慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	タマネギ根端細胞での小核誘発を指標とした河川水の変異原性
Sub Title	Mutagenicity of river water detected by the induction of micronuclei in root cells of Allium cepa.
Author	金谷, 信宏(Kanaya, Nobuhiro)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2014
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of natural science). No.56 (2014. 9) ,p.1- 11
JaLC DOI	
Abstract	Water samples from 3 rivers, the Yodo River in Osaka, the Sumida River in Tokyo and the Tsurumi River in Yokohama, were examined for the mutagenicity by observing micronuclei (MN) in root cells of Allium cepa. Water samples from the Yodo River were collected from two sites, Nagara Bridge and Hirakata Bridge. The treatments of cells with the water samples from Nagara Bridge for 48 h gave rise to significant increases in number of cells with MN in 3 out of 9 experiments. However, the water samples from Hirakata Bridge did not induce MN. The water samples from the Sumida River (Komagata Bridge) showed positive results in 2 out of 9 experiments. The treatments of cells with the water samples from the Tsurumi River (Otsuna Bridge) did not cause significant increases in number of cells with MN. These results seemed to show that waters from the Yodo and the Sumida River were sometimes polluted with mutagenic materials.
Notes	原著論文
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20140930-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 56, 1–11（2014）

タマネギ根端細胞での小核誘発を指標とした河川水の変異原性

金谷信宏

Mutagenicity of River Water Detected by the Induction of Micronuclei in Root Cells of *Allium cepa*.

Nobuhiro Kanaya

Summary——Water samples from 3 rivers, the Yodo River in Osaka, the Sumida River in Tokyo and the Tsurumi River in Yokohama, were examined for the mutagenicity by observing micronuclei (MN) in root cells of *Allium cepa*. Water samples from the Yodo River were collected from two sites, Nagara Bridge and Hirakata Bridge. The treatments of cells with the water samples from Nagara Bridge for 48 h gave rise to significant increases in number of cells with MN in 3 out of 9 experiments. However, the water samples from Hirakata Bridge did not induce MN. The water samples from the Sumida River (Komagata Bridge) showed positive results in 2 out of 9 experiments. The treatments of cells with the water samples from the Tsurumi River (Otsuna Bridge) did not cause significant increases in number of cells with MN. These results seemed to show that waters from the Yodo and the Sumida River were sometimes polluted with mutagenic materials.

Key words: river water, pollution, mutagenicity, micronucleus, *Allium cepa*

1. 序論

近年，工業の発達，交通量の増加，人口の増加などにより環境汚染が進んでいる。特に河川水の汚染は，それが飲料水や農業等に利用されることからも重要な問題である。

河川水中の化学物質をブルーコットンやブルーレーヨンに付着させ，抽出，分離してからエームス試験（Ames *et al.*, 1975）による，サルモネラ菌での突然変異誘発を調べた結果，岡山県の旭川，京都府と大阪府の淀川水系の河川水中には，遺伝子に傷をつけて突然変異を誘発す

慶應義塾大学生物学教室（〒 223–8521 神奈川県横浜市港北区日吉 4–1–1）：Department of Biology, Keio University, Hiyoshi 4–1–1, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223–8521, Japan. [Received March 31, 2014]

