

アセチルコリンエステラーゼ活性阻害による水質評価

衣笠 治子,¹ 山口之彦,² 宮崎 信之,³
奥村 昌美,⁴ 山本 義和^{4*}

(2000年10月12日受付, 2001年2月26日受理)

¹園田学園女子大学短期大学部, ²大阪市立環境科学研究所,
³東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター, ⁴神戸女学院大学人間科学部

Evaluation of Toxicity in the Aquatic Environment Based
on the Inhibition of Acetylcholinesterase

Haruko Kinugasa,¹ Yukihiro Yamaguchi,² Nobuyuki Miyazaki,³
Masami Okumura,⁴ Yoshikazu Yamamoto^{4*}

¹Sonoda Women's University Junior College, Amagasaki, Hyogo 661-8520, ²Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Tennoji, Osaka 543-0026, ³Otsuchi Marine Research Center, Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Otsuchi, Iwate 028-1102, ⁴School of Human Sciences, Kobe College, Nishinomiya, Hyogo 662-8505, Japan

To evaluate toxicity in the aquatic environment, a new, rapid and effective screening test has been required. In the present study we describe the procedure of a screening test based on the inhibition of *in vitro* acetylcholinesterase activity, and report the application to some water samples from aquatic environments, which contain trace amounts of a variety of organophosphorus compounds.

A porous polystyrene cartridge PS-2 concentration system was used for preparation of water samples in the field for toxic evaluation. Dichlorvos inhibited 86% of acetylcholinesterase activity, while fenitrothion, diazinon and iprobenfos showed either less or no inhibitory effect. Organophosphoric acid triesters which contain an aryl group, e.g. triphenyl phosphate, tricresyl phosphate and cresyl diphenyl phosphate, showed higher inhibition than those without an aryl group.

Comparison of inhibition of acetylcholinesterase in river water samples from Hyogo (an urban area) and Iwate (a rural area) indicated that the former rivers were more highly polluted in organophosphorus compounds than the latter ones. There was a high inhibitory effect on acetylcholinesterase by concentrated samples of raw sewage and this effect gave a good dose-response relationship.

キーワード：アセチルコリンエステラーゼ, 毒性評価, 有機リン化合物, 河川水, 下水処理水, 水環境

近年, 我々を取りまく水環境には, 農場, 水田, ゴルフ場からの農薬, さらには産業排水や生活排水などに由来する微量汚染物質が混在している。これらの水環境に含まれる汚染物質は多種多様であり, その同定と定量には, 多大な労力と経費を必要とする。その中でも有機リン系農薬は, その即効性と農薬本体の環境中での分解が比較的早いことより, 水田やゴルフ場で多用されている。その生体内での代謝過程や環境中での分解過程については知見が集積されており, 水環境中での農薬本体,

およびその代謝物の毒性評価の必要性を指摘する報告は多い。^{1,2)}

有機リン化合物の中でも, 有機リン酸トリエステル (Organophosphoric acid triesters: 以下 OPEs) は, プラスチック製品や衣料の難燃性可塑剤として, 1980年代後半から飛躍的に需要と生産が伸びてきており, その環境への流出や生態系への影響が報告されている。³⁻⁶⁾

アセチルコリンエステラーゼ (EC3.1.1.7: 以下 AChE) は, 有機リン系農薬, カーバメート系農薬など

* Tel: +81-798-51-8659, Fax: +81-798-51-8659, E-mail: y-yamamo@mail.kobe-c.ac.jp

によって活性が阻害され、それにより殺虫効果をもつ。この反応を環境モニタリングのための方法として利用する試みは、農薬や重金属などをターゲットとして *in vivo*⁷⁻⁹⁾ および *in vitro*¹⁰⁻¹³⁾ の系で報告されている。我々は、微量環境化学物質が混在する水環境そのものの毒性を迅速、簡便に測定し、毒物の種類とその量を推定することを目的とし、酵素阻害活性の測定条件および有機リン系農薬の AChE 阻害濃度について報告した。¹⁴⁾ 本報では、固相抽出した下水や河川水の濃縮物を本法に適用すると同時に有機リン化合物の定量を行い、AChE 活性阻害を指標とした簡易毒性スクリーニングとして本法の有用性について検討した。

実験方法

供試した酵素および有機リン化合物 酵素は電気ウナギ (*Electrophorus electricus*) 脳由来の AChE 製剤 (ペーリンガーマンハイム Co.Ltd) を用いた。フェニトロチオン (MEP), ダイアジノン, ジクロロボス (DDVP), イプロベンフォス (IBP), リン酸トリメチル (TMP), リン酸トリエチル (TEP), リン酸トリブチル (TBP), リン酸トリスブトキシエチル (TBXP), リン酸トリス 1,3-ジクロロ 2-プロピル (TDCPP), リン酸トリフェニル (TPP), リン酸トリクレジル (TCP), リン酸クレジルフェニル (CDP) は和光純薬製, リン酸トリス 2-クロロエチル (TCEP) とリン酸トリエチルヘキシル (TEHP) は東京化成製を用いた。

酵素活性測定法 活性測定は Ellman *et al.*¹⁵⁾ の方法を一部改変して行った。すなわち AChE 溶液 (5 units/mL) 0.04 mL, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.4 mL, 0.005 M 5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸溶液 0.2 mL を石英キュベット内で混合した。その後、基質として 0.03 M ヨウ化アセチルチオコリン溶液 0.16 mL を添加し、60 秒間の 412 nm における吸光度変化量を 30°C で測定した。有機リン化合物あるいは環境水濃縮試料を添加する際は、あらかじめ基質を添加する前に試料を 0.05 mL 加えて、AChE 溶液と 30°C で 15 分間のプレインキュベーションして活性を測定した。なお、有機リン化合物はエタノールに溶解して使用した。エタノール自体の酵素活性阻害率は約 10% であり、これを活性阻害の比較対照とした。

