試薬を添加し、反応させるという形式で自動化することが可能である（以下フロー形式と呼ぶ）。この自動化により従来の回分式の試験手順をさらに簡易化し、試験操作の有する問題点であったサンプル間の時間的誤差や人為的誤差を解消することを目指した。

既報⁷⁾において、各手順における測定条件を回分式実験で検討し以下の結果を得たので、本論文ではこれらの条件を用いて装置の構築を行った。そして、構築した装置を用いて標準変異原物質の遺伝毒性を測定し、結果および誤差について回分式と比較、毒性評価法として使用可能であるかの評価を行った。

- ① 培養中の試験菌株に新しい培地を供給することにより長時間にわたって菌株濃度を一定に保つことが可能であり、26時間まで AF-2 に対し活性に影響がみられない。
- ② 生物反応の最適温度は、化学物質との反応時間2時間以上においては37°C、2時間未満においては36°Cである。
- ③ フロー形式で生物反応は良好に進行する。
- ④ β -galactosidase 活性測定においてクロロホルム無添加条件下の SDS 溶液の最適濃度は1.0mg・l⁻¹である。また、攪拌条件は活性に影響を与えない。
- ⑤ フロー形式による β -galactosidase 活性測定に Dose-response が得られ、再現性がみられる。

2. *umu* test の原理

生物は化学物質により DNA が損傷した際、様々な修復機構を備えている。その中の SOS 応答と呼ばれる機構は、応急的に塩基のギャップをでたらめな塩基で埋める誤りがちの DNA 修復機構である。小田らによって開発された *umu* test はこの SOS 遺伝子群の中の *umuDC* 遺伝子の発現を測定する遺伝毒性試験である⁸⁾。

UmuDC にラクトースオペロンの一つである *lacZ* 遺伝子を融合させた *umuC'*-*lacZ* 融合遺伝子を乗せたプラスミド pSK1002 を、*Salmonella typhimurium* TA1535 に導入した試験菌株を親株とする。液体培地中で検体を投与し、培養反応させた後、菌体内で発現した *umuC* 遺伝子を *lacZ* の産生する β -galactosidase 活性で測定し、遺伝毒性の指標とする。

β -galactosidase 活性は以下の Miller の式で算出される⁹⁾。

$$\beta\text{-galactosidase (units)} = 1000 \cdot (\text{OD}_{420} - 1.75 \cdot \text{OD}_{550}) \cdot t^{-1} \cdot v^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$$

但し、OD₆₀₀；600nmでの吸光度（菌体濃度に相当）
OD₄₂₀；420nmでの吸光度（*o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside の発色）

OD₅₅₀；550nmでの吸光度（破碎細胞片による散乱に相当）

t；酵素 β -galactosidase と基質 *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside の反応時間 (min)

v；菌液の希釈倍率

3. 自動分析装置の構築

3.1 概念

自動分析は大別してディスクリット（分注）方式とフロー方式があり、最近の研究ではフロー方式が主流をなしている。フロー方式にはフロースルー移送方式、連続フロー移送方式（CFA 法）、フローインジェクション方式（FIA 法）、カラム分離移送方式などがある¹⁰⁾。これらのフロー方式により様々な試験が自動化されてきたが、生物を含有した懸濁液に適用した例はみられない。本研究では菌の懸濁液をベースに流し、かつ反応も流れの中で行うため、空気との接触があり、液中に固形分が含まれても測定が可能であると思われる連続フロー移送方式（以下 CFA 方式）を選択した。

CFA 方式は気泡分節法とも呼ばれ、気泡を断続的に注入することにより反応液の混合を防ぐのが特徴的である。1955年に Skeggs により提起されて以来、臨床検査用、水質分析用、プロセス管理用、品質管理用など多方面で利用されているが、生物試験に応用した例はない。この方式は Bran+Luebbe 社製品で代表されるものであり、本研究でも AutoAnalyzer II 型（Bran+Luebbe）を用いた。Fig. 1 に本研究で用いた自動分析装置の概念図を示す。Visual Basic のプログラムにより吸光度計の制御と得られたデータの取り込みを行った。

自動分析装置の構築は以下の手順で行った。

Fig. 1 The process of the standard methods of *umu* test and the outline of the automatic detection device

- ① 用いる部品・チューブなどの検討 (材質・部品の適合性の検討)
 - ② ピークの明瞭化の検討 (チューブ径・空気注入量および注入位置の検討)
 - ③ 洗浄時間の検討
- それぞれの手順について、検討方法および結果を示す。

