

環境水の *in vitro* バイオアッセイによる包括的安全性評価

中 室 克 彦*

1. はじめに

我が国において現在、工業的に生産されている化学物質は約5万種存在すると考えられており、その生産量、種類は年々増加している¹⁾。また、ケミカルアブストラクトの化学物質データベースの登録化学物質は1800万種類にのぼり、毎年80万種ずつ増加している。環境庁によって昭和49年度から平成10年度の24年間にわたり毎年実施された化学物質環境追跡調査によると、今までの調査の分析対象となった775種類の化学物質のうち約40%に当たる307種の化学物質が水域環境、底質や大気などの環境中から検出されている。これらの報告から考えて、我が国においては、現在少なくとも1~2万種類の合成化学物質が環境中に蓄積していることが推定される²⁾。

このような化学物質の中には、製造、使用、廃棄の過程を通じて生活環境中に拡散あるいは蓄積することによって、ヒトの健康や生態系に悪影響を及ぼす可能性のあることが考えられる。例えば、家庭用品、食品や飲料水中に含有する化学物質をはじめ農薬、労働環境中に存在する化学物質ならびに大気汚染物質などには、慢性毒性、発がん性、変異原性や免疫毒性など種々の毒性影響を及ぼすことがすでに数多く報告されている³⁻⁶⁾。また、合成化学物質のほかに、ゴミの焼却処理によって非意図的に生成するダイオキシン類は免疫抑制、生殖毒性、催奇形性や発がん性を有することが知られている^{7,8)}。

環境水には、これら複雑多岐にわたる数多くの有害化学物質を含有することが考えられる。環境水中有害化学物質の分布に関する実態調査は多く認められるが、これらの化学物質を個々に化学分

析するには、膨大な時間、労力および費用を必要とする。そのため、これら環境水に含まれる有害化学物質の毒性を包括的に評価することは重要なことである。しかし、環境水の質の異なる毒性を種々のバイオアッセイを用い包括的に評価した報告は認められない。そのため、本研究においては、環境水として琵琶湖-淀川水系河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮法によって得られた濃縮画分を用いて、エストロゲン様活性を酵母 two-hybrid 法および Ishikawa 細胞-アルカリホスファターゼ法を用いて評価した。さらに、エストロゲン様活性と関連性を有すると考えられる免疫毒性⁹⁾をマウスリンパ球幼若化反応試験によって評価した。さらに遺伝毒性の指標に用いられる変異原性が検出できる Ames assay を組み合わせることによって、環境水の種々の潜在的な毒性を包括的に安全性評価するバイオアッセイバッテリーとして適用しうるか否かについても検証するとともに、環境水中の変異原物質の起源ならびに運命の把握を試みたので紹介する。

2. 実験方法

2.1 試験対象試料

琵琶湖-淀川水系河川水の試料は、図1に示すように琵琶湖(北湖)、琵琶湖(南湖)、宮前橋(桂川)、御幸橋(宇治川)、御幸橋(木津川)、枚方大橋(淀川)、庭窪(淀川)、柴島(淀川)の8地点において1998年10月28日に湖水および河川水の表層水を採水した。また、枚方市内を流下する天野川、船橋川、利根川、穂谷川、北条川の河口付近、山田池の池水を採水した。また京都府あるいは大阪府下に所在するし尿処理施設あるいは

*摂南大学 名誉教授



図 1. 琵琶湖－淀川水系の湖水，河川水の採水地点

下水処理場放流水および枚方市内国道 1 号線の道路側溝の初期降水に由来する道路排水を採取した。

2.2 試料水の XAD-2 樹脂カラム濃縮法¹⁰⁾

常法どおり洗浄した XAD-2 樹脂（オルガノ）を充填したカラムに，あらかじめ HCl で pH3 に調整した琵琶湖－淀川水系の湖水あるいは河川水などの試料水 20 L を通水して可溶性有機物質を吸着させた。通水後，カラム内の水を除去し，酢酸エチルおよびエタノール各 500 mL を用いて順次溶出させた。ロータリーエバポレーターで濃縮乾固後，残留物をジメチルスルホキシド（DMSO）2 mL に溶解したものをそれぞれ酢酸エチル（あるいはジクロロメタン）濃縮画分およびエタノール濃縮画分とした。これら濃縮画分はいずれも 10,000 倍濃縮に相当する。

2.3 Ames assay による変異原性の測定¹¹⁾

各濃縮画分をろ過滅菌後，*Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 株を用いて液体プレインキュベーション法で直接変異原性試験を行った。また，間接変異原性試験については，フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンで前処置したラット肝 S9（9000 × g 上清，オリエンタル酵母工業（株））に補酵素を添加した S9 mix を用いて試験した¹¹⁾。

試料水の変異原性は各菌株の自然発生復帰変異コロニー数に対する突然復帰変異コロニー数の比（mutagenicity ratio）で表し，用量依存性を示すとともに自然発生復帰変異コロニー数の 2 倍以上

を示したものを陽性と判断した。

2.4 酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン様活性の測定¹²⁾

酵母 Y190 を用いた酵母 two-hybrid 法によって測定した。一晚培養した酵母前培養液に濃縮画分の一定量を加え，30℃，4 時間培養した後，生菌数として 630 nm における吸光度を測定した。残りの培養液を遠心分離後 zymolyase 処理で菌体を破壊し，基質として o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside を加え，30℃で 18 時間反応させて生成する o-nitrophenol を 405 nm と 560 nm における吸光度を測定し，Nisihara らの式¹²⁾から β-galactosidase 活性を算出した。試料水のエストロゲン様活性は，17β-エストラジオール（ $2 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-9}$ mol/L）を用いて作成した検量線から求めた当量値を求めた。

