

(29) 界面活性剤の遺伝毒性および遺伝毒性物質に与える影響

Mutagenicity of Commercial and Pure Surfactants
and Their Effects on Mutagens in Water Environment.

守田康彦*, 高橋敬雄**, 遠藤哲広***

Yasuhiko MORITA*, Yukio TAKAHASHI**, Tetsuhiro ENDOU***

ABSTRACT; First, the level of mutagenicity of 5 commercial and 6 pure surfactants was determined using Ames' assay. Next, in order to elucidate the effects of surfactants discharged in water environment on the level of mutagenicity in it, each of the surfactants was added to Ames' assay of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) or benzo(a)pyrene (BaP) and the change in the level of mutagenicity was investigated. No mutagenic activity was found for any surfactant in the presence or absence of rat liver homogenates (S9-Mix). In contrast, the level of 4NQO mutagenicity in the absence of S9-Mix and the level of BaP mutagenicity in the presence of S9-Mix were increased in the presence of the surfactants. Marked increases in the level of 4NQO mutagenicity were observed in the presence of the surfactants in the order of α -sulfo-fatty acid methyl ester (α -SFE) > polyoxyethylene-n-lauryl ether (AE) > amidic fatty acid (DA) > sodium dodecylsulfate (SDS) > alkyl sulfate (AS). These increases occurred when *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium* TA-100) was treated simultaneously with 4NQO and AS or α -SFE, when *S. typhimurium* TA-100 was treated with SDS followed by addition of 4NQO and when *S. typhimurium* TA-100 was treated with 4NQO followed by addition of AE or DA. Marked increases in the level of the BaP mutagenicity were observed only when *S. typhimurium* TA-100 was treated with surfactants, followed by addition of BaP, in the order of linoleic acid sodium salt > AS > sodium oleate > commercial soap > SDS > DA > sodium myristate > sodium laurate > sodium palmitate. The net number of revertants was positively correlated with the hydrophile-lipophile balance (HLB) and critical micelle concentration (CMC).

KEYWORDS; surfactant, mutagenicity, Ames' assay

1. はじめに

界面活性剤は家庭で最も多量に使用される化学物質の一つである。例えば家庭製品用界面活性剤のみを見ても、その年間生産量は約40万ト(1991年)である¹⁾。使用された後の界面活性剤の大部分は生活排水に含まれて排出される。しかし1992年における公共下水道、農業・漁業集落排水施設、ミニティプラント、及び合併処理浄化槽の普及率は、計約47%であり²⁾、それ以外の53%(約6700万人分)は処理を受けずに環境水中に放出されていると考えられている。したがって下水道等の施設の整備が遅れている地域では、多量の界面活性剤が生活排水と共に未処理のまま環境水中に放出されていることになる。

界面活性剤は、上述のように、それが日常生活において大量に使用され排出される化学物質の一つであるが

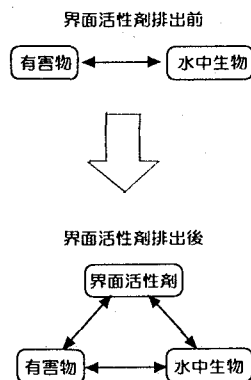


Fig.1 Schema of Surfactants effects on Water Environment³⁾

* 新潟大学自然科学研究科(Graduate School of Science and Technology, Niigata University)

** 新潟大学工学部(Faculty of Engineering, Niigata University)

*** 日本生活協同組合連合会(Japanese Consumer's Cooperative Union)

めに、わが国においても 1962 年にその生体への影響が社会的な関心を集めて以来、多くの研究がなされている³⁾。しかし市場に流通している界面活性剤は、例えば α -スルホ脂肪酸エステルナトリウム(α -SFE)のような新素材の開発によって刻々と変化しており¹⁾、また試験方法もより迅速かつ高感度な手法が開発されているので、新しい視点、手法によって新しい界面活性剤を評価する必要性が常に存在すると考えられる⁴⁾⁵⁾。

筆者らは既報⁴⁾⁵⁾において、現在多く使用されている衣料用洗剤について、基礎的環境負荷量・生分解性・マイクロプラスチック毒性・変異原性などについて検討した。この中で、環境水中の有害物質の生物への作用が洗剤の共存によって増加するか否か、すなわち補助変異原性について検討した。すなわち界面活性剤は親水性と親油性の2つの性質を持つことから、環境水中の生物と有害物の双方に作用し(Fig.1)、従前に見られた水中生物と有害物との関係に変化を与えることが考えられたので⁴⁾⁵⁾、水中生物を *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium* TA-100)に、環境水中の有害物質を変異原物質である 4-ニトロリゾ-1-ベンゾ(4NQO)およびバプア(a)ピリ(BaP)に置き換え、洗剤を加えて Ames 変異原性試験を行い、変異原強度の増減を調べた。その結果、変異原性はいずれの供試洗剤についても見られなかったが、アルキル硫酸エステルナトリウム(AS)、 α -SFE、POEアルキルエーテル(AE)および直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)を主成分とする洗剤において 4NQO に対する補助変異原性が、そして石鹸を主成分とする洗剤において BaP に対する補助変異原性がそれぞれ見いだされた。