3.2 部品・チューブの検討

3.2.1 検討項目

Umu test をフロー形式で自動化する際に使用するチューブとしては、①使用菌株の前培養の際に用いるマイクロチューブポンプ、②被験物質および試薬を添加するポンプチューブ、③生物反応および酵素反応を行わせるチューブ、④ポンプチューブと反応チューブをつなぐ移送チューブがあり、これらの材質について検討した。

材質にはガラス、テフロン、溶媒耐性、酸アルカリ耐性、シリコン、ステンレスなどがあるが、これらに対する試薬の適合性は製品の仕様や文献を参照した。確信が得られない場合はチューブの強度を確認するために溶液にチューブを一昼夜浸し、チューブに溶液を流して流量の変化がないことを確認した。

3.2.2 検討結果

①で用いるチューブは流量の安定性の面からシリコンチューブを用いた。②で試薬に用いるポンプチューブについては製品の仕様から試薬の適合性を確認し全てBran+Luebbe 社製スタンダード (ポリ塩化ビニル) を採用した。標準法においてはクロロホルムが添加されるが、自動分析装置においてはチューブに与える影響が懸念されるため無添加とした。③の反応チューブには最も摩擦が少なく移送に適するのはガラスと考えられるが、反応時間が1時間以上と長く、また反応時間の検討にあたり、経済性・利便性を考慮して長さを自由に変えることのできるタイゴン、シリコン、テフロン製の3種について検討した。それぞれのチューブに溶液を流して試験を行った結果、タイゴン、シリコンは36°Cの恒温槽中に浸した部分に白濁がみられた。また、シリコンについては恒温水中への液の透過がみられた。したがって、材質、流量ともに変化のみられなかったテフロンチューブを採用した。④の移送チューブは恒温水には浸からないが③の検討で液の透過のみられたシリコンチューブは避け、作業性の面からタイゴンチューブを採用した。

3.3 ピークの明瞭化の検討

3.3.1 方法

本研究で用いたポンプはAutoAnalyzer II型 (Bran+Luebbe) である。このポンプは22本以上のチューブをセットすることができ、全てのチューブに同時に液を流すことができる。また、各チューブの流量はチューブの径により決定される。Umu test の標準法の試薬量とほぼ同じ比率になるように、試薬添加に用いるポンプチューブの選択について検討した。

チューブの選択には、始めに単純に標準法と同量か最も近い流量のチューブを選択して実際に溶液を流し、その後流れ方を見ながら様々な径のチューブと入れ替えていき、ピークの形状が最も明瞭に得られるものを探すという方法を用いた。

本装置においては、サンプル間の混合防止と、チューブを流れる間の溶液の攪拌を、空気分節により行う。吸

光度計のセルに空気が流入するのを防ぐため、生物反応後の吸光度 (OD₆₀₀) 測定と、酵素反応後の吸光度 (OD₄₂₀, OD₅₅₀) 測定の前に、空気を排出する必要がある。これらの流量は流れ方に大きく影響を与えるため、様々な径のチューブを用いて試験し、最適な組み合わせを決定した。

次に空気分節の位置の検討を行った。被験物質投与の際、流量の最も多い菌液をベースとして流し、そこにリン酸緩衝液 (代謝活性化の場合は S9mix)、被験物質を順次添加した。また、 β -galactosidase 活性測定においても、生物反応後の菌液に標準法と同じ順序で Z-buffer, SDS 溶液, ONPG (和光純薬, 京都) の順に試薬を添加した。その際の空気分節の位置を、空気分節なし、試薬添加後、試薬添加前の3種類検討した。

3.3.2 結果

Table 1 Flow rate of the tubes at each phase of the reaction (ml·min⁻¹)

① Sampling point		④ β -galactosidase measurement	
suspension of <i>S.typhimurium</i> TA1535	2.5	suspension of <i>S.typhimurium</i> TA1535	0.6
phosphate buffer	0.42	SDS solution	0.05
sample	0.1	Z-buffer	2.0
air	1.0	ONPG	0.42
		Na ₂ CO ₃	1.0
		air	1.0
② SOS Reaction		⑤ OD ₄₂₀ measurement	
every 10m	3.9	effluent	2.0
③ Turning point		effluent'	0.6
effluent	1.6	to OD ₄₂₀	2.5
to OD ₆₀₀	2.0		
to β -galactosidase measurement	0.6