2.5 Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法を用いたエストロゲン様活性の測定¹³⁾

ヒト子宮内膜がん由来でエストロゲンレセプターを保有する Ishikawa 細胞の 15% FBS を含む DMB 培地を用いた前培養液を 24 穴プレートに 15×10^4 cells/well になるように播種した。これら 37℃，5% CO₂/95% air の条件下で 24 時間培養し，プレート底面に細胞を付着させた。ついで，濃縮画分の一定量を含む CD-FBS-D-MEM 培地と交換し，さらに 37℃，5% CO₂/95% air の条件下で 3 日間培養した。培養終了後，アルカリホスファターゼ活性を測定した¹⁴⁾。また，試料水のエストロゲン様活性は，17β-エストラジオール（ $5 \times 10^{-12} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol/L）に対するアルカリホスファターゼ活性の検量線から試水量 1 L あたりの 17β-エストラジオール当量値を求めた。

2.6 マウスリンパ球幼若化反応試験による免疫毒性の測定^{15~17)}

1) 動物：C3H/He 系雄性マウスおよび BALB/c 系雄性マウス（7 週齢，日本エルエルシー（株））

を用いた。これら動物に対して、 γ 線滅菌固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業 (株)) および滅菌水道水を与え、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 47~67%、明暗サイクル 12 時間のバリアシステムを施した動物室で 1 週間飼育し、いずれも 8 週齢のものを実験に供した。

2) マウス脾臓細胞懸濁液の調製: B 細胞幼若化反応については、C3H/He 系雄性マウスを、また T 細胞幼若化反応については、BALB/c 系雄性マウスを用い、いずれも頸椎脱臼後、無菌的に解剖して脾臓を摘出した。ついで、10% FCS 含有 RPMI-1640 培地 10 mL を脾臓内に注射器を用いて注入し、flushing 法により脾臓細胞を分離した。この脾臓細胞懸濁液を遠心管に取り、氷冷下放置して結合組織を沈殿除去した後、上清の浮遊細胞を 4°C 、 $300 \times g$ 、7 分間遠心分離した。上清を除去した後、10% FCS 含有 RPMI-1640 培地を用いて脾臓細胞を再懸濁した。B 細胞は 2×10^5 cells/well、T 細胞は 1×10^5 cells/well となるようにマウス脾臓細胞懸濁液を 96 穴のマイクロプレート (Labosystems 社) に $200 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ播種した。

3) Mitogen および濃縮画分の曝露: B 細胞幼若化反応については、mitogen として *E. coli* 由来 lipopolysaccharide (LPS, type 0111: B4, Sigma-Aldrich 社) を最終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各 well に加え、また T 細胞幼若化反応については、concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich 社) を $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。さらに、濃縮画分の DMSO 溶液の一定量を加え、 37°C 、5% $\text{CO}_2/95\%$ air の条件下で 4 日間培養した。

4) Ethidium bromide 蛍光法による細胞増殖率の測定¹⁷⁾: マウスリンパ球幼若化反応によって増殖した脾臓細胞の増殖率は、ethidium bromide 蛍光法を用いて測定した。すなわち、4 日間培養後の 96 穴マイクロプレート中の細胞を 4°C 、 $500 \times g$ 、10 分間遠心分離して培地を除去した後、各 well に PBS(-) $100 \mu\text{L}$ を添加し、さらに遠心分離し

て上清を除去した。さらに、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS, 和光純薬工業 (株)) 溶液 $200 \mu\text{L}$ を添加後、30 分間放置して細胞を溶解させた。次に $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide 溶液 (Sigma-Aldrich 社) $100 \mu\text{L}$ を加えて細胞中の DNA と反応させ、15 分放置後、蛍光マイクロプレートリーダー (MTP-200F, コロナ電気 (株)) を用いて、励起波長 515 nm、蛍光波長 620 nm における蛍光強度を測定することによって細胞中の DNA 量を算出した。牛胸腺 DNA (Sigma-Aldrich 社) を用いて作成した $0\sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲の検量線に基づき濃縮画分曝露細胞中の DNA 量を算出した。なお、細胞増殖率は、以下の計算式に従って算出した。

$$\text{Blastformation (\%)} = \frac{[(E-E') / (E_0-E_0')] \times 100}{\text{ただし、E: 被験物質および mitogen を曝露した細胞の DNA 量}} \\ \text{E': 被験物質を曝露し、mitogen 無処理の細胞の DNA 量}} \\ \text{E}_0: \text{被験物質非曝露で、mitogen 処理した細胞の DNA 量}} \\ \text{E}_0': \text{被験物質非曝露、mitogen 無処理の細胞の DNA 量}}$$

3. 結果及び考察

3.1 エストロゲン様活性の 2 つの検知系の異なる手法による評価

琵琶湖 - 淀川水系河川水中のエストロゲン様活性物質の分布の実態を酵母 two-hybrid 法および Ishikawa 細胞 - アルカリホスファターゼ法によって検出することによって評価した。