周知のように市販洗剤は数種類の化学物質の混合物である。そこで本研究では、既報で得られた洗剤と変異原物質の生物に対する相互影響をより明確に知るために、家庭用衣料洗剤に用いられている界面活性剤5種(Table 1)と、純粋な界面活性剤6種(Table 2)を用いて、まず Ames 試験⁶⁾のバクテリウム-ソート法による変異原性を検討し、次に既報と同様に水中生物を *S.typhimurium* TA-100 に、有害物質を変異原物質である 4NQO および BaP に置き換え、Ames 試験⁶⁾のバクテリウム-ソート法をもとにした補助変異原性を検討した。

2. 実験試料

試料は、市販洗剤の原材料として使用されている、分子構造の詳細が不明確な界面活性剤5種類(Table1)と、試薬として販売されている、分子構造が明確な界面活性剤6種類(Table2)の計 10 種類を使用した。試薬界面活性剤はリノール酸ナトリウムは東京化成製を使用し、それ以外は関東化学・鹿1級を使用した。

Table 1 List of commercial surfactants used in this study

名称(通称)	イオン系	分子式	特徴
アルキル硫酸エステルナトリウム(AS)	陰	R-CH ₂ OSO ₃ Na	高級アルコールが原料
アルファスルホ脂肪酸エステルナトリウム(α -SFE)	陰	R-CH ₂ -COOR' SO ₃ Na	市販洗剤からのイタール抽出物
石ケン(Soap)	陰	R-COONa	廃食用油が原料
POEアルキルエーテル(AE)	非	R-CH ₂ O(C ₂ H ₄ O) _n -H	高級アルコールが原料 平均 n:8
脂肪酸アミド (DA)	非	R-CON-(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	主に助剤として配合される

Table 2 List of pure surfactants used in this study

名称	イオン系	分子式	特徴
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	陰	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ OSO ₃ Na	AS の純粋物質
リノール酸ナトリウム	陰	C ₁₇ H ₃₁ COONa	不飽和脂肪酸塩
オレイン酸ナトリウム	陰	C ₁₇ H ₃₃ COONa	不飽和脂肪酸塩
ラウリン酸ナトリウム	陰	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COONa	飽和脂肪酸塩
ミリスチン酸ナトリウム	陰	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COONa	飽和脂肪酸塩
パルミチン酸ナトリウム	陰	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COONa	飽和脂肪酸塩

3. 実験方法

3-1. 変異原性試験

試験法は、Ames 試験を用いた。試験は *S. typhimurium* TA-100 を使用したプレート・テスト法により、代謝活性化酵素 S-9Mix を加える系(以下、+S9)と加えない系(以下、-S9)の両方を行った。S-9Mix はバクテリアル酵母製の S-9 と cofactor を用いて調整した⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

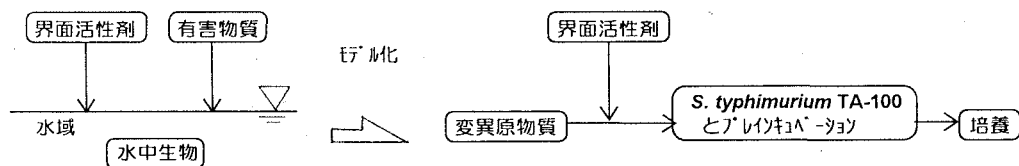
試料の界面活性剤はイカ交換水により 0.5g/L 又は 1g/L の濃度に調整し、孔径 0.45 μ m のナノメグレンフィルターを用いて滅菌した後に試験に供した。ブランクは、イカ交換水のみを用いた。試験毎に陽性対照試験を行い、-S9 では 4NQO を、+S9 では BaP をそれぞれ使用した。4NQO、BaP はいずれも和光純薬製特級を使用した。