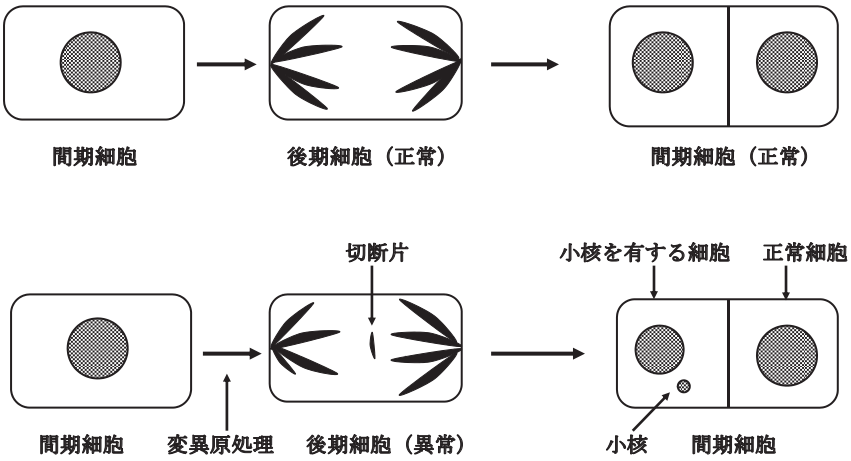


図 1．変異原による小核誘発

る変異原が含まれていることがわかった（Hayatsu *et al.*, 1983 ; Sakamoto and Hayatsu, 1990）。また，東京都の隅田川と荒川の水にも変異原が含まれていることが報告されている（Kusamran *et al.*, 1994）。Goto *et al.*（2000）は，日本国内 5 地域の河川計 90 地点で試料を採取して変異原性を調べた。その結果，特に淀川水系の西高瀬川（京都府）と愛知県の日光川の水の変異原性が高く，隅田川，鶴見川などの水にもそれらよりは低いが，変異原性が認められた。変異原は発がん因子なので，変異原に汚染されているかどうかを調べることは，発がん予防のためにも重要である。

変異原を検出する変異原性試験には，エームス試験のほかに，染色体損傷性を指標とする染色体異常試験と，その異常に起因する小核を調べる小核試験（Schmid, 1976）も含まれる。変異原に細胞がさらされると，核内の DNA に傷がつけられるが，その傷の修復がうまくいかないと，体細胞分裂中期や後期で染色体異常として観察され，その時の切断片は間期に小核として観察される（図 1）。小核の観察は染色体異常の観察よりやさしいので，動物細胞や植物細胞を使った小核試験が行われている。Hayashi *et al.*（1998）は，奈良県の富雄川で採取したフナやオイカワの，鰓細胞と赤血球細胞で小核頻度を調べたが，その川の中流で採取した魚の小核頻度は上流で採取した魚の小核頻度より高い傾向にあることを見いだした。また，ムラサキツユクサやソラマメを使って河川水による小核誘発が報告されている（Duan *et al.*, 1999 ; Ji *et al.*, 1999 ; Jiang *et al.*, 1999 ; Miao *et al.*, 1999 ; Steinkellner *et al.*, 1999 ; Zeng *et al.*, 1999）。本研究では，エームス試験で変異原性が確かめられた，淀川，隅田川および鶴見川の水を採取し，それらの河川水によりタマネギ根端細胞に小核が誘発されるかどうかを調べた。

2. 材料と方法

2012 年 4 月 6 日から 2014 年 2 月 5 日まで，大阪府の淀川（長柄橋とその上流の枚方大橋），東京都の隅田川（駒形橋），神奈川県の鶴見川（大綱橋）で，5 ～ 9 回採水して実験に使用した（表 1，図 2）。

タマネギ（*Allium cepa* cv. Baby Onion；サカタのタネ）の種子を 5 時間流水で洗浄後，水道水に浸した脱脂綿上に播き，20℃で発芽させた。4 日目，根の長さが 4 ～ 12 mm の芽生えを，河川水を浸した脱脂綿に移し，20℃で 48 時間処理した。根端をエタノールと酢酸の混合液（3：1）で固定し，フォイルゲン染色後押しつぶし標本をつくった。それぞれの処理に芽

表 1. 採水地点と採水日

都府県名	河川名（採水地点）	採水日								
大阪府	淀川（長柄橋）	2012.4.15	2012.8.2	2012.11.13	2013.2.10	2013.5.11	2013.7.13	2013.9.2	2013.11.25	2014.2.5
	淀川（枚方大橋）	—	—	—	—	2013.5.11	2013.7.13	2013.9.2	2013.11.25	2014.2.5
東京都	隅田川（駒形橋）	2012.4.6	2012.8.2	2012.11.13	2013.2.10	2013.5.11	2013.7.13	2013.9.2	2013.11.25	2014.2.5
神奈川県	鶴見川（大綱橋）	2012.4.6	2012.8.2	2012.11.13	2013.2.10	2013.5.11	2013.7.13	2013.9.2	2013.11.25	2014.2.5