1) 酵母 two-hybrid 法による評価

琵琶湖 - 淀川水系河川水について、XAD-2 樹脂カラム濃縮画分を用いて内分泌攪乱作用としてのエストロゲン様活性を酵母 two-hybrid 法を用いて検討した。その結果を図 2 に示す。エストロゲン様活性は、琵琶湖 (北湖と南湖)、桂川、木

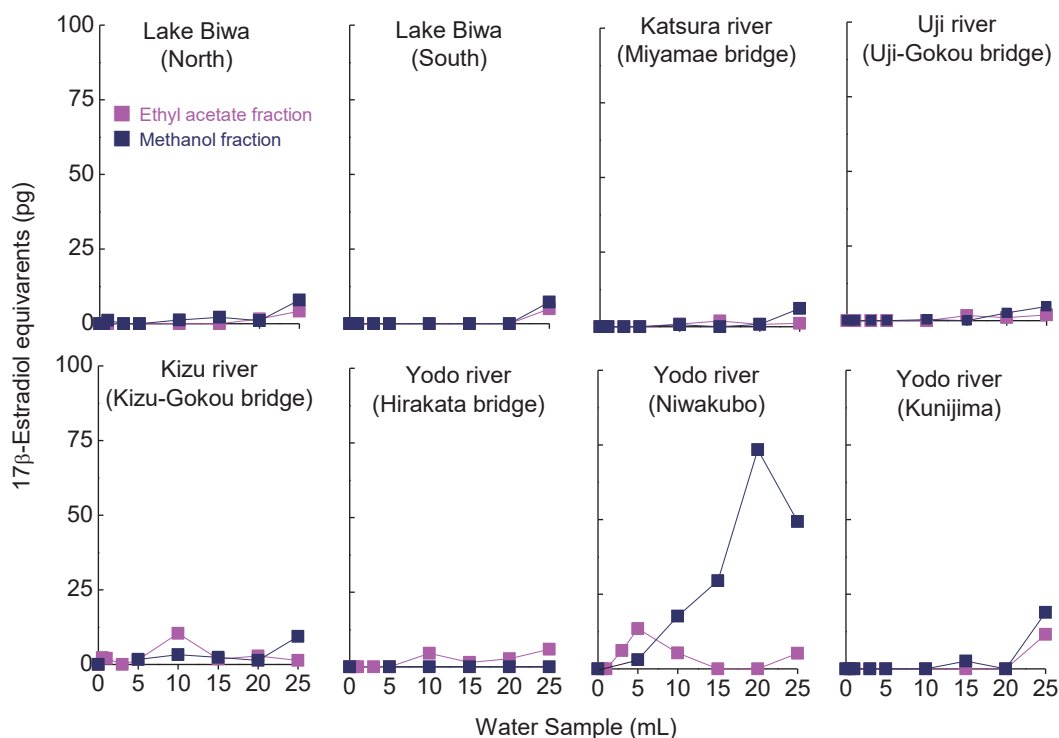


図2. 琵琶湖－淀川水系河川水の XAD-2 樹脂カラム濃縮画分の酵母 Two-hybrid 法によるエストロゲン様活性

津川、宇治川などほとんどの地点における湖水や河川水の酢酸エチルおよびメタノール画分において弱いながら認められ、淀川庭窪地点の河川水ではエストロゲン様活性がやや高い傾向を示した。これらの結果から、淀川水系河川水の酢酸エチルおよびメタノール画分におけるエストロゲン様活性はいずれも河川の流下に伴って上昇する可能性が示唆されたが、流下過程でのエストロゲン様活性の変化については、今後、より詳細な検討が必要である。琵琶湖－淀川水系河川水の水質汚濁に関しては桂川の宮前橋地点において有機物汚濁の指標である BOD や KMnO_4 消費量が高く¹⁸⁾、また DNA 傷害性を示す変異原性も高い¹⁹⁾ が、エストロゲン様活性を示さないという興味深い結果が得られた。桂川の宮前橋地点の河川水中にはエストロゲン様活性を抑制する物質が含まれている可能性が推定された。

3.2 Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法による評価

ヒト子宮内膜がん由来の樹立細胞株であり、エストロゲンレセプターを保有する Ishikawa 細胞

を用い、エストロゲン依存性のアルカリホスファターゼ活性を測定することから環境水中のエストロゲン様物質の検索を行った。その結果を図3に示す。今回用いた湖水や河川水のメタノール画分はいずれの地点においてもエストロゲン様活性を示さなかった。しかし、酢酸エチル画分においては、桂川宮前橋地点の河川水以外で明らかなエストロゲン様活性を示した。この Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法を用いたときの桂川宮前橋地点河川水においてエストロゲン様活性が検出されないことは、酵母 two-hybrid 法による検討結果と類似していた。このことは桂川宮前橋地点河川水中には Ishikawa 細胞におけるエストロゲン様活性の発現を抑制する物質、あるいは細胞の増殖を阻害する物質を含有する可能性を示した。しかしながら、酵母 two-hybrid 法と Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法を用いた方法において酢酸エチル画分およびメタノール画分における感受性の相違は、何に起因するかは不明であるが、種の違いによる膜構造、代謝あるいは防御機構の相違に起因することが考えられる。