3-2. 補助変異原性試験

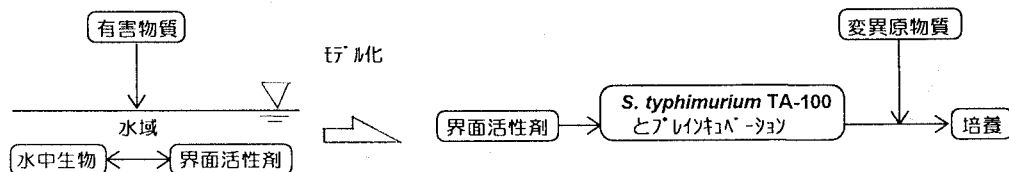
環境中の有害物質として-S9 については 4NQO、+S9 については BaP をそれぞれ想定し、水中の生物として *S. typhimurium* TA-100 を想定し、各変異原の強度が界面活性剤の共存によってどのように影響されるかを Ames 試験プレート・テスト法をもとにした補助変異原性試験により検討した⁴⁾⁵⁾⁶⁾。試料は変異原性試験の場合と同様、イカ交換水により 0.1g/L、0.5g/L 又は 1.0g/L の濃度に調整し、孔径 0.45 μ m のナノメグレンフィルターを用いて滅菌した。

ここで本研究においては、①補助変異原性試験の結果そのものが試験の操作手順によって変化するのではないか、そして②補助変異原性の発現の際に界面活性剤そして変異原物質はどのような役割を演ずるのか、の2点を知るために、界面活性剤及び変異原物質の添加方法について Case A：各変異原物質に試料を所定量添加した後にプレート・テストを行う場合、Case B：各試料のみでプレート・テストを行った後に変異原物質を添加する場合、Case C：各変異原物質のみでプレート・テストを行った後に試料を添加する場合、の3通りの場合を設定し、検討した。

- ・ Case A 界面活性剤と有害物質がほぼ同時に水中生物に作用することを想定した。



- ・ Case B 既に界面活性剤が存在する環境において、有害物質が水中生物に作用することを想定した。



- ・ Case C 既に有害物質が存在する環境において、界面活性剤が水中生物に作用することを想定した。

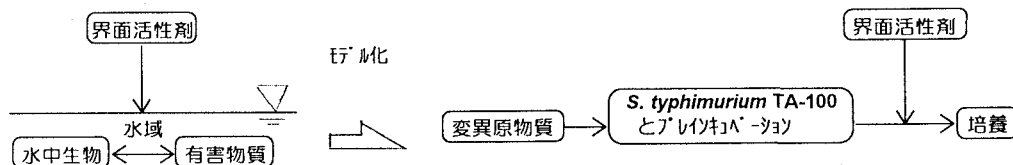


Fig.2 Schema of Surfactants effects on Harmful matters

ここで界面活性剤と有害物質及び水中生物との関係(Fig.1)において上述の3方法を捉え直すと、Case Aは界面活性剤と有害物質がほぼ同時に水中生物に作用する場合、Case Bは水中生物が既に界面活性剤によって何らかの影響を受けた後に有害物質が作用する場合、そしてCase Cは水中生物が既に有害物質によって何らかの影響を受けた後に界面活性剤が作用する場合の3通りの関係を想定していることになる。各Caseの概念図をFig.2に示した。ブランクは、10%交換水と各変異原物質を所定の方法で添加した場合の値を用いた。なお、既報⁴⁾⁵⁾ではCase Aを用いて試験したことになる。

4. 試験結果と考察

4-1. 変異原性試験

試験結果の代表例をFig.3からFig.6に示す。図において横軸はプレート当たりの界面活性剤投与量、縦軸はプレート当たりの *S. typhimurium* TA-100 の復帰変異コロニー数(バクタ数)を示している。試験の結果、リノール酸ナトリウムの-S9(Fig.6)と脂肪酸アミド(DA)の-S9(Fig.5)においてわずかなバクタ数の増加が見られたが、明確な変異原性は見られなかった。アルキル硫酸エステルナトリウム(AS)(Fig.3)とPOEアルキルエーテル(AE)(Fig.4)においては、試料の毒性によるものと思われるバクタ数の減少が見られ、いずれも-S9において顕著であった。

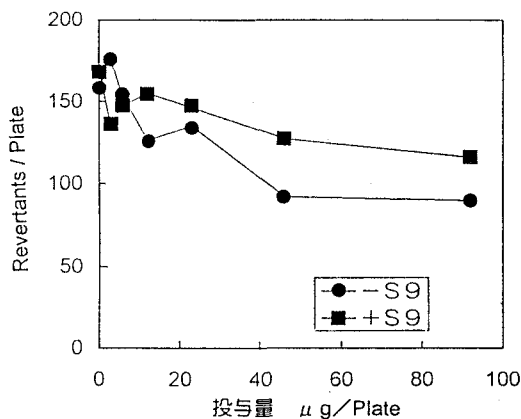


Fig.3 Mutagenicity of Alkyl Sulfate (AS)

