

環境水域における変異原物質の抽出法の検討*

森田 啓次郎** 山本
板谷 勉** 大西

淳** 生本 照子** 宮崎 清**
昇** 近藤 基一**

1. はじめに

環境水域における水質監視は、従来一般項目をはじめとして、健康影響項目、特殊項目など主として理化学的指標が使われてきている。そして、対象としている化学物質についての基準値の設定根拠は、人への一般毒性としての影響評価に主眼がおかれている。しかし、近年地下水や水道原水に低沸点有機塩素系化合物などの存在が明らかにされ^{1,2)}、これらの発癌性化学物質は一般毒性とは異なり、遺伝情報に不可逆的な障害を与えて癌発生の遺伝毒性としての影響面から捉えられている。特にこれらの物質は、長期間低濃度暴露によってはじめて影響が現われることが知られている^{3,4)}。

生活環境中の低濃度かつ多種類の物質が混在する試料については、通常の分析手法では化学物質の同定把握が困難な場合が多い。また、生物評価のための変異原試験の試料としても適さない場合が多く、低濃度の物質の抽出、濃縮が必要である^{5,6)}。環境中の変異原物質の抽出方法としては、多孔質樹脂⁷⁾、有機溶媒⁸⁾、凍結乾燥⁹⁾などの方法の他、綿あるいは非晶質レイオンに、C. I. Reactive Blue 21 を結合させたブルーコットン (B. C.)¹⁰⁾、ブルーレイオン (B. R.)¹¹⁾ がある。B. R. あるいは B. C. は河川水中に直接懸垂放置する簡単な方法で、広範囲での環境水域の変異原性を予試験的に測定するため用いられている^{12~15)}。

本報告では、水質及び底質を対象に、変異原試験を用いた生物評価を行うための試料の抽出法として、ブルーレイオン (B. R.) 抽出法と溶媒抽出法について、主に多環芳香族炭化水素 (PAHs) を中心とした添加回収実験と、変異原試験について比較検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 対象試料

水質、底質試料は県南部にある笹が瀬川、倉敷川の上流部 (S-1, K-1) と河口部 (S-2, K-2) について平成2年7月30日及び8月3日に採取した。底質試料は表層部 15~20 cm を採取し、湿試料の状態で 2 mm のメッシュのふるいを通した後、水分及び強熱減量を測定し、冷暗所に保存し実験に使用した。

2.2 試薬

2.2.1 抽出試薬

B. R. はフナコシ薬品製 (24 μ mol copper-phthalocyanine/g) をメタノール (MeOH)、エタノール (EtOH)、ジクロロメタン (DCM) は関東化学製残留農薬用を、n-ヘキサン、ベンゼン及びアセトンは和光純薬製残留農薬用を用いた。アンモニア水 (NH₄OH) は和光純薬製精密分析用試薬を用いた。塩化ナトリウム (NaCl) は 600°C で加熱処理後使用した。シリカゲルミニカートリッジは Water Association 製 Sep-pak silica シリカゲルカートリッジを用いた。

2.2.2 PAH標準試薬

アントラセン (An)、フルオランテン (Fl)、ピレン (Py)、ベンゾ [a] アントラセン (B[a]A)、ベンゾ [ah] アントラセン (B[ah]A) 及びトリフェニレン (Tr) は東京化成製、ベンゾ [b] フルオランテン (B[b]F)、ベンゾ [j] フルオランテン (B[j]F)、ベンゾ [k] フルオランテン (B[k]F) 及びベンゾ [e] ピレン (B[e]P) は和光純薬製、ベンゾ [a] ピレン (B[a]P) 及び 3-メチルコラントレン (MC) は Sigma 製、ベンゾ [ghi] ペリレン (B[ghi]P)、クリセン (Ch) 及びペリレン (Per) は Aldrich 社製を用いた。PAHs 標準溶液は、GC/MS 及び HPLC 用はアセトンに、変異原試験

* Fundamental Study on Extracting for Mutagens in River Water and Sediment

** Keijiro MORITA, Jun YAMAMOTO, Teruko IKUMOTO, Kiyoshi MIYAZAKI, Tutomu ITADANI, Noboru OHONISHI, Motoichi KONDOU (岡山県環境保健センター) Okayama Prefecture Institute for Environmental Science and Public Health.