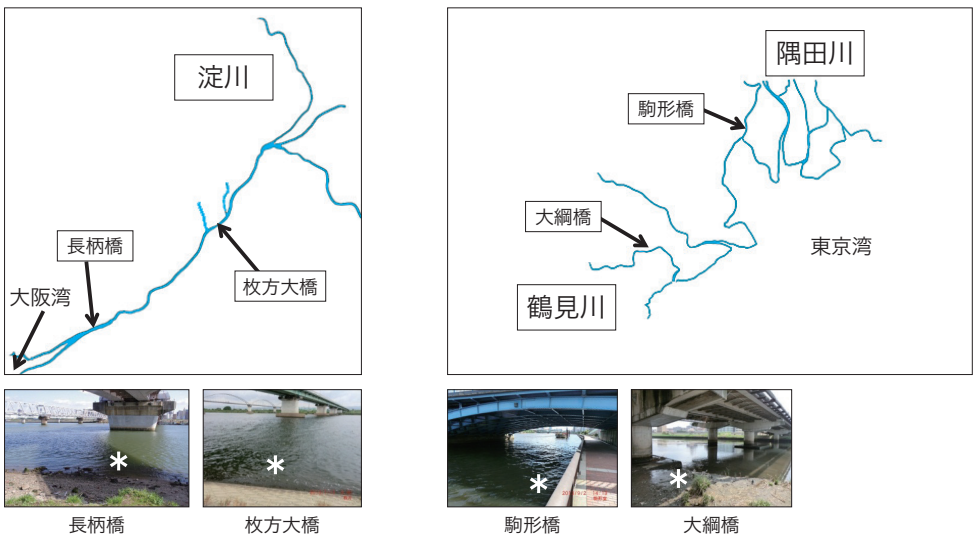


図 2. 採水地点（＊）

生えを 7 ～ 10 本使い，芽生えあたり 1000 個の間期細胞を光学顕微鏡（10 × 100 倍）で観察して，小核を有する細胞の頻度（小核頻度）と分裂指数を調べた。陰性対照は蒸留水で，陽性対照は植物細胞に染色体異常を起こすと報告されている（Swietlinska and Zuk, 1978），マレイン酸ヒドラジド（MH, Aldrich, CAS 123–33–1）で，それぞれ 48 時間処理した。小核誘発の有意差検定はスチューデントの t 検定で行った。処理開始時の芽生えの長さと，固定時の芽生えの長さを測り，その比を伸長率として伸長阻害の指標とした。

3. 結果

最初に，陽性対照である MH 処理による小核頻度を調べた。10 ～ 40μM の MH で 24 時間または 48 時間連続処理した結果が図 3 に示されている。48 時間処理の場合，陰性対照の小核頻度の平均値±標準偏差が 0.22 ± 0.16 % なのに対し，MH 処理により 1.08 ± 0.36 %（10μM）～ 3.98 ± 2.71%（40μM）と，濃度に依存して有意に増加した。24 時間処理の場合は陰性対照の値が，0.35 ± 0.16 % で，MH 処理の結果は 40μM でのみ，1.30 ± 0.34% と有意な増加を示した。タマネギの場合，MH による DNA 損傷が小核として観察されるのは 24 時間では不十分であることがわかったので，河川水の処理時間は 48 時間とした。