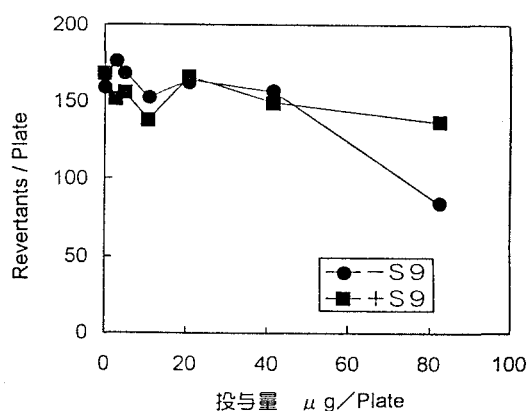


Fig.4 Mutagenicity of Polyoxyethylene-n-Lauryl Ether (AE)

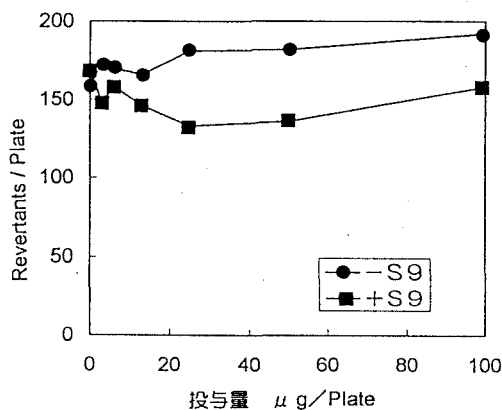


Fig.5 Mutagenicity of Amidic Fatty acid (DA)

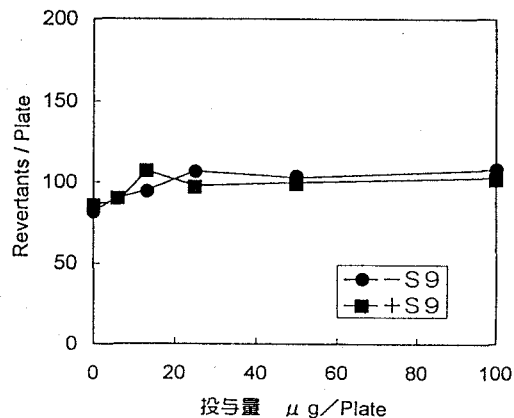


Fig.6 Mutagenicity of Linoleic acid Sodium salt

4-2. 補助変異原性試験

4-2-1.代謝活性酵素を加えない(-S9)場合

試験結果の代表例を Fig.7 から Fig.10 に示す。図において横軸はプレート当たりの界面活性剤投与量を示している。縦軸はバクテリウム数からブランク値を差し引いた、プレート当たりの純バクテリウム数を示している。ブランク値は、1%交換水と 4NQO を各 Case 毎の方法で添加した場合の結果を使用した。