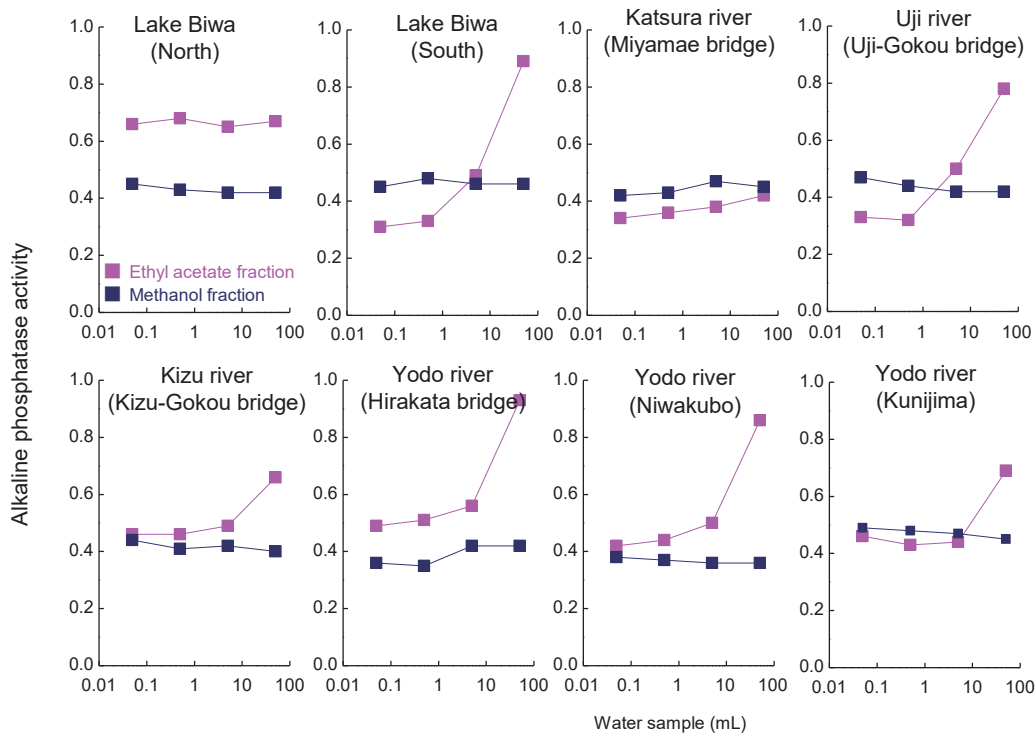


図 3. 琵琶湖－淀川水系河川水の XAD-2 樹脂カラム濃縮画分の Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法におけるエストロゲン様活性

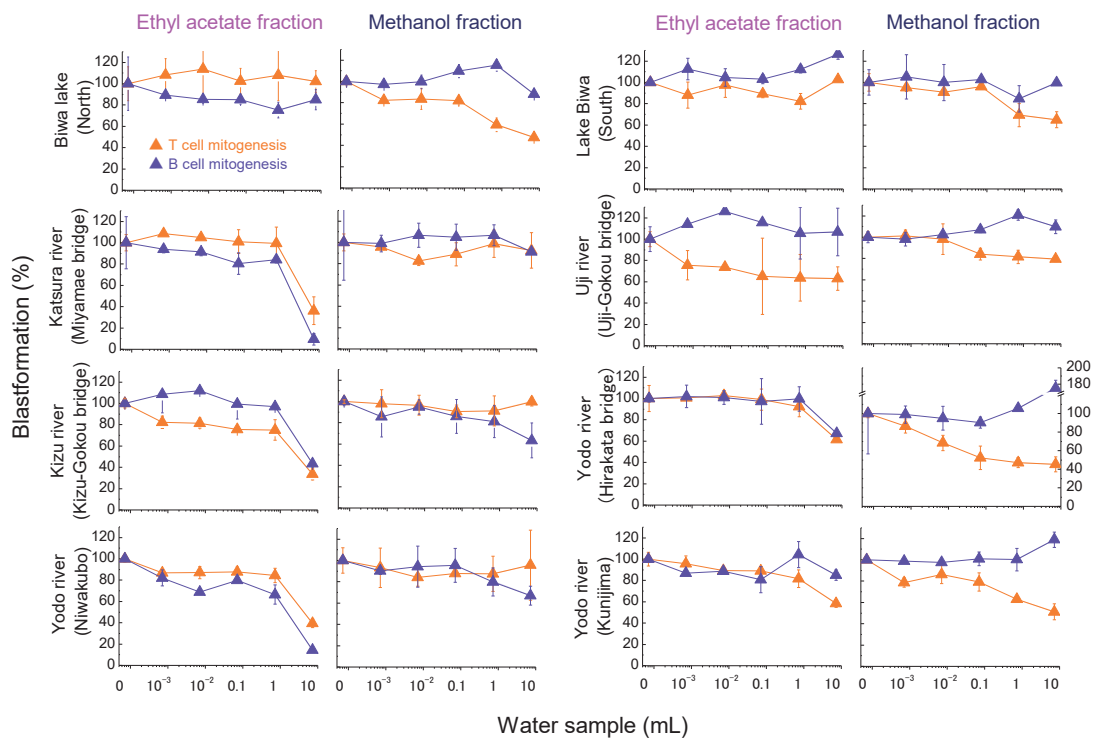


図 4. 琵琶湖－淀川水系河川水の XAD-2 樹脂カラム濃縮画分のマウスリンパ球幼若化反応試験による免疫毒性

3.3 免疫毒性のマウスリンパ球幼若化反応を利用した評価

環境水中の化学物質の免疫毒性を把握する目的で、琵琶湖湖水と淀川水系河川水の XAD-2 樹脂

カラム濃縮画分について、マウス脾臓由来の T リンパ球細胞および B リンパ球細胞を用い幼若化反応 (blastformation) に対する影響を検討した。図 4 に示すように、琵琶湖北湖および淀川 (枚方