図 4 a に示すように，淀川の下流の長柄橋で採取した水で処理した結果，9 回の実験中 3 回（2012 年 8 月，2013 年 2 月，5 月）の小核頻度は 0.67 ± 0.38 ～ 0.96 ± 0.63 % で，それぞれの陰性対照の頻度（0.22 ± 0.16 ～ 0.25 ± 0.32 %）より有意に高い値を示した。3 回のうちの 2 回（2012 年 8 月，2013 年 5 月）では，芽生えの伸長と細胞分裂が阻害された（図 4 b）。すなわち，8 月の陰性対照の伸長率（固定時の長さ／処理開始時の長さ）は 3.45 で分裂指数は 13.9 だったが，長柄橋から採取した水処理の伸長率は 1.73 で陰性対照の半分の 0.50 であり，分裂指数は 4.9 で陰性対照の 0.35 であった。同様に 5 月の伸長率と分裂指数の結果は，それぞれ陰性対照の 0.42 と 0.54 であった。2013 年 2 月の結果は，伸長率は陰性対照とほぼ同じ 0.98 で，分裂指数は陰性対照の 1.26 とむしろ高かった。2013 年 11 月の小核頻度と分裂指数は陰性対照とほぼ同じだったが，伸長率は陰性対照の 0.59 と芽生えの伸長のみ阻害された（図 4 a，b）。長柄橋より上流に位置する枚方大橋での採取は 5 回行ったが，長柄橋で陽性結果が得られた 2013 年 5 月の小核頻度は 0.23 ± 0.17%で，陰性対照の頻度（0.25 ± 0.32%）と同じくらいの値であり，芽生えの伸長率と分裂指数も陰性対照とほぼ同じだった（図 5 a，b）。他の 4 回の小核頻度も 0.23 ± 0.23 ～ 0.55 ± 0.51 % で有意な増加を示さず，芽生えの伸長と分裂指数は陰性対照と同じくらいだった（図 5 a，b）。

隅田川（駒形橋）で採取した水処理による小核頻度は，9 回の実験中 2 回（2013 年 9 月，2014 年 2 月）有意に増加した。それぞれの陰性対照の値が 0.23 ± 0.19 % と 0.26 ± 0.13 %だったのに対し，河川水処理により小核頻度はそれぞれ 0.82 ± 0.31 %，0.73 ± 0.50 % と有意に増加した（図 6 a）。また，それぞれの伸長率は陰性対照の 0.39 と 0.54 で，伸長阻害も見られた（図 6 b）。9 月の分裂指数は陰性対照の 0.59 であり，分裂阻害が見られたが，2 月は陰性対