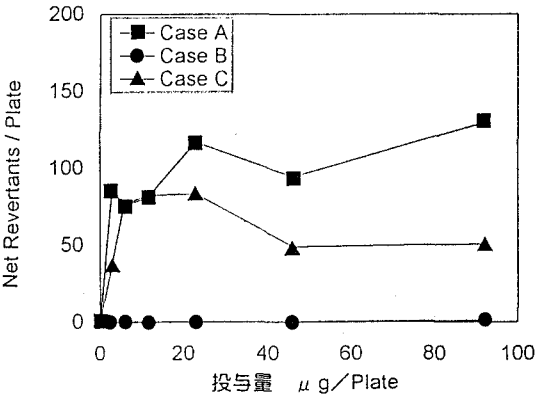


Fig.7 Effects of Alkyl Sulfate (AS) on 4NQO mutagenicity

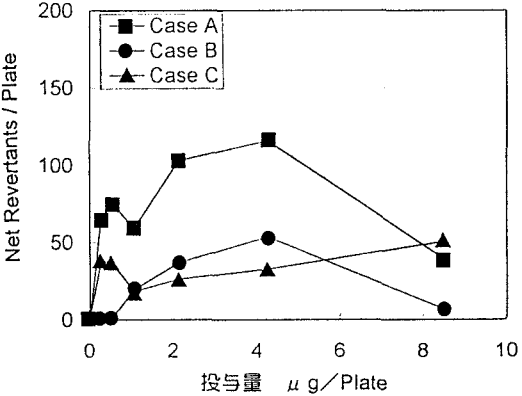


Fig.8 Effects of α-Sulfo-fatty acid methyl Ester (α-SFE) on 4NQO mutagenicity

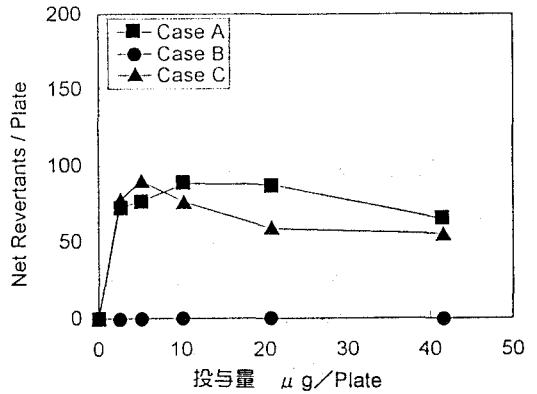


Fig.9 Effects of Polyoxyethylene-n-Lauryl Ether (AE) on 4NQO mutagenicity

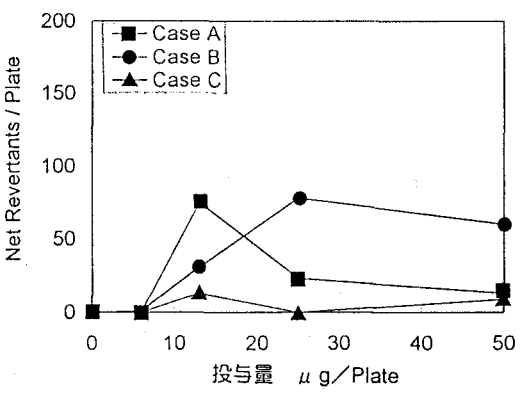


Fig.10 Effects of Sodium Dodecylsulfate (SDS) on 4NQO mutagenicity

Case A で AS (Fig.7) と α-SFE (Fig.8) において、Case B でドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (Fig.10) において、そして Case A および C で非イオン系界面活性剤である AE (Fig.9) と DA においてそれぞれ界面活性剤投与量の増加に従ったバクテリウム数の増加が顕著に見られた。それゆえ 4NQO に対する補助変異原性は、界面活性剤のイオン系によってその発現機構が異なることが示唆され、まず陰イオン系界面活性剤である α-SFE と AS は 4NQO とほぼ同時に菌体に作用し、4NQO の菌体内部への取り込みを増長したものと考えられ、同じく陰イオン系界面活性剤である SDS はあらかじめ菌体表面に何らかの影響を与えることによって 4NQO の取り込みを増長したものと考えられた。これに対し非イオン系界面活性剤である AE と DA は 4NQO と同時ないしは遅れて菌体内部に進入し、菌体内部において 4NQO の組織への取り込みを増長したものとそれぞれ考えられた。

実際の洗濯における洗剤使用量は、洗濯1回あたり約 30g であることから、それぞれの試料 1g 当たりの純バクテリア数(Net Revertants / g)を計算した結果を Table 3 に示した。その結果、おおよそ α -SFE>AE>DA>SDS>AS の順となった。家庭洗剤用の AS とアルキル炭素数 12 の純粋な AS である SDS は、補助変異原性の発現機構と 1g 当たりのバクテリア数が異なった。前者は家庭洗剤用の界面活性剤であるため、ある変動範囲内で様々な炭素数を持つアルキル基を含んでおり、また不純物の除去も試薬である SDS ほど厳重に行われていないと考えられた。従って、AS と SDS の結果の違いは、界面活性剤分子のアルキル鎖長の違い、あるいは除去しきれていない不純物の影響であると考えられた。

Table 3 Effects of Surfactants on 4NQO mutagenicity	
試料	Net Revertants / g
α -SFE	270×10^5
AE	88×10^5
DA	37×10^5
SDS	31×10^5
AS	14×10^5

4-2-2. 代謝活性酵素を加える(+S9)場合

試験結果の代表例を Fig.11 から Fig.14 に示す。図において横軸、縦軸は代謝活性酵素を加えない場合と同様であり、バック値は BaP とイソ交換水を各 Case 毎の方法で添加した場合の値を使用した。