Fig. 2 Effect of the position of the air injection on the peak shape

Fig. 3 The flow diagram of the automatic detection device

移送チューブと反応チューブの径は、内径が大きすぎると空気分節が適切に作られず、連続するサンプル間で混合が認められたため、内径 2 mm を採用した。これは自動分析に一般的に用いられる径である。各試薬に用いるチューブ径および空気の排出のチューブ径を検討した結果、使用する全ポンプチューブの流量を Table 1 のように決定した。

β -galactosidase 活性の際の空気分節の位置の検討結果を Fig. 2 に示す。空気分節なしの場合、吸光度の上昇はみられるが、サンプルとサンプルの間にイオン交換水を流しているにも関わらず、サンプル毎のピークは明瞭ではない。試薬添加後に空気分節を行った場合はピークが現れているがベースラインが上昇しているのが見受けられる。これは界面活性剤である SDS 溶液の影響でチューブ内で液の泡立ちが起こったことが原因と考えられる。試薬添加前に空気分節を行った場合はさらにピークが明瞭になり、ベースラインも上昇しなかった。したがって、空気分節は試薬添加前に行うこととした。同様に、最初の被験物質投与の際も試薬添加前に空気分節を行うこととした。

Fig. 3 に最終的に選択した装置のフローダイアグラムを示す。図中のチューブは、例えば GRY/GRY は Bran+Luebbe 社製チューブ $1.00\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ のものを表している。

3.4 洗浄時間の検討

3.4.1 方法

複数のサンプルを測定する際、サンプル間のピークが重なることを防ぐため、サンプルとサンプルの間にイオン交換水を流し、チューブ内の洗浄を行った。この洗浄時間についての検討を行った。サンプルを流した後イオン交換水を流し、OD₆₀₀と OD₄₂₀の経時変化をみた。また、洗浄時間 2 分の場合と 7 分の場合で β -galactosidase 活

Fig. 4 Effect of the length of washing periods

Fig. 5 β -galactosidase activity of AF-2 with two kinds of washing periods

性値の比較を行った。

3.4.2 結果

Fig. 4 に洗浄水を流したときの OD₆₀₀と OD₄₂₀の経時変化を示す。両グラフともにテーリングがみられ、洗浄時間が長いほどベースラインに近づくことがわかる。

洗浄時間 2 分の場合と 7 分の場合の β -galactosidase 活性値を Fig. 5 に示す。高濃度のサンプルほど 7 分の場合と 2 分の場合の差が大きく、7 分の場合の方が低い値を示した。これは、低濃度のサンプルから順に測定したために、洗浄時間 2 分ではキャリーオーバー（サンプルの移行）が起こっており、ベースラインが徐々に上がっているためと考えられる。

洗浄時間は長いほどサンプル間の影響を少なくすることができる反面、分析速度が遅くなるという欠点がある。本装置では Fig. 4 でベースラインに戻ったと判断できる 7 分を採用した。

4. 自動分析装置の評価（代表変異原物質の測定）

4.1 評価方法

自動分析装置では、試薬濃度や割合は標準法にできるだけ準拠したが、変更した部分もあるため、厳密に活性値を比較することはできない。変異原性試験として使用可能であるためには明瞭な濃度反応曲線が得られるかどうか、および標準法と比較して同等以上の精度が得られるかどうかが問題となる。したがって、その 2 点を評価の対象とした。

Table 2 Genotoxicity and Carcinogenicity data of the typical genotoxic compounds

Compound	CAS.Reg. No.	Genotoxicity		Carcinogenicity		
		umu test	Ames test	EPA	IARC	summary response
AF-2 (-S9)	3688-53-7	+	+	P	SP	+
4-NQO (-S9)	56-57-5	+	+	P		+
2-AA (+S9)	613-13-8	+	+	P		+

Genotoxicity and Mutagenicity testing: +, positive; Carcinogenicity study: SP, P, positive; CAS Reg.No., Chemical Abstract Service Registry Number; EPA, Environmental Protection Agency; IARC, International Agency on Research of Cancer; summary response: +, positive