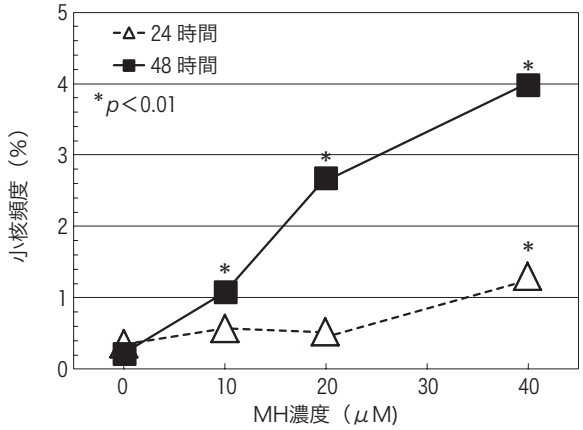


図 3. マレイン酸ヒドラジド（MH）による小核誘発

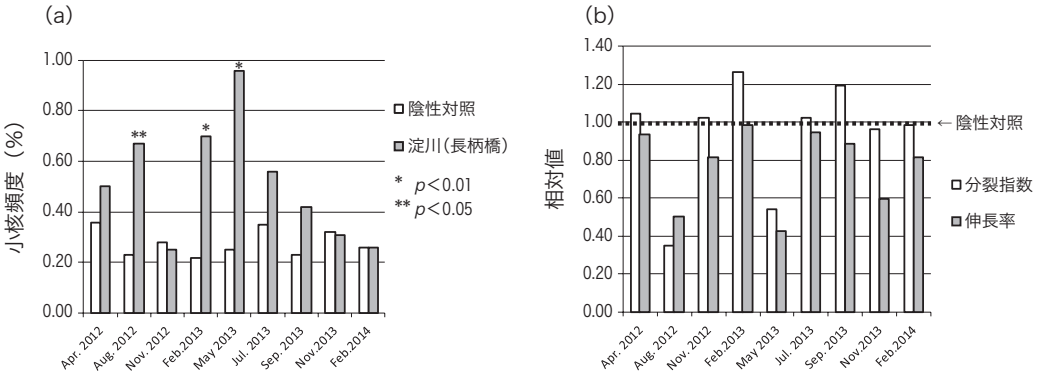


図 4. 淀川（長柄橋）から採取した水の結果
(a)小核頻度。(b)分裂指数と芽生えの伸長率への影響。陰性対照の値を 1.00 とした相対値。

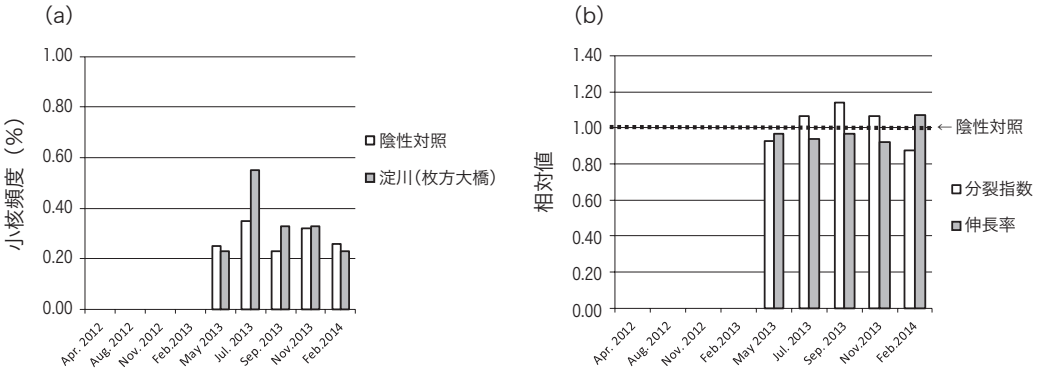


図 5. 淀川（枚方大橋）から採取した水の結果
(a)小核頻度。(b)分裂指数と芽生えの伸長率への影響。陰性対照の値を 1.00 とした相対値。

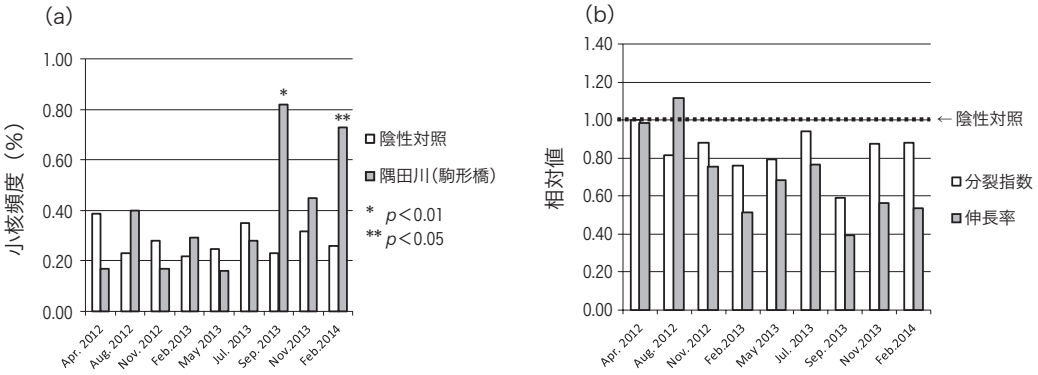


図 6. 隅田川（駒形橋）から採取した水の結果
(a)小核頻度。(b)分裂指数と芽生えの伸長率への影響。陰性対照の値を 1.00 とした相対値。

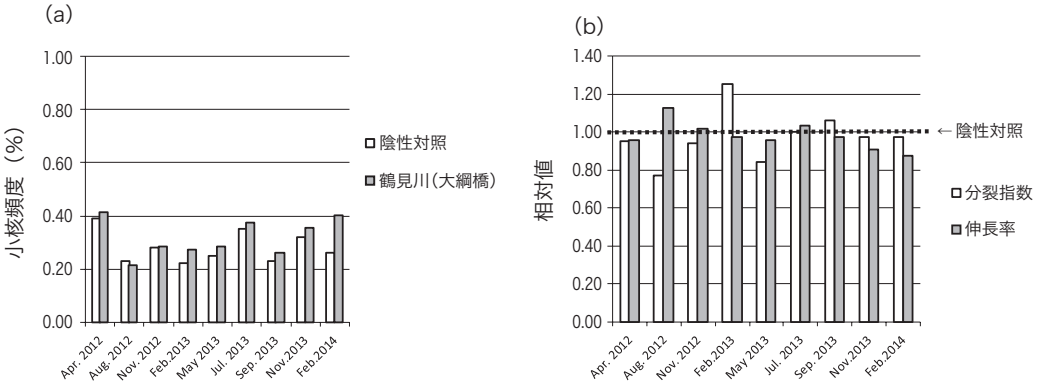


図 7. 鶴見川（大綱橋）から採取した水の結果
(a)小核頻度。(b)分裂指数と芽生えの伸長率への影響。陰性対照の値を 1.00 とした相対値。

照の 0.88 で分裂への影響はほとんどなかった。2013 年 2 月と 11 月の結果のように，伸長阻害（それぞれ陰性対照の 0.51 と 0.56）が見られても小核頻度が有意に増加しなかったケースもあった（図 6 a，b）。

鶴見川（大綱橋）から採取した水処理による小核頻度は 0.21 ± 0.17 〜 0.41 ± 0.15 % で，9 回とも陰性対照レベルで，顕著な分裂阻害，伸長阻害も見られなかった（図 7 a，b）。

4. 考察

淀川の長柄橋で採取した水処理により，9 回の実験のうち 3 回の実験で小核誘発が見られたことから，長柄橋の付近でときおり，タマネギ根端細胞に小核を誘発するのに，十分な量の変異原の混入があることが考えられた。

淀川水系の水の変異原性はよく調べられているが，特に淀川の支流の西高瀬川の水による突