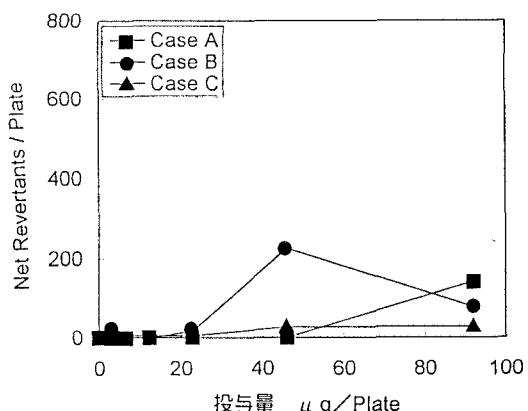


Fig.11 Effects of Alkyl Sulfate (AS) on BaP mutagenicity

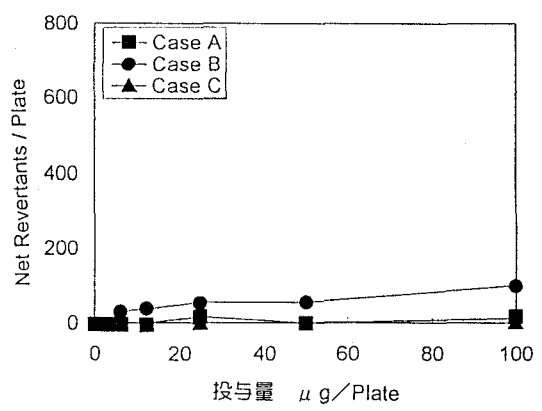


Fig.12 Effects of Amidic Fatty acid (DA) on BaP mutagenicity

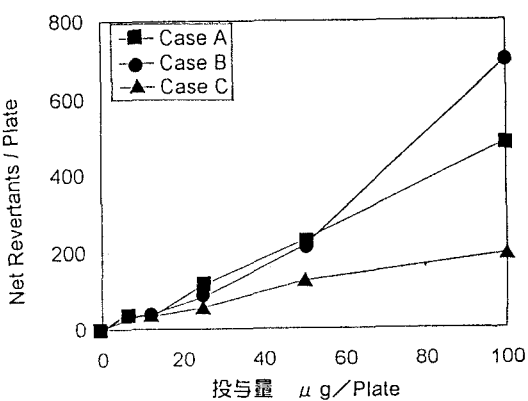


Fig.13 Effects of Linoleic acid Sodium salt on BaP mutagenicity

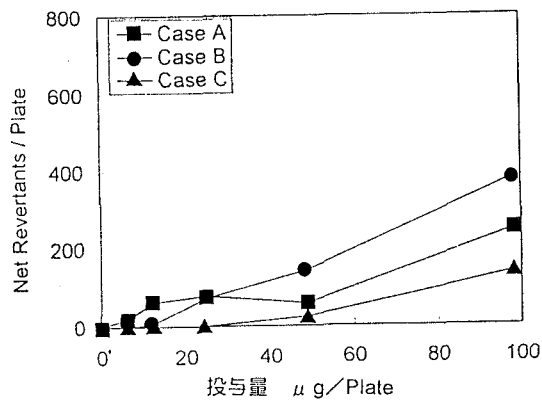


Fig.14 Effects of Sodium Olerate on BaP mutagenicity

BaP に対する補助変異原性は、イワ系にかかわらず、AS、DA、SDS、リノール酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウムそしてパルミチン酸ナトリウムの Case B において界面活性剤投与量の増加にともなうリバ-タツ数の増加が明瞭に見られた。これは、界面活性剤によって菌体表面が何等かの影響を受け、その結果 BaP をより取り込みやすくなったため生じたと考えられた。

4NQO の場合と同様に、各試料について Net Revertants / g を求めたところ (Table 4)、おおよそリノール酸ナトリウム > AS > オレイン酸ナトリウム > 石鹸 > SDS > DA > ミリスチン酸ナトリウム > ラウリン酸ナトリウム > パルミチン酸ナトリウムの順となった。家庭洗剤用の AS とオレイン酸炭素数 12 の純粋な AS である SDS の結果を比較すると、前者の補助変異原性が大きかったが、これは 4NQO に対する場合と同様、家庭洗剤用 AS の分子のオレイン基の炭素数が SDS とは異なるため、あるいは不十分な精製による不純物の存在によるためと考えられた。

脂肪酸ナトリウム塩について見て見ると、不飽和炭化水素基を持つリノール酸ナトリウムとオレイン酸ナトリウムは飽和炭化水素基を持つラウリン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウムより大きい補助変異原性を示し、特に親油基に 2 重結合を 2 つ有するリノール酸ナトリウムは 2 重結合を 1 つ有するオレイン酸ナトリウムよりも大きい結果を示した。従って、不飽和炭化水素中の 2 重結合が補助変異原性の大きさを左右する要素の一つであることが示唆された。また食用油が原料であり、不飽和脂肪酸ナトリウムを多く含むと思われる⁸⁾家庭洗剤用石鹸の補助変異原性も、飽和脂肪酸ナトリウム 2 物質より大きい補助変異原性を示した。これは AS の場合と同様に、残留する不純物の影響も考えられるが、石鹸に含まれる不飽和脂肪酸ナトリウムの影響であるとも考えられた。

Table 4 Effects of Surfactants on BaP mutagenicity

試料	Net Revertants / g
リノール酸ナトリウム	64×10 ⁵
AS	48×10 ⁵
オレイン酸ナトリウム	39×10 ⁵
石鹸	30×10 ⁵
SDS	29×10 ⁵
DA	20×10 ⁵
ミリスチン酸ナトリウム	14×10 ⁵
ラウリン酸ナトリウム	13×10 ⁵
パルミチン酸ナトリウム	10×10 ⁵