用は DMSO に溶解し 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を標準原液とし、適宜希釈し混合標準溶液を調製した。

2・2・3 GC/MS及び液体クロマトグラフ(HPLC)分析用試薬

ペリレン- d_{12} (Per- d_{12}) は Merck 製、メタノール及び蒸留水は片山化学製高速液クロマトグラフ用試薬、HPLC 用ディスポーザブルフィルターは倉敷紡績製クロマトディスク 4 N (孔径 0.45 μm) を用いた。

2・2・4 変異原試験用試薬

変異原試験標準溶液として B[a]P 及びジニトロピレン-1,3, 1,6, 1,8 異性体混合物 (DNP-mix) は和光純薬製を用いた。代謝活性化酵素 (S 9 mix) はオリエンタル酵母社製のフェノバプリタール及び 5,6 ベンゾフラボンで酵素誘導したラット肝臓 S 9 と cofactor (β -NADPH, β -NADH, グルコース-6-リン酸, MgCl_2 , KCl, Na_2HPO_4 及び NaH_2PO_4 溶液の凍結乾燥品) を用いて調製した。

o-ニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG), ジメチルスルホキシド (DMSO), 及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬製生化学用、滅菌用ディスポーザブルフィルターは倉敷紡績製クロマトディスク 4 N (孔径 0.45 μm) を用いた。その他の試薬はいずれも試薬特級品 (和光純薬) を用いた。培地は Nutrient broth, Nutrient Ager 及び Bacto Trypton は Difco 製を用いた。

Ames-test^{16,17)} に用いた菌株は, *Salmonella typhimurium* TA 100 および TA 98, unu-test^{18,19)} には,

TA 1535 / pks 1002 を使用した。

2・3 試料抽出方法

図 1 に [A] B. R. 抽出法及び [B] 溶媒抽出法による操作手順を示している。

B. R. 抽出: 水質試料は採水を行った 20 L ポリエチレン製容器に直接、底質試料は 50 g (wet wt.) をビーカーに採取して蒸留水 2 L に溶解後、B. R. 2.5 g を分散させ、約 6 時間攪拌を行った。B. R. の回収は試ステンレス製 (32 メッシュ) のふるいをういた。回収 B. R. は蒸留水 500 mL で 3 回洗浄後脱水、MeOH/ NH_4OH (50 : 1) 150 mL で 2 回振とう抽出を行った。抽出液はロータリーエバポレーター (45°C) で溶媒を留去後 5 mL の MeOH に溶解し、ディスポーザブルフィルターを通し窒素気流中で濃縮後、アセトン 1 mL に溶解し、GC/MS 及び HPLC 分析試料とした。

変異原試験には、DMSO 1 mL に溶解後高圧蒸気滅菌したディスポーザブルフィルターを通し滅菌試験管に低温保存した。

溶媒抽出: 水質試料 10 L に対し NaCl 1 kg 加えて DCM 500 mL で 2 回液々抽出を行った。底質試料は 20 g (wet wt.) を採取し、DCM/EtOH (4 : 1) 50 ml で超音波抽出 15 分及び遠心分離 (3000 rpm) の操作を 2 回行った。以下水質底質両試料は DCM 抽出して、脱水後ロータリーエバポレーター (45°C) で溶媒を留去後に DCM 抽出物を秤量した。DCM 抽出物は n-ヘキサン 2 mL に溶解しシリカゲルミニカートリッジにより、Fr. 1 (n-ヘキサン) 5 mL, Fr. 2 (n-ヘ