大橋)のメタノール画分, ならびに桂川(宮前橋), 木津川(御幸橋)および淀川(枚方大橋, 庭窪および柴島)における酢酸エチル画分などでTリンパ球細胞あるいはBリンパ球細胞の幼若化反応に対する抑制傾向が認められた。以上の結果から, とくに淀川水系河川水の酢酸エチル画分は免疫毒性を示す物質を含有する可能性が考えられた。各地点の河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮画分が示した幼若化反応の抑制と酵母 two-hybrid 法ならびにIshikawa細胞-アルカリホスファターゼ法によるエストロゲン様活性との間に関連性は認められなかった。免疫毒性とエストロゲン様活性に関連性のないことは, 異なるエンドポイントである毒性の評価指標として有効であることが考えられた。

3.4 変異原性の Ames assay による評価

琵琶湖-淀川水系河川水について, Ames assay による変異原性の検討を行った結果, これら淀川水系のいずれの地点の河川水における酢酸エチルおよびメタノール画分は, 塩基対置換型の

変異原性が認められなかった。そのため変異原性が検出されたフレームシフト型変異原性の結果を図5に示す。

琵琶湖-淀川水系河川水のメタノール画分において淀川の柴島地点以外は全て変異原性を示さなかった。これに対して酢酸エチル画分においては淀川水系のいずれの地点においても変異原性を示すが, 桂川(宮前橋)地点が最も強い変異原性を示した。桂川, 宇治川および木津川の三川合流後は, 淀川の枚方大橋→庭窪→柴島に下流するに従って, フレームシフト型の直接および間接変異原性はいずれも増大する傾向を示した。変異原性が桂川(宮前橋)地点の河川水で高いことや淀川が流下するに従って変異原性が増大する傾向を示したことは, 既報の事実¹⁹⁾と一致した。また, 琵琶湖-淀川水系河川水が示す変異原性は, エストロゲン様活性および免疫毒性との関連性は認められなかった。

これら各種のエンドポイントの異なるバイオアッセイを用いて琵琶湖-淀川水系河川水の毒性を包括的に評価したが, いずれも関連性がないこ

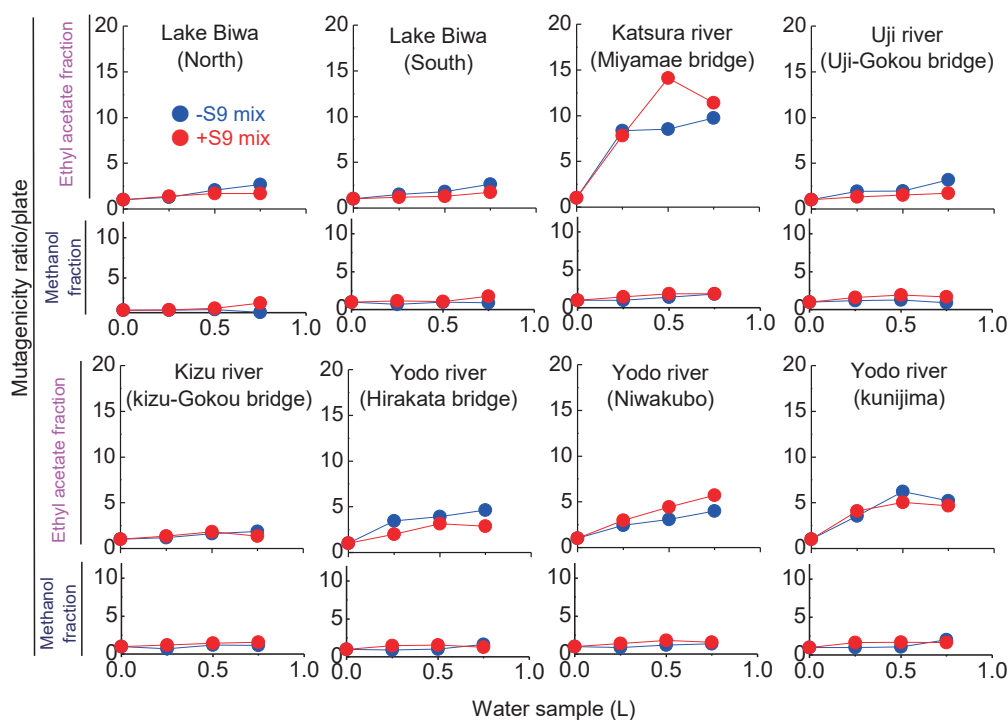


図5. 琵琶湖-淀川水系河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮画分のAmes assayによるフレームシフト型変異原性

とを認めた。これらの事実から、酵母 two-hybrid 法あるいは Ishikawa 細胞 - アルカリホスファターゼ法を用いた内分泌攪乱作用、マウスリンパ球幼若化反応阻害試験による免疫毒性および Ames assay による変異原性などの異なるエンドポイントを指標として環境水の毒性を総合的に評価することは有意義であると考えられる。