4-2-3. 補助変異原性の影響因子

ここで +S9 の場合、分子構造が明確な試料において補助変異原性が見られたため、それぞれの界面活性剤の分子構造を手掛かりとして補助変異原性の影響因子についての解析を試みた。家庭洗剤用の AS は親油基部分の炭化水素基の構造が不明であったが、文献⁷⁾をもとに、簡単のため炭素数 13 の飽和炭化水素基として計算し、解析を行った。その結果、界面活性剤 1g 当たりのリバ-タツ数と Davies の方法⁷⁾に従い算出した Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) (Fig.15)、及び文献⁷⁾から得た Critical Micelle Concentration (CMC) (Fig.16)との間に比較的良好な関係が見い出された。

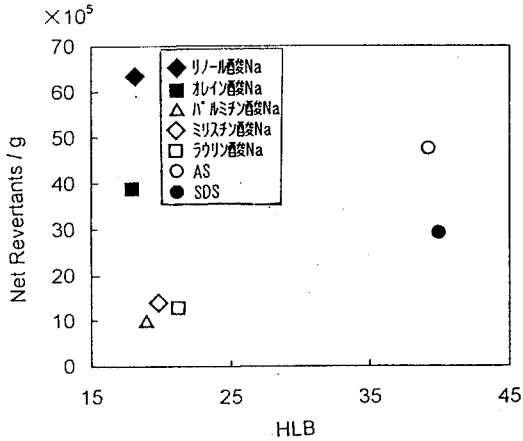


Fig.15 Relationship between HLB and Net Revertants / g

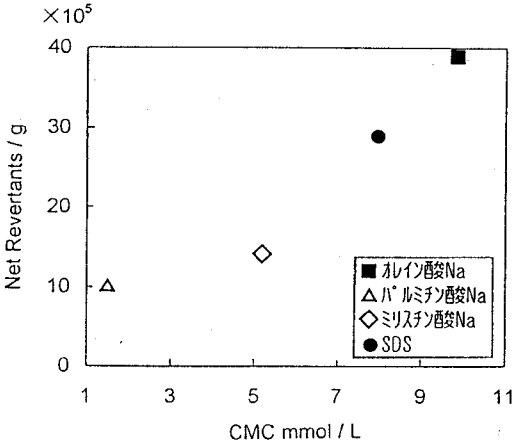


Fig.16 Relationship between CMC and Net Revertants / g

HLB は界面活性剤の親水性と親油性のバランスを表す指標であり、一般にその値が大きいほど親水性が大である。また CMC は水溶液中に分散している界面活性剤分子が急激に会合し、親油基を内側にした安定な形態であるミセルを形成する臨界濃度であり、上述の HLB と同様、界面活性剤の親水・疎水性を表す指標と考えられている¹⁹⁾。すなわち、CMC が高い界面活性剤は、CMC が低い界面活性剤と比較して等しい濃度においてミセルを形成しづらいことから、その親油基の親油性は低く、従って界面活性剤全体の親水性は高いと考えられる。

検討の結果、まず HLB については、飽和炭化水素基を有すると考えられる界面活性剤は、何れも HLB が増加するにつれて、界面活性剤 1g 当たりのミセル外数が増加するという傾向が見られた。次に CMC について見ると、飽和、不飽和炭化水素基の別に関わらず、CMC の増加に伴う、界面活性剤 1g 当たりのミセル外数の増加が見られた。従って、親水性が高い界面活性剤程、より大きい補助変異原性を有すると考えられた。

更に、以上の結果から補助変異原性の発現機構を考えると、まず、親水性が高い、すなわち CMC が高い界面活性剤は、水溶液中においてミセルより単分子の状態で存在することが多いと考えられる。ここで界面活性剤の親油基部分に注目すると、まず水中でミセルを形成している場合では、界面活性剤は親油基を内側、親水基を外側に配置しており、親油基の露出は少ないと考えられる。これに対し、単分子で存在している界面活性剤では、ミセルを形成している場合と比較して、その親油基部分がより露出していると考えられる。従って、単分子で存在している界面活性剤程、その親油基部分が細胞膜に直接触れる機会が多くなると考えられ、細胞膜表面に損傷等の影響を与える機会も多くなると考えられた。

また不飽和脂肪酸は、その 2 重結合部分で屈曲した構造であることが知られている。従って、不飽和脂肪酸を持つ界面活性剤の補助変異原性は飽和脂肪酸を持つ界面活性剤より大きく、更に分子中の 2 重結合が増えるほど補助変異原性が大きくなったのは、この構造による機械的な影響もあると考えられた。