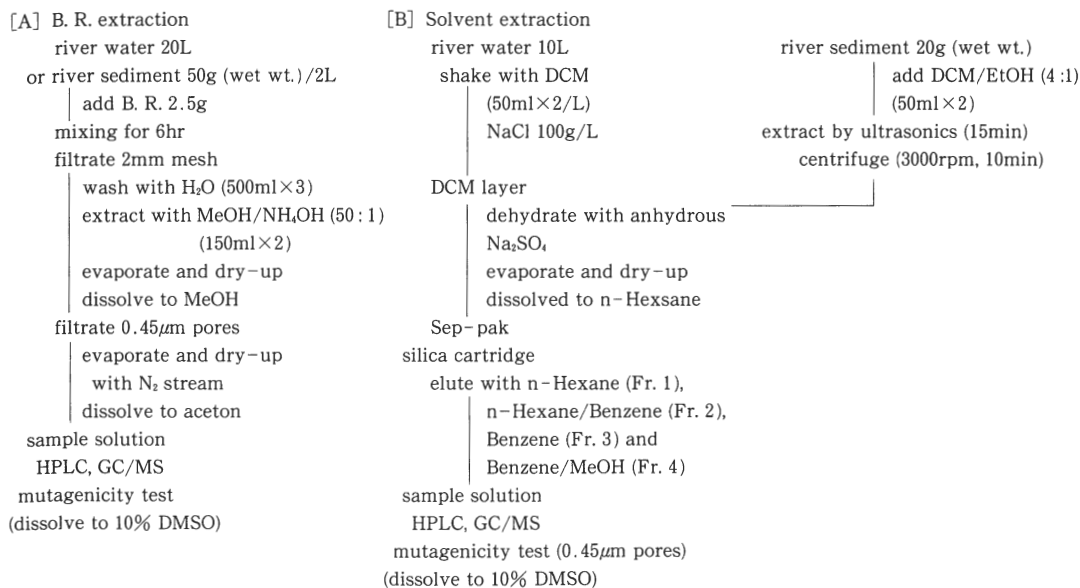


図 1 B. R. 抽出法及び溶媒抽出法の操作手順

表1 GC/MS及びHPLCの測定条件
Operational Conditions for GC-MS Analysis

GC Condition	
Column :	ultra2 (5%phenylmethylsilicone) 50m×0.31mm i. d.
Column temp :	50°C (5min)–250°C (25°C/min)–290°C (2°C/min) (25min)
Injection temp :	280°C
Injection mode :	splitless
Carrier gas :	He
Internal standard :	perylene-d ₁₂
MS Condition	
Ionization mode :	electron ionization (EI)
Ion accelerating voltage :	3kV
Ionization voltage :	70eV
Ionizing current :	310μA
Ion source temp. :	200°C
Operational Conditions for HPLC Analysis	
Column :	Cosmosil 5C ₁₈ -AR (250×4.6mm i. d.)
Column temp :	35°C
Mobil phase :	MeOH/water (85 : 15)
Flow rate :	0.8ml/min
Wave lengths for detection :	
Ex 305nm and Em 430nm for	B[e]P, B[a]P, B[ghi]P, B[ah]A, MC
Ex 365nm and Em 430nm for	B[b]F, B[k]F, B[a]P
Ex 300nm and Em 393nm for	B[e]P, B[k]F
Ex 330nm and Em 509nm for	B[j]F, B[b]F, B[k]F
Ex 334nm and Em 384nm for	An, Py, B[a]A
Ex 345nm and Em 445nm for	F1

キサン/ベンゼン (8 : 2)) 5 mL, Fr. 3 (ベンゼン) 5 mL 及び Fr. 4 (ベンゼン/MeOH (6 : 4)) 5 mL の画分を得た。