然変異頻度は非常に高い（Goto *et al.*, 2000）。その原因物質のひとつが芳香族アミンである，2–フェニルベンゾトリアゾール（PBTA）類の PBTA–1 であり（Nukaya *et al.*, 1997），染料工場でアゾ染料が還元され，さらに下水処理場で次亜塩素酸処理などの過程を経て生成されたと考えられている（Shiozawa *et al.*, 1998）。その類似体である PBTA–2（Oguri *et al.*, 1998；Nukaya *et al.*, 1999），PBTA–3（Shiozawa *et al.*, 2000），PBTA–4（Nukaya *et al.*, 2001），PBTA–6（Watanabe *et al.*, 2001）も西高瀬川の水から分離された。本研究で，長柄橋の上流の枚方大橋からの水は小核を誘発しなかったことから，両橋の間で小核誘発物質が混入したと思われる。PBTA 類は淀川の上流で京都府内の西高瀬川に多く含まれるので，それが小核誘発物質なら，上流の枚方大橋で採取した水でも小核が誘発されると考えられる。しかし，実際には下流の長柄橋からの水でのみ誘発されたので，PBTA 類は本研究での，淀川における小核誘発物質とはいえないと思われる。

淀川水系の水には変異原性を示す，Trp–P–1 などのヘテロサイクリックアミンが含まれていることが報告されている（Ohe, 1997）。下水やし尿処理場放流水に多く含まれていることから，ヒトの生活に伴って排出される家庭雑排水にヘテロサイクリックアミンが含まれていることが考えられている（Nakamuro, 1999）。また，淀川水系の桂川の水に多環芳香族炭化水素（PAH）が含まれており，変異原性が確認された（Sayato *et al.*, 1993）。PAH は自動車排気ガス由来なので，交通量の多い道路に近い川には多く含まれると思われる。長柄橋は交通量の多い新大阪駅に近いところにあり，人口も密集している地域にあることから，排気ガスに含まれる PAH や，家庭雑排水中のヘテロサイクリックアミンがより多く川に混入することにより，ときおり小核誘発が観察されるのではないかと考えられた。