構築した umu test 用自動分析装置を評価するにあたり、強い変異原性を示す物質を被験物質として測定を行った。被験物質としては非代謝活性化(-S9)条件で AF-2 (Furylfuramide), 4-NQO (4-Nitroquinoline-1-oxide), 代謝活性化(+S9)条件で2-AA (2-Aminoanthracene)を用いた。これらの物質は、Ames 試験および umu test において、試験菌株の感受性の検定 (positive control) に用いられる標準変異原性物質である。各物質の変異原データおよび発ガン性データを **Table 2** に示す。最終的に決定した装置を備えた装置を用い、至適測定条件である生物反応時間1.5時間、洗浄時間 7 分で測定を行った。濃度は AF-2は0.03, 0.05, 0.10(mg・l⁻¹)の3段階、4-NQO は0.10, 0.30, 1.0(mg・l⁻¹)の3段階、2-AA は0.30, 1.0, 3.0 (mg・l⁻¹)の3段階とした。イオン交換水を用いて各試料の濃度列を作成し、空試験にはイオン交換水を用いた。また、測定は3回行い、平均値を測定結果とした。

4.2 測定結果

非代謝活性化条件で行った AF-2, 4-NQO の測定結果を **Fig. 6** (A) AF-2, (B)4-NQO) に、代謝活性化条件で行った2-AA の測定結果を **Fig. 6** (C)に標準法の結果と合わせて示す。自動分析装置を用いた測定で、3物質ともに濃度反応曲線が得られた。標準法と比較すると、非代謝活性化条件の AF-2は32~53%, 4-NQO は37~60% (空試験補正後)高い値を示したのに対し、代謝活性化条件の2-AA は標準法とほとんど同じ値を示した。

この原因を考察するため、活性値の算出式である Miller の式に用いる各吸光度の値を、自動分析装置および標準法で比較した。AF-2 (非代謝活性化条件) の測定結果 (3回の平均値) を **Table 3** に示す。自動分析装置の OD₆₀₀の値は標準法と比較すると約0.1小さかった。菌体濃度が全体に低い値を示す理由としては、反応時間が標準法よりも短時間であることと、フロー形式では気泡と気泡の間で攪拌を行うが、気泡の間隔が広いと押し出し流れに近い状態になるため、攪拌が標準法よりも弱くなることが考えられる。OD₄₂₀は自動分析装置の方が全体に高い値を示した。これは自動分析装置の方が β-galactosidase 活性測定における菌液の割合が高いこと (標準法5.8%, 自動分析装置14.7%), 細胞膜破碎のための SDS 濃度が高いことが理由と考えられる。

2-AA (代謝活性化条件) の測定結果を **Table 4** に示す。AF-2と同様に OD₆₀₀は自動分析装置の方が標準法と比較して約0.2低い値を示した。これは AF-2と同様の理由によると考えられる。しかし、2-AA では OD₄₂₀も自動

Fig. 6 β-galactosidase activity of AF-2, 4-NQO, and 2-AA using two methods; the automatic detection device and the standard method, (A)AF-2, (B)4-NQO, (C)2-AA**Table 3** β-galactosidase activity of AF-2 using two methods; the automatic detection device and the standard method

	AF-2(mg・l ⁻¹)	OD ₆₀₀ (-)	OD ₄₂₀ (-)	OD ₅₅₀ (-)	β-galactosidase(units)
Automatic detection device	0*	0.573	0.181	0.012	186
	0.03	0.504	1.220	0.014	1583
	0.05	0.486	1.345	0.014	1813
	0.10	0.492	1.617	0.014	2161
Standard method	0*	0.672	0.145	0.027	97
	0.03	0.608	0.982	0.031	1018
	0.05	0.578	1.201	0.030	1324
	0.10	0.542	1.345	0.027	1596

*Blank; Ion exchanged water

分析装置の方が低い値となり、結果として活性値は同等の値となった。これは S9mix 添加後の生物反応時間が短く、また攪拌条件が弱いために、標準法と比較して SOS 反応の誘発が少ない可能性が考えられる。

4.3 精度の比較

AF-2を被験物質として10回の測定を行い、変動係数を用いて精度の比較を行った。各濃度毎の測定値の平均値、標準偏差、および変動係数を **Table 5** に示す。

変動係数は定量限界や有効数字の決定等に用いられる指標であり、有機化合物では20%, 無機物では10%が原

Table 4 β -galactosidase activity of 2-AA using two methods; the automatic detection device and the standard method

	2-AA(mg · l ⁻¹)	OD ₆₀₀ (-)	OD ₄₂₀ (-)	OD ₅₅₀ (-)	β -galactosidase(units)
Automatic detection device	0*	0.742	0.133	0.008	106
	0.30	0.709	0.309	0.009	275
	1.0	0.659	0.342	0.010	328
	3.0	0.648	0.434	0.010	427
Standard method	0*	0.912	0.152	0.033	69
	0.30	0.958	0.332	0.041	181
	1.0	0.891	0.492	0.037	320
	3.0	0.856	0.680	0.039	476