試薬ブランク試験は、B. R. 抽出及び溶媒抽出法について実試料と同様の操作を行った。GC/MS 及び HPLC 分析試料には、Fr. 2 を用いた。

変異原試験には Fr. 2, Fr. 3 を窒素気流中で溶媒を留去後、DMSO 1 mL に溶解して用いた。

2・4 抽出物の分析

B. R. 抽出及び溶媒抽出 (Fr. 2) を 0.2 ml に濃縮し、GC/MS (HP-58901・日本電子 DX 303) MC 法により PAHs を対象にマススペクトル解析を行った。化学物質の同定は剣持ら²⁰⁾の未知物質検索システム (EPA/NIH データベース) による検索結果から、試料のマススペクトルとデータベースと一致度の高い物質について、標準物質によるベクトルとの比較で行った。GC/MS により同定した 14 PAHs のうち、12 PAHs の定量は HPLC (島津 SCL-6A, 蛍光モニター FR-530) を用い、試料 2~10 μl を注入し、得られたピーク高さから絶対検量線法により定量した。GC/MS 及び HPLC の測定条件は表 1 に示す。

3. 実験結果

3・1 抽出物のGC/MSによる同定

B. R. 及び溶媒抽出物中の化学物質について GC/MS によるマススペクトル測定 (MC 法) は、PAHs を対象とした水質試料の溶媒抽出及び B. R. 抽出で得られた抽出物 (S-2, K-1, K-2) からは Py, B[e]P, B[b]F, B[j]F 及び B[k]F, の 5 PAHs が同定された。底質試料の溶媒抽出法及び B. R. 抽出物 (S-2, K-1, K-2) からは、An, Fl, Py, B[a]A, B[a]P, B[a]P, B[e]P, B[b]F, B[j]F, B[k]F, B[ghi]P, B[ah]A, Ch, Tr, 及び Per の 14 PAHs が同定された。

3・2 HPLC による水質及び底質試料中の PAHs の定量

GC/MS では、B[b]F, B[j]F 及び B[k]F と Ch 及び Tr の分離が充分でないため PAH の定量は HPLC で行った。表 2 は 4 調査地点における一般水質検査結果と水質試料中の 4 種の PAHs 濃度及び DCM 抽出物量秤量値を示している。S-1 地点は検出限界以下であった。S-2, K-1 及び K-2 地点では、Py, PeP 及び B[b]F+B[k]F が 0.3~1.4 (ng/L) の濃度であった。

表 3 は、底質試料中の 12 種の PAHs 濃度、12 PAHs

表2 水質試料中のPAHs濃度 (溶媒抽出)

Sampling site	pH	trans-parency	SS	COD (mg/L)	BOD	Py	B[e]P	B[b]F+B[k]F (ng/L)	DCM Extract Amount (mg/L)
S-1	8.3	>30	10	7.5	4.7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.01
S-2	8.0	14	22	14.5	13.0	0.4	0.8	0.8	0.04
K-1	7.4	>30	7	7.7	5.8	0.6	1.3	0.4	0.11
K-2	7.2	19	15	14.0	6.9	1.0	1.4	0.3	0.15

表3 底質試料中のPAHs濃度 (溶媒抽出)

Sampleing site	An	Fl	Py	B[a]A	B[a]P	B[e]P	B[b]F	B[j]F	B[k]F	B[ghi]P	B[ah]A	MC	T-PAH	DCM Extract Amount (mg/g dry wt.)	IL (%)
S-1	0.1	1.2	0.4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.7	<0.1	0.78
S-2	18	136	140	63	23	12	48	57	45	21	5.7	<0.1	568.7	0.94	10.4
K-1	<0.1	74	26	19	30	16	26	24	18	25	18	<0.1	284.8	0.45	4.4
K-2	7.8	113	80	34	32	86	37	39	39	24	79	<0.1	570.8	0.80	6.4