5.まとめ

市販衣料洗剤用界面活性剤(助剤を含まず)5種類と試薬界面活性剤6種類について、変異原性試験および補助変異原性試験を行った。その結果、以下の事が明らかになった。

(1) 変異原性は、既報⁴⁵⁾における市販洗剤の結果と同様に、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの試料においても明確には見い出されなかった。

(2) 4NQO あるいは BaP の TA-100 に対する作用に及ぼす界面活性剤の影響を、補助変異原性として検討した。まず 4NQO に対しては、界面活性剤と 4NQO をほぼ同時に TA-100 に作用させた場合(Case A)で AS と α -SFE において、界面活性剤を作用させた後に 4NQO を作用させた場合(Case B)で SDS において、そして 4NQO を作用させた後に界面活性剤を作用させた場合(Case C)で非イオン系界面活性剤である AE と DA においてそれぞれ顕著な補助変異原性が見い出された。従って、陰イオン系界面活性剤は 4NQO と同時あるいはそれより先に菌体表面に作用しその表面に何らかの影響を与え、4NQO がより容易に菌体内に取り込まれるようにする作用を有していると考えられ、これに対して非イオン系界面活性剤は 4NQO と同時あるいは遅れて菌体内部に進入し、菌体内部において 4NQO の影響を強める作用を有していると考えられた。補助変異原性の強さを見ると、 α -SFE>AE>DA>SDS>AS の順となり、既報⁴⁵⁾と同様、石鹸以外の界面活性剤で補助変異原性が見られ、特に最近我が国に導入された α -SFE¹⁾で顕著であった。

(3) BaP に対してはイオン系にかかわらず、いずれも界面活性剤を先に作用させた後に BaP を作用させた場合(Case B)において顕著な補助変異原性が見い出された。従って BaP に対する補助変異原性は、界面活性剤によって菌体表面が何らかの影響を受け、その結果 BaP をより取り込みやすくなったため起こると考えられた。補助変異原性の強さを見ると、リール酸ナトリウム>AS>パルミチン酸ナトリウム>石鹸>SDS>DA>ミリスチン酸ナトリウム>ラリ酸ナトリウム>パルミチン酸ナトリウムの順となり、既報⁴⁵⁾と同様に石鹸(脂肪酸ナトリウム塩)で補助変異原性が見い出されたことになるが、現在僅かずつであるが生産量が増加しつつある AS¹⁾とその純粋物質である SDS、そして主に助剤として使用される DA でも見い出された。これは、前報では Case A のみで検討を行っており、本研究におい

て行った Case B の手法がより高感度であったためと考えられた。

(4) BaP に対する補助変異原性試験において、分子構造が明確な脂肪酸トリウム塩及び SDS で補助変異原性が見い出されたため、その影響因子についての解析を試みた。その結果、HLB 及び CMC が増すに従って界面活性剤 1g 当たりの純バクテリウム数が増加する傾向が見られた。このことから補助変異原性の強度は、親水性が高い界面活性剤程大きいことが示唆された。

また不飽和炭化水素基を有する界面活性剤の補助変異原性は、飽和炭化水素基を有する界面活性剤より大きく、また不飽和炭化水素基の 2 重結合数が多い程、より大きい補助変異原性を示した。このことから、2 重結合による不飽和炭化水素の機械的な屈曲構造が、補助変異原性の大きさを左右する要素の一つであることが示唆された。

参考文献

- 1) 吉村晃一，化学物質としての界面活性剤—その基本的理解のために—，水環境学会誌，Vol.16，No.5，pp.294-301，1993。
- 2) 財団法人日本環境整備教育センター，月刊浄化槽，No.219，pp.4，1994。
- 3) 近藤邦成，合成洗剤の動向と未来，用水と廃水，Vol.22，No.4，pp.467-476，1980。
- 4) 守田康彦，高橋敬雄，浦野紘平，遠藤哲広，AMES 試験による界面活性剤の遺伝毒性評価，第 28 回水環境学会年会講演集，pp.192-193，1994。
- 5) 守田康彦，高橋敬雄，遠藤哲広，楠井隆史，浦野紘平，生態毒性からみた界面活性剤の環境影響評価，環境工学研究論文集，Vol.31，pp.233-240，1994。
- 6) 中央労働災害委員会，安衛法による変異原性試験—テストガイドラインと GLP—，1991。
- 7) 吉田時行，進藤信一，大垣忠義，山中樹好共編，新版界面活性剤ハンドブック，工学図書株式会社，1991。
- 8) (社)日本油化学協会，改訂三版油脂化学便覧，丸善株式会社，1990。
- 9) 吉村孝一，界面活性剤の水圏微生物に対する吸着性と生分解性，用水と廃水，Vol.35，No.2，pp.113-124，1993。