3.5 琵琶湖 - 淀川水系河川水中変異原物質の起源ならびに運命¹⁹⁾

淀川水系河川水の変異原性の特長は、塩基対置換型変異原性は認められずフレームシフト型変異原性を有意に示すことである。これらフレームシフト型変異原物質は、何に由来するかを知るため変異原物質の運命を検討することは、環境水を保全するために有意義なことである。そこでこれら変異原物質の起源および運命を把握するため、都市小河川水、し尿処理場放流水、公共下水処理場放流水、道路排水などについて、XAD-2 樹脂カラム濃縮法で得られた濃縮画分について Ames assay を実施した。

1) し尿処施設放流水および下水処理場放流水の Ames assay による変異原性

環境水中変異原物質の起源を明らかにするため都市河川への流入量の大きいし尿処理場放流水および下水処理場放流水の変異原性について検討した。その結果を図 6 および図 7 に示す。し尿処理施設放流水の変異原性は XAD-2 樹脂カラム濃縮法によって得られたジクロロメタンとメタノール

画分のいずれもフレームシフト型直接変異原性および塩基対置換型直接変異原性が高い特徴を示すのに対し、下水処理場放流水のジクロロメタンとメタノール画分のいずれもフレームシフト型間接変異原性が特異的に高いことを示した。このことは、し尿は消化タンク - 活性汚泥法による処理に対し下水は活性汚泥法のみによるため、処理方式の違いに起因することが考えられた。

2) 道路排水の Ames assay による変異原性

環境水中変異原物質の起源の 1 つと考えられる初期降水による道路排水の XAD-2 樹脂カラム濃縮法によって得られたジクロロメタンとメタノール画分の変異原性について検討した。図 8 に示す結果から、*Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 株に対していずれも S9 mix 添加時に高い変異原性を示すが、フレームシフト型間接変異原性の方が塩基対置換型間接変異原性よりも強い興味ある結果を示した。これら変異原性に寄与する物質は、自動車排ガス成分である脂溶性からやや水溶性よりの多環芳香族炭化水素類や芳香族系化合物などで代謝活性化されて変異原性を発現するものであることが考えられた。

3) 都市小河川水の Ames assay による変異原性

淀川水系は、琵琶湖から流れ出る宇治川、京都市北部山地を水源とする桂川、および奈良県を源流とする木津川の三川が大山崎の地点で合流した後の河川を淀川と呼ぶ。さらに枚方大橋まで流下する間の左岸に位置する枚方市から流入する小河川以外は流入する河川がない。そこで家庭からの