の合計値である。全 PAHs (T-PAHs) 及び DCM 抽出物量秤量値を示している。T-PAHs は S-1 地点で最も低く 1.7 (ng/g dry wt.), S-2, K-1 及び k-2 地点では 260 ~ 570 (ng/g dry wt.) の範囲にあり, B[a]P 濃度は 23 ~ 32 (ng/g dry wt.) であった。DCM 抽出量と T-PAHs 及び IL% は比例していた。

3・3 B. R. 抽出による水質及び底質試料からの PAHs 添加回収実験

添加回収実験は, 水質試料 (S-1) 及び底質試料 (K-1) に 12 PAHs を 1.0 µg 添加したときの B. R. 量と PAHs 回収率を表 4 に, 攪拌時間と PAHs 回収率の関係を表 5 に示している。水質及び底質両試料は攪拌 3 時間以上で, 回収率の増加は認められず, 比較的短時間に平衡に達した。B. R. 量は水質及び底質両試料は 2.5 g 以上添加しても回収率には著しい変化は認められなかった。B. R. 量 2.5 g, 攪拌 2 ~ 3 時間で回収率

は 15 ~ 25%, 変動率は 32 ~ 64% であった。溶媒抽出法による同じ水質及び底質試料からの 12 PAHs 添加回収実験では, 回収率は 86 ~ 92%, 変動率は 6 ~ 10% であり, B. R. 抽出法の PAHs 回収率は溶媒抽出法の約 1/4 であった。

3・4 水質及び底質試料の変異原試験

表 6 及び表 7 は B. R. 抽出と溶媒抽出による水質及び底質試料中の変異原試験結果を示している。Ames-test 及び umu-test について, S9 mix を添加した場合と無添加の場合について行った。水質試料の B. R. 抽出物と溶媒抽出物いずれも Ames-test は陽性 (自然復帰コロニー数の 2 倍) でなかった。溶媒抽出物の umu-test は S-2, K-1 及び K-2 地点において, S9 mix 添加群に弱い変異原活性が認められ, S-2, K-1 及び k-2 地点の底質試料の溶媒抽出物の Ames-test は, S9 mix 添加 TA 98 群に変異原活性が認められ

表4 B. R. 抽出法によるB. R. 量とPAHs回収率(%)

sample	amount added 12PAHs	amount of B. R. added (g)					C. V.
		0.5	1.0	2.5	5.0		
river water 2L	1.0 µg	11.2	18.7	25.1	24.4	34~50	
river sediment 50g (wet wt.)/2L	1.0 µg	6.8	8.3	13.6	14.0	46~61	

C. V.; Coefficient of variation

表5 B. R. 抽出法による攪拌時間とPAHs回収率(%)

sample	amount added 12PAHs	amount of B. R. added 2.5g n=3					C. V.
		mixing time (hr)					
		1	3	6	12	24	
river water 2L	1.0 µg	20.8	24.4	25.2	24.3	23.8	32~53
river sediment 50g (wet wt.)/2L	1.0 µg	11.1	14.5	15.0	14.2	15.3	51~64

C. V.; Coefficient of variation

表6 B. R. 抽出法と溶媒抽出法による水質試料中の変異原性

試料	Ames-test				umu-test	
	TA98		TA1535/pks1002			
	+S9mix	-S9mix	+S9mix	-S9mix	+S9mix	-S9mix
S-1	a	56	50	—	—	
	b	46	48	106	107	
S-2	a	69	65	—	—	
	b	76	77	119	121	
K-1	a	60	62	—	—	
	b	71	42	130	109	
K-2	a	82	58	—	—	
	b	85	64	128	117	
	*	38	40	110	108	
	**	930	—	141	—	
	***	—	506	—	130	

a, B. R. ext. b, Solvent ext. (Fr. 2)