隅田川の駒形橋から採取した水は 9 回中 2 回小核を誘発したので，隅田川もときどき小核誘発物質に汚染されていることがわかった。今回採水した駒形橋の隣にある吾妻橋で採取した水に，変異原性があることが Kusamran *et al.*（1994）により報告されており，Goto *et al.*（2000）も淀川の水の 1 / 2 の頻度だが隅田川の水により突然変異が誘発されたと報告している。駒形橋は交通量の多い道路に近いので，排気ガスからの PAH が小核誘発に関与しているのかもしれない。

このように，淀川の下流の長柄橋と隅田川の駒形橋で採取した水は，常にではないがタマネギ根端細胞に小核を誘発した。また，芽生えの伸長阻害と分裂阻害も引き起こしたが，小核誘発と伸長阻害や分裂阻害とは必ずしも関連しなかったことから，変異原性はないが伸長阻害や分裂阻害を引き起こす化学物質によっても，ときどき河川が汚染されていると思われた。

鶴見川の水に変異原性があることは Goto *et al.*（2000）により報告されているが，本研究で，大綱橋で採取された水は小核を誘発しなかったことから，少なくとも調べた期間中，大綱橋付近の水には小核誘発物質が含まれていないか，含まれていたとしても小核を誘発するほどの濃度ではなかったことが考えられた。鶴見川の水により分裂阻害も伸長阻害も見られなかったことから，鶴見川は今回調べた中では最も汚染されていない川であると思われた。

植物を使った変異原性試験は，細菌や動物を使った変異原性試験と同じような結果を示し，

簡単な装置や設備で行うことができる。また，コストが低く扱いやすいことから，環境汚染による遺伝的損傷を見つけるための，最初の段階に使えるだろうと提案された（Grant, 1994）。そこで，染色体損傷性を指標とする試験として，ソラマメを使った染色体異常試験（Kanaya *et al.*, 1994）と，ムラサキツユクサを使った小核試験が試みられた（Ma *et al.*, 1994）。これらの試験の有効性が確かめられ，“International Program on Plant Bioassays（IPPB）”により，植物を使って 14 カ国で河川，湖，大気，土壌汚染の分析が行われた（Ma, 1999；Grant, 1999）。その結果，中国（Duan *et al.*, 1999；Ji *et al.*, 1999；Jiang *et al.*, 1999；Miao *et al.*, 1999；Zeng *et al.*, 1999）やオーストリア（Steinkellner *et al.*, 1999）の河川水による植物細胞での小核誘発が報告された。著者は大学生を対象とした生物学実験で小核試験を取り入れているが，小核の観察が容易であることから，初めて小核を観察したにもかかわらず，かなり正確に小核頻度が調べられていた（金谷，2001）。このことからも，河川水の変異原性のモニタリングを広範囲に行うのに，この植物を使った小核試験は有効であると思われる。

5. 謝辞

本研究は慶応義塾学事振興資金により行われた。

6. 引用文献

1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting cacinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347–364.

2) Duan, C.-Q., B. Hu, Z.-H. Wang, C.-H. Wen, S.-Q. Yan, X.-H. Jiang, D.-K. Wang, Q. Li and X.-F. Liang (1999) *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutation Res.*, **426**, 127–131.

3) Goto, S., O. Endo, Y. Matsumoto, S. Sakai, T. Akutagawa, M. Asanoma, T. Hirayama, T. Watanabe, N. Sera, H. Tsukatani, A. Tada and K. Wakabayashi (2000) Mutagenicity of airborne particle, river water and soil in Japan. *Environ. Mutagen Res.*, **22**, 45–54.

4) Grant, W.F. (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Res.*, **310**, 175–185.

5) Grant, W.F. (1999) Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations — a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Res.*, **426**, 107–112.

6) Hayashi, M., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A.

Takai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni and Y. Ojima (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Res.*, **399**, 125–133.