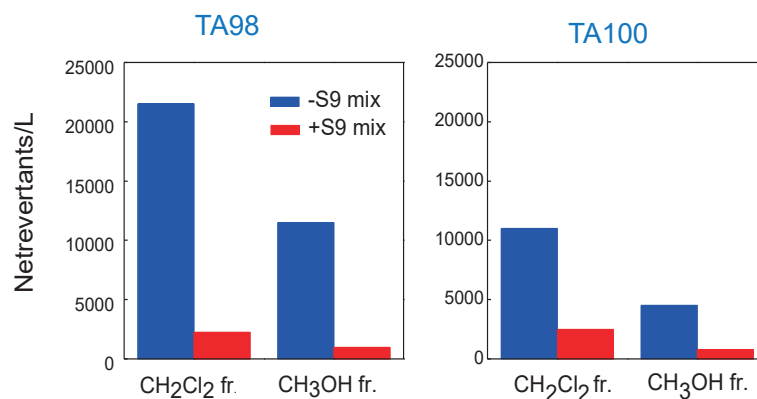


図 6. し尿処施設放流水の XAD-2 樹脂カラム濃縮画分のフレームシフト型変異原性

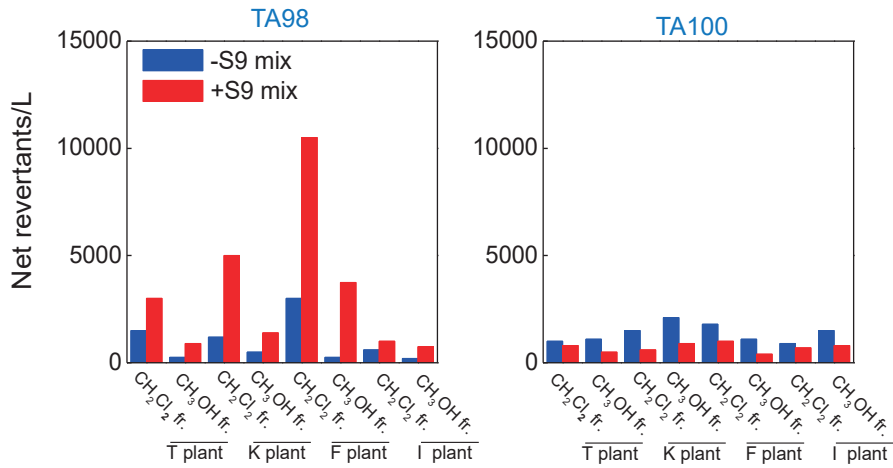


図7. 下水処理場放流水のXAD樹脂カラム濃縮画分のフレームシフト型および塩基対置換型変異原性

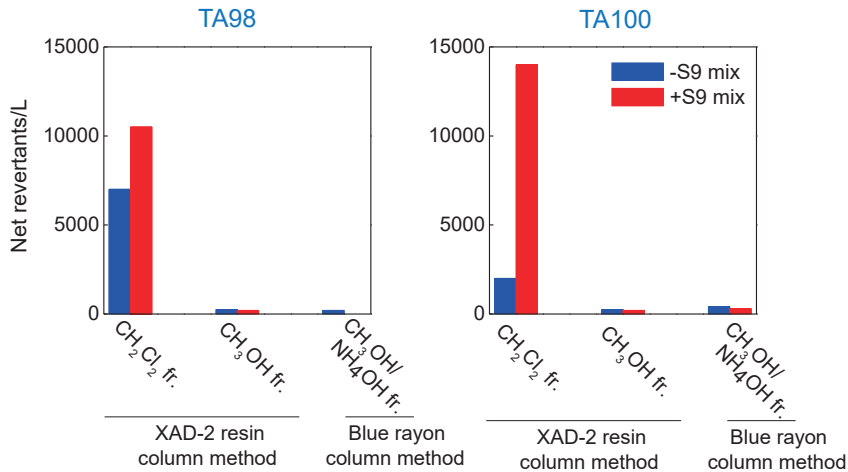


図8. 道路排水のXAD樹脂カラム濃縮画分のフレームシフト型および塩基対置換型変異原性

雑排水や道路排水，下水処理場放流水などが流入するこれら都市河川の変異原性について検討した。その結果，図9に示すように下水処理場放流水が流入している天野川，船橋川，山田池などにおいて共通してフレームシフト型間接変異原性がフレームシフト型直接変異原性より高いことを示した。この原因の一つに下水道の普及している都市域の小河川水は，フレームシフト型間接変異原性を示す下水処理場放流水が河川の固有水量の大部分を占めることに起因することが考えられた。さらに，道路排水による変異原性の寄与も考えられた。

4) 大都市域環境中変異原物質の起源および運命
琵琶湖－淀川水系河川水中変異原物質の起源ならびに運命に関する検討から，図10に示すごと

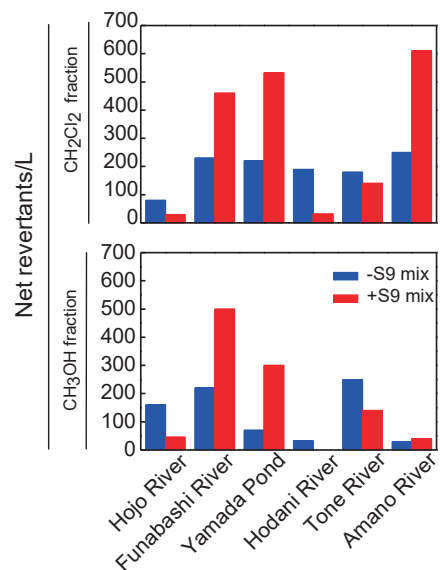


図9. 都市河川水のXAD樹脂カラム濃縮画分のフレームシフト型変異原性

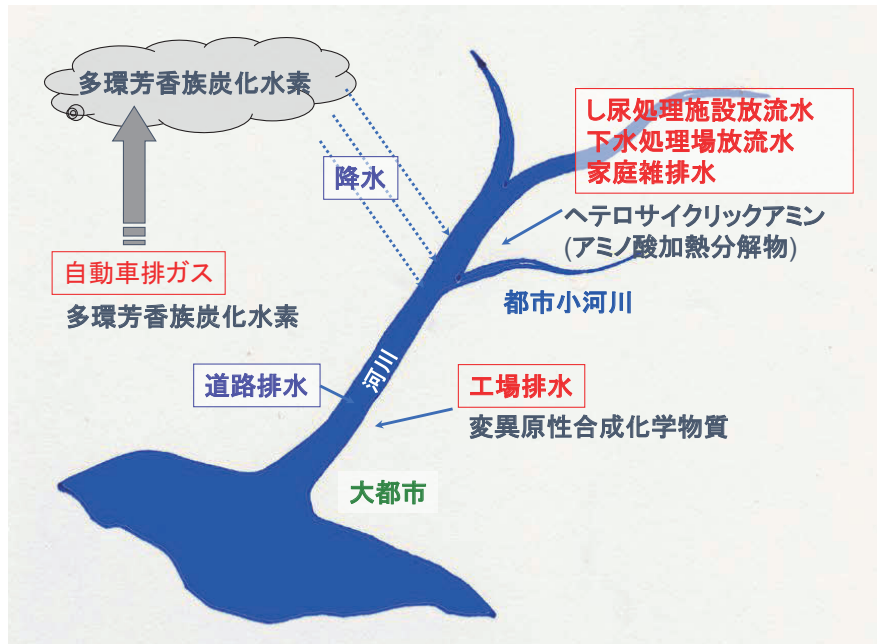


図 10. 大都市域環境中の変異原物質の起源および運命

く大都市域の環境水中変異原物質の起源および運命が明らかになった。すなわち、水環境における変異原物質の起源としては、フレイムシフト型および塩基対置換型の直接変異原性が高いし尿処理施設放流水、フレイムシフト型間接変異原性が特異的に高い下水処理場放流水（魚・肉の焼き焦げ成分ヘテロサイクリックアミンを含む家庭雑排水を含む）が考えられる。さらに、自動車排ガス由来の多環芳香族炭化水素などを含みフレイムシフト型と塩基対置換型の間接変異原物質を含む道路排水なども都市小河川を通じ本川に流入している。