*Solvent control, Positive control **B[a]P 20nmol,

***DNP-mix. 0.5nmol

Ames-test: Revertants/2ℓ /plate

umu-test: β-garactsidase activity (unit)/2.5ℓ /well

表7 B. R. 抽出法と溶媒抽出法 (Fr. 2) による底質試料中の変異原性

試料	Ames-test				umu-test		
	A100		TA98		TA1535/pks1002		
	+S9mix	-S9mix	+S9mix	-S9mix	+S9mix	-S9mix	
S-1	a	48	42	40	38	—	—
	b	38	40	45	35	120	110
S-2	a	65	53	90	64	—	—
	b	203	57	230	77	157	128
K-1	a	70	65	85	92	—	—
	b	228	55	273	92	153	126
K-2	a	98	58	133	81	—	—
	b	275	66	355	94	161	138
	*	40	—	38	—	118	—
	**	430	—	860	—	135	—

a, B. R. ext. b, Solvent ext. (Fr. 2)

*Solvent control, **Positive control B[a]P 20nmol

Ames-test: Revertants/2.5g (wet wt.)/plate

umu-test: β-garactsidase activity (unit)/5.0g (wet wt.)/well

た。底質試料の溶媒抽出物についての Ames-test と umu-test の試験結果は比較的類似した傾向が認められた。

4. 考 察

4・1 抽出物質

小瀬ら⁶⁾は PAHs を含んでいると考えられる焼却場排水を用いて、B. R. 抽出法と XAD-2 樹脂カラム法と吸着の比較の検討を行って、ZAD-2 の吸着が約 3 倍高いことを報告している。坂本ら¹²⁾は、淀川の水質試料から得た B. R. 懸垂法とバッチ法による抽出物の

同定を薄層クロマトグラフィーと HPLC をもちいて An, Ch, 7,12-ジメチルベンズ [a] アントラセン, B [k]F, MC 及び B[a]P を同定している。

本報告における同一水質及び底質試料を用いた B. R. 抽出と溶媒抽出物 (Fr. 2) について GC/MS による検索を行い、水質中からは, Py, B[e]P, B[b]F, B[j] F 及び [k]F の 5 PAH が同定された。底質中からは, An, Fl, Py, B[a]A, B[a]P, B[a]P, B[e]P, B[b]F, B[j] F, B[k]F, B[ghi]P, B[ah]A, Ch, Tr, 及び Per の 14 PAHs が同定された。水質及び底質試料いずれも B. R. 抽出の各 PAHs の相対濃度比は溶媒抽出の約 1/4 ~

1/6であった。

4・2 PAHsの添加回収実験

B. R. 抽出法による水質及び底質試料からのPAHs添加回収実験では、水質試料2 L、底質試料50 g (wet wt.) の場合、B. R. 量が2.5 g、攪拌時間が2～3時間のとき回収率が高かった。しかし、回収率は15～25%、変動率は32～64%で、PAHsに関しては定量性、再現性共に良好とは言えない。溶媒抽出法による同様の添加回収実験では、回収率が86～92%、変動率が6～10%であり、溶媒抽出法の回収率はB. R. 抽出法の約4倍であった。内海ら⁹⁾は、河川水中の変異原物質の吸着量が、B. C. と未処理脱脂綿との間に差は認められなかったと報告している。B. C. あるいはB. R. の回収率が著しく低い理由として、PAHsは水質や底質中のフミン質との親和力が強いこと²⁰⁾、またPAHsが疎水性であるために銅-フタロシアニン吸着量より繊維組織への吸着量が多くなると考えられる。

溶媒抽出法は水質あるいは底質試料中の変異原物質の回収率が高く、変異原物質を定量的に捕捉することが可能であり、さらに粗抽出物の分離分画によりGC、HPLCやGC/MS分析のための詳細な試料を得るのに適していると考えられる。