7) Hayatsu, H., T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi and S. Arimoto (1983) Adsoption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine. *Mutation Res.*, **119**, 233–238.

8) Ji, Q., H. Yang and X. Zhang (1999) *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutation Res.*, **426**, 133–135.

9) Jiang, Y.G., Z.D. Yu, G.Z. Liu, R.Z. Chen and G.Y Peng (1999) Genotoxicity of water samples from the scenic Lijang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutation Res.*, **426**, 137–141.

10) 金谷信宏（2001）生物学実習テーマとしての化学物質の変異原性試験。慶應義塾大学日吉紀要・自然科学 No. 29, 41–54.

11) Kanaya, N., B.S. Gill, I.S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S.S. Sandhu and H.C. Andersson (1994) *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Res.*, **310**, 231–247.

12) Kusamran, W.R., K. Wakabayashi, A. Oguri, A. Tepsuwan, M. Nagao and T. Sugimura (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutation Res.*, **325**, 99–104.

13) Ma, T.-H. (1999) The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Res.*, **426**, 103–106.

14) Ma, T.-H., G.L. Cabrera, R. Chen, B.S. Gill, S.S. Sandhu, A.L. Vandenberg and M.F. Salamone (1994) Tradescantia micronucleus bioassay. *Mutation Res.*, **310**, 221–230.

15) Miao, M., R. Fu, D. Yang and L. Zheng (1999) *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutation Res.*, **426**, 143–145.

16) Nakamuro, K. (1999) Fate of mutagens in a water environment. *Environ. Mutagen Res.*, **21**, 159–164.

17) Nukaya, H., J. Yamashita, K. Tsuji, Y. Terao, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, K. Kiyokawa, M. Tezuka, A. Oguri, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1997) Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1061–1066.

18) Nukaya, H., T. Ohe, Y. Terao, H. Sawanishi and K. Wakabayashi (1999) Search for mutagens in river water. *Environ. Mutagen Res.*, **21**, 153–157.

19) Nukaya, H., T. Shiozawa, A. Tada, Y. Terao, T. Ohe, T. Watanabe, M. Asanoma, H. Sawanishi, T. Katsuhara, T. Sugimura and K. Wakabayashi (2001) Identification of

2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2*H*-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutation Res.*, **492**, 73-80.

20) Oguri, A., T. Shiozawa, Y. Terao, H. Nukaya, J. Yamashita, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Identification of a 2-phenylbenzotriazole (PBTA)-type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1195-1200.

21) Ohe, T. (1997) Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutation Res.*, **393**, 73-79.

22) Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo River system, Kyoto-Osaka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 521-528.

23) Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1993) Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water. *Mutation Res.*, **300**, 207-213.

24) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. in "Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection", Vol. 4, pp. 31-53, ed. A. Hollaender, Plenum Press.

25) Shiozawa, T., K. Muraoka, H. Nukaya, T. Ohe, H. Sawanishi, A. Oguri, K. Wakabayashi, T. Sugimura and Y. Terao (1998) Chemical synthesis of a novel aromatic amine mutagen isolated from water of the Nishitakase River in Kyoto and a possible route of its formation. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 375-380.

26) Shiozawa, T., A. Tada, H. Nukaya, T. Watanabe, Y. Takahashi, M. Asanoma, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, T. Sugimura, K. Wakabayashi and Y. Terao (2000) Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole-type mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 535-540.

27) Steinkellner, H., F. Kassie and S. Knasmüller (1999) *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutation Res.*, **426**, 113-116.

28) Swietlinska, Z. and J. Zuk (1978) Cytotoxic effects of maleic hydrazide. *Mutation Res.*, **55**, 15-30.

29) Watanabe, T., H. Nukaya, Y. Terao, Y. Takahashi, A. Tada, T. Takamura, H. Sawanishi, T. Ohe, T. Hirayama, T. Sugimura and K. Wakabayashi (2001) Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. *Mutation Res.*, **498**, 107-115.

30) Zeng, D., Y. Li and Q. Lin (1999) Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China. *Mutation Res.*, **426**, 159–161.