このような環境中の変異原物質の運命から琵琶湖－淀川水系河川には種々の性質を示す変異原物質を含む排水が流入するが、本川である淀川の河川水の変異原性の特長は、フレイムシフト型間接変異原性であることを明らかにした。

4. まとめ

琵琶湖－淀川水系の湖水および河川水に含有する微量の毒性物質を評価するために、これら湖水と河川水の XAD-2 樹脂カラム濃縮法によって得られた濃縮画分について、種々の *in vitro* バイオアッセイを用いてエストロゲン様活性、免疫毒性および変異原性に関して包括的な安全性評価なら

びに変異原物質の起源および運命について検討を行って得られた結論を以下に示す。

- 1) 琵琶湖－淀川水系の湖水と河川水はエストロゲン様活性物質を含有することが認められた。
- 2) 淀川水系河川水の酢酸エチル画分については、酵母 two-hybrid 法および Ishikawa 細胞－アルカリホスファターゼ法によって得られたエストロゲン様活性の挙動が必ずしも一致しなかった。
- 3) 淀川水系の桂川宮前橋の河川水には、エストロゲン様活性を抑制する物質または細胞増殖を阻害する物質の存在が示唆された。
- 4) 淀川水系河川水の酢酸エチル画分は、変異原性および免疫毒性を示す物質を含有することが示唆された。
- 5) 琵琶湖－淀川水系の湖水と河川水が示すエストロゲン様活性、免疫毒性および変異原性の挙動に関連性がないことから、このように異なった毒性が評価できる *in vitro* バイオアッセイを組み合わせることによって既存の化学物質を定量する分析化学的な安全性評価とは異なる切り口から環境水の包括的な毒性評価が可能であった。

- 6) 琵琶湖－淀川水系河川水中変異原物質の起源ならびに運命に関する検討から、都市の水域環境中の変異原物質の起源および運命について明らかにした。

5. 謝辞

2019年3月2日(土)に京都大学楽友会館で京都化学者クラブの公開セミナーにおいて「環境水の *in vitro* Bioassay による包括的安全性評価」の講演ならびにその内容を執筆する機会を頂いた京都大学水圏環境解析化学研究領域の宗林由樹教授に深謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 環境庁 (1999) 環境白書 (総説) 平成 11 年版 (環境省編), p. 212-215, 大蔵省印刷局, 東京.
- 2) 環境庁環境保健部環境安全課 (1999) 平成 11 年版化学物質と環境 (環境庁環境保健部環境安全課編), p. 9, 東京.
- 3) 澤田純一 (1995) 化学物質の免疫毒性, 国立衛生試験所報告, **113**, 1-18.
- 4) Salvaggio, J.E. (1996) Understanding clinical immunological testing in alleged chemically induced environmental illnesses, *Regl. Toxicol. Pharmacol.*, **24**, S16-S27.
- 5) Albert, E., Munson, J., McCay, A.A. and Cao, W. (1991) Approaches to immune-toxicologic studies with emphasis on chemical-induced immunomodulation, *Ann. Allergy*, **66**, 505-518.
- 6) Gleichmann, E., Kimber, I. and Purchase, I.F.H. (1989) Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system, *Arch. Toxicol.*, **63**, 257-273.
- 7) Stack, A.S., Altman-Hamamdzic, S., Morris, P.J., London, S.D. and London, L. (1999) Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) inhibit LPS-induced murine splenocyte proliferation *in vitro*, *Toxicology*, **139**, 137-154.
- 8) Prell, R.A., Oughton, J.A. and Kerkvliet, N.I. (1995) Effect of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin on anti-CD3-induced changes in T-cell subsets and cytokine production, *Int. J. Immunopharmacol.*, **17**(11), 951-961.
- 9) Sakazaki, H., Ueno, H. and Nakamuro, K. (2002) Estrogen receptor α in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicol. Lett.*, **133**, 221-229 (2002).
- 10) 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.
- 11) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173-215.
- 12) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83.
- 13) Nishida, M., Kasahara, K., Oki, A., Satoh, T., Arai, Y. and Kubo, T. (1996) Establishment of eighteen clones of Ishikawa cells, *Human Cell*, **9**, 109-116.
- 14) 川合真一郎 (2000) 水産環境における内分泌攪乱化学物質 (川合真一郎, 小山次郎 編), 恒星社厚生閣, p. 19-30, 東京.
- 15) 今井勝行, 川口進, 原田孝之 (1983) 細胞免疫実験操作法, 理工学社, p. 141-149, 東京.
- 16) 右田俊介, 紺田進, 本庶佑, 濱岡利之 (1995) 免疫実験操作法 II, 南江堂, p. 945-949, 東京.
- 17) Sakazaki, H., Ueno, H., Umetani, H. and Nakamuro, K. (2001) Immunotoxicological

evaluation of environmental chemicals
utilizing mouse lymphocyte mitogenesis
test, *J. Health Sci.*, **47**, 258-271.

18) 大阪市水道局水質試験所 (2000) 調査研究な

らびに試験成績 (第 52 集), p. 84, 大阪市
水道局工務部水質試験所, 大阪.

19) 中室克彦 (1999) 水環境中変異原物質の運命,
環境変異原研究, **21**, 159-164.