4・3 生物学的試験

変異原試験結果では、水質試料のAmes-testでは変異原活性は認められなかったが、umu-test (+S9 mix) で弱い変異原活性が認められた。坂本ら¹²⁾は、B. C. 抽出法による、旭川及び淀川の河川水の変異原活性が、1420 (revertants/1 g, TA 98 +S9 mix) 及び3600 (revertants/1 L, TA 98 +S9 mix) であったことから、フレームシフト型の間接変異原性物質が示唆されるとしている。北森ら²²⁾はDCM酸性抽出により工場排水の流入する河川水のAmes-testで119～149 (revertants/100 ml, TA 100 +S9 mix, -S9 mix) の変異原活性を認め、工場排水の流入しない上流河川水質については認められなかったと報告している。

河川水の変異原試験に関する多くの報告^{8, 9, 12～15, 22)}があるが、変異原活性の比較は抽出濃縮方法の違いや濃縮倍率の違いを考慮する必要があり、簡単には比較はできない。

底質試料においては、Ames-test, umu-test いずれもS9 mixを添加した場合において無添加の場合よりも幾分高い変異原性が認められた。しかし底質中にはAmes-testに致死作用を示す物質や阻害物質などが含まれているため、他のフラクションについても量一反応の詳細な検討を行う必要がある。

同じ試料を用いた変異原試験で、umu-testはAmes-testより変異原活性が高い成績を得たことから、致死作用を示す物質を含む^{23, 24)}に有効であると考えられ、小瀬ら⁸⁾も同様の報告をしている。

5. ま と め

河川水質及び底質試料を用いて、B. R. 抽出法及び溶媒抽出法を比較検討するために、それぞれの抽出物をGC/MSによる同定、PAHsの添加回収実験と変異原試験を行って、次の結論を得た。

1) GC/MSにより、水質試料から、Py, B[e]P, B[b]F, B[j]F及び[k]の5 PAHsが、底質試料からは、An, Fl, Py, B[a]A, B[a]Pなど14 PAHsが同定された。

2) B. R. 抽出による水質及び底質試料からの12 PAHs添加回収実験では水質2 L、底質50 g (wet wt.) の場合、B. R. 量2.5 g、攪拌2～3時間で回収率15～25%、変動率32～64%であった。B. R. 抽出と同様の試料を用いた溶媒抽出では、回収率86～92%、変動率6～10%であった。

3) 水質試料のAmes-testは変異原活性が認められず、umu-test (S9 mix) では弱い変異原活性が認められた。

4) 底質試料に対するAmes-testとumu-testの試験結果は同様の成績を示した。

謝 辞

変異原試験の指導及び試験菌株を供与していただきました大阪府立公衆衛生研究所中村精一博士に厚くお礼申し上げます。また、本報告をまとめるにあたり、適切なご指導をいただきました岡山県環境保健センター所長森忠繁博士に深謝します。

なお、本研究の一部は第17回環境保全・公害防止研究発表会(1991年1月・東京)で発表した。

一引用文献一

- 1) 河崎哲久：地下水汚染の現状と対策，水質汚濁研究，Vol. 8, No. 5, pp. 2～6, 1985.
- 2) 佐谷戸安明，中室克彦，安藤正典，石塚美恵子，佐野仁，頭本藤雄：多摩川水系地下水中の低沸点有機塩素化合物の分布と塩素化反応生成物の消長について，水質汚濁研究，Vol. 6, No. 1, pp. 39-45, 1983.
- 3) 佐谷戸安明，安藤正典，中室克彦：低沸点塩素化合物の一般毒性・発癌性・突然変異性，変異原と毒性，Vol. 7, 65-87, 1980.
- 4) 米田環境保護庁編：飲料水中の各種化学物質の健康影響評価—健康に関する勧告集—日本水道協会，pp. 444-450, 1987.
- 5) 中室克彦：水質汚濁物質の変異原性，水質汚濁研究，Vol.