* Blank; Ion exchanged water

Table 5 Comparison of accuracy of two measurements

AF-2 Concentration (mg · l ⁻¹)	Automatic detection device			Standard method		
	Average (units)	Deviation (units)	CV (%)	Average (units)	Deviation (units)	CV (%)
0	188	16.0	8.5	98	12.9	13.2
0.03	1562	189.0	12.1	1032	114.6	11.1
0.05	1823	136.7	7.5	1350	201.2	14.9
0.1	2170	119.4	5.5	1607	192.8	12.0

* CV = s / x × 100 ; s, deviation ; x, average

則として定量下限であるとされる¹¹⁾。Table 5 より、自動分析装置、標準法ともに20%以内であるため、測定方法の精度は良好と判断してよいと考えられる。各数値を比較すると、標準法が全ての濃度において10%を超えているのに対し、自動分析装置は0.03(mg·l⁻¹)を除いて10%以下であることから、標準法と比較して精度が向上しているといえる。これは *umu* test の各段階での試験操作の時間的誤差がなくなったことと、人為的な誤差が減少したためと考えられる。

5. 結 論

本研究で得られた成果を以下にまとめる。

第一に自動分析装置の構築を試みた。*Umu* test の各手順について自動化のための実験条件を検討した後、使用する部品の材質の適合性・チューブ径・流量等を検討し、マニフォールドを構成して自動分析装置を構築した。

第二に構築した自動分析装置の評価を行った。標準変異原物質を被験物質として自動分析装置と標準法の両方で測定し、装置の適用性の考察と精度の比較を行い、以下の結果を得た。

1) 標準変異原物質である AF-2, 4-NQO について濃度反応曲線が得られ、標準法と比較すると、AF-2は32~53%, 4-NQOは37~60%高い値を示した。自動分析装置は非代謝活性化条件(-S9)に適用可能であり、標

準法よりも高い感度を得られることが示された。

2) 代謝活性化条件(+S9)での標準変異原物質である2-AAについては、濃度反応曲線が得られ、活性値は標準法と同等であった。生物反応時間を長くすることでさらに感度を上げることが可能であると考えられる。

3) 自動分析装置による測定結果は変動係数が5.5~12.1%であり、標準法と比較して小さく、精度の向上がみられた。これは試験手順の各段階でのサンプル間の時間的誤差がなくなったことと、人為的な誤差が減少したためであると考えられる。

これらの結果より、構築した自動分析装置が毒性評価法として使用可能であることが示された。今後、本装置の汎用に向けて、多くの物質を測定してデータを蓄積し、さらに実際の水試料への適用性を検討していく必要があると考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり、菌株を提供して下さった大阪府立公衆衛生研究所の小田美光先生に感謝の意を表す。また、本研究は平成8、9年度文部省科学研究費基盤研究(A)08558058の助成を受けた。

(原稿受付 1999年1月11日)

(原稿受理 1999年8月16日)

参 考 文 献

- 1) ㈱日本水道協会 (1993) 上水試験方法, pp.558-564
- 2) ㈱日本下水道協会 (1997) 下水試験方法, pp.549-552
- 3) ISO/TC 147/SC 5 (1998) Water quality-Determination of genotoxicity of water and waste water using the *umu*-test, International Organization for Standardization
- 4) Georf Reifferscheid, Jurgen Heil (1996) Validation of the SOS/*umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data, *Mutation Research*, **369**, 129-145
- 5) 後藤純雄, 加藤幸彦, 遠藤治, 山内恒幸, 松下秀鶴 (1988) 蛍光検出法を用いる *umu* 試験法の高感度化・マイクロ *umu* 試験, 大気汚染学会誌, **23**, 92-96
- 6) 今枝孝夫, 平井正名 (1994) 発光遺伝子群 *luxA-E* を利用した *umu* テストの簡便・迅速・高感度化, 変異原学会第23回大会要旨集, 79
- 7) 小林麗, 小野芳朗, 宗宮功, 毛利紫乃 (1997) フロー式反応装置による *umu* test の自動化にともなう測定条件, 水環境学会誌, **20**(1), 732-737
- 8) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H. (1985) Evaluation of the new system (*umu* test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, **147**, 219-229
- 9) Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, 352-355, Cold Spring Harbor
- 10) 河川水質試験方法 (案) 一通則・資料編一(1997), 191-194
- 11) ㈱日本水道協会 (1993) 上水試験方法, pp.36-38