- 7, No. 7, pp. 424-427, 1984.
- 6) 小瀬洋喜ほか：陸水域における環境変異原物質の動態に関する研究，環境保全研究成果集，14-1-14-25, 1987.
- 7) 浦野紘平，芳賀神之，江本ふで子：水道水の変異原試験方法，水道協会雑誌，Vol. 57, No. 3, pp. 36-49, 1988.
- 8) Sayato, Y., Nakamuro, K. and Ueno, H.: Studies on preconcentration methods for detecting the mutagenicity of organics in drinking water, *Eisei Kagaku*, 33, 328-338.
- 9) 富田基郎，真鍋仁，濱田昭：河川水及びその塩素処理水の変異原物質について—直接濃縮法による変異原物質濃縮の限界—，水質汚濁研究，Vol. 3, No. 3, pp. 187-192, 1980.
- 10) Hayatsu H., Oka T., Ohara, Y., Hayatsu T., Kobayashi, H. and Arimoto, S.: Adsorption of mutation to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, *Mutat. Res.*, No. 119, pp. 233-238, 1983.
- 11) G. Obe: *Advances in mutagenesis Research 1*, pp. 1-26, Springer-Verlag, Germany, 1990.
- 12) Sakamoto H. and Hayatsu H.: A Simple Method for Monitoring Mutagenicity of River Water. Mutagens in Yoda River System, Kyoto-Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxcol.* No. 44, pp. 521-528, 1990.
- 13) Kira S., Hayatsu H. and Ogata M.: Detection of Mutagenicity in Mussels and Their Ambient Water, *Bull. Environ. Contam. Toxcol.* No. 43, pp. 583-589, 1989.
- 14) 山内あい子，松本典文，中川博之，大塚孝子，山崎裕康，垣内靖男，ブルーコットン吸着法による河川水中の多環芳香族炭化水素の分析，衛生化学，Vol. 35, No. 4, pp. 283-290, 1989.
- 15) 内海英雄，濱田昭，早津彦哉，橋本徳蔵，相沢靖：河川水中変異物質の季節・流域変動—青綿法による検討及び従来の水質汚濁指標との比較—水質汚濁研究，Vol. 12, No. 5, pp. 19-22, 1989.
- 16) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, No. 113, pp. 173-215, 1983.
- 17) 労働省安全衛生部化学物質調査課：微生物を用いる変異原試験ガイドブック，中央労働災害防止協会，1981.
- 18) Sei-ichi Nakamura, Yoshimitsu Oda, Tsutomu Shimada, Iwashiro Oki and Kanji Sugimoto: SOS-induction activity of chemical carcinogen and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA 1535 /pSK 1002 examination with 151 chemicals, *Mutat. Res.*, No. 192, pp. 239-246, 1987.
- 19) Yoshimitsu Oda, Sei-ichi Nakamura, Iwashiro Oki, Takeshi Sato and Hideo Shinagawa: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, No. 147, pp. 219-229, 1985.
- 20) 剣持堅志，今中雅章，松永和義，小田淳子，岡本泰明，石田立夫：岡山県環境保健センター GC/MS 情報解析管理システムの開発，第5報プリサーチ法による高速未知スペクトル検索システムとデータベース情報検索システムの開発，岡山県環境保健センター年報，No. 11, 89-96, 1987.
- 21) 篠原亮太：底質中の多環芳香族炭化水素の分布及び挙動，水質汚濁研究，Vol. 12, No. 5, pp. 13-18, 1989.
- 22) 北森成治，中村又善，松尾宏：環境水に関する変異原性の評価—機械すき和紙製造工場排水の評価—，用水と廃水，Vol. 31, No. 11, pp. 36-41, 1989.
- 23) 安部明美，杉山英俊，井口潔，久松由東，西村啓治，松下秀鶴：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，Vol. 10, No. 2, pp. 123-129, 1987.
- 24) 環境庁環境保健部保健調査室 “底質環境調査：底質環境変異原データ集”，pp. 123-171, 1987.