環境試料の採取 環境試料として、下水処理水と河川水を用いた。下水については、1998 年 11 月 30 日に兵庫県南部の下水処理場で、生下水と活性汚泥処理後に塩素処理をした放流水を採取した。河川水については、兵庫県南東部および岩手県の主要河川を対象とした。兵庫県南東部では、1999 年 10 月 4 日に神崎川、庄下川、武庫川、夙川、芦屋川において Fig. 1 に示した各地点で採水した。岩手県では、1999 年 7 月 26 日と 27 日の

2 日間、Fig. 2 に示した各河川の汽水域よりもやや上流地点で採水した。採水には金属製バケツを用い、原則と

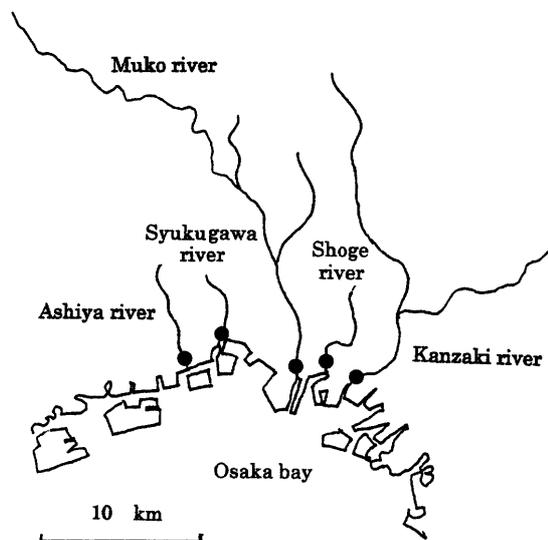


Fig. 1. Location of sampling sites in Hyogo prefecture.

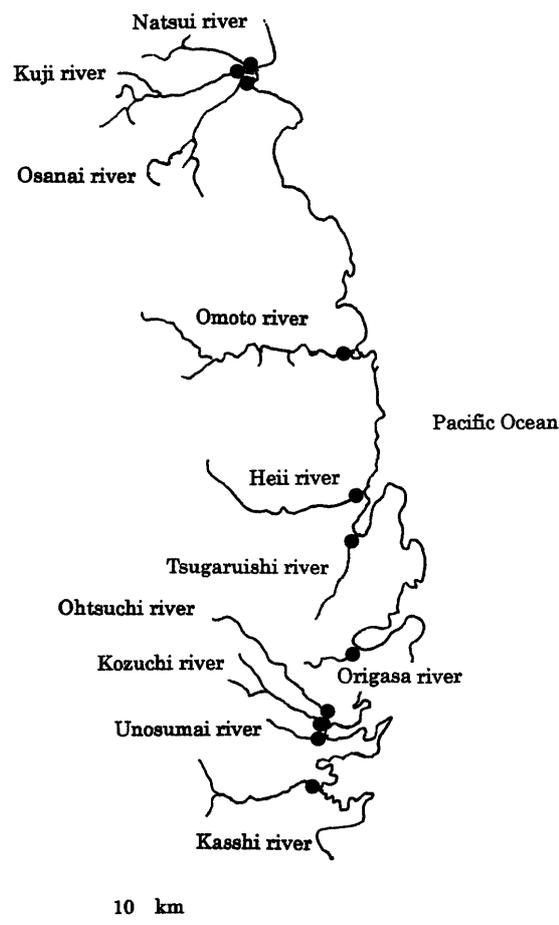


Fig. 2. Location of sampling sites in Iwate prefecture.

して橋上から流れの中心部の水を採取した。採取試料はポリエチレン製容器に入れて低温保存し、採水当日あるいは翌日に濃縮操作を行った。

濃縮試料の調製 水試料の濃縮にはスチレンジビニルベンゼン重合体 265 mg が充填された固相抽出カートリッジ Sep-Pak PS-2 (NIHON WATERS K.K.) を用いた。試料 1 L をあらかじめ、グラスファイバーろ紙 GB140 (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) で吸引ろ過し、アセトン 5 mL と精製水 5 mL であらかじめ洗浄した Sep-Pak PS-2 にペリスタポンプを用いて 7 mL/min の流速で通水した。カートリッジ内の水分除去のため、窒素ガスを 5 分間通気後、エタノール 5 mL で溶出したものを必要に応じてさらに濃縮して酵素活性阻害測定用および有機リン化合物の定量用試料とした。

有機リン化合物の測定法 有機リン化合物の測定は兵庫県で採取した 5 河川水について行った。定量用試料 4 mL をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、0.8 mL の *n*-ヘキサンに溶解したのち、GC-FPD で定量した。GC-FPD の測定条件は次のとおりである。

装置：HP5890A カラム：ジメチルポリシロキサン (DB-1), 30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, キャリアーガス流量：ヘリウム 1 mL/min, カラム温度 (昇温)：60 °C ~ 180 °C (20 °C/min) → 220 °C (2 °C/min) → 280 °C (5 °C/min), 注入口：スプリットレス注入法, 温度 250 °C, 検出器：温度 280 °C, 干渉フィルター 526 nm (P モード), 空気流量：100 mL/min, 水素流量：75 mL/min, メイクアップガス：窒素 35 mL/min。

結 果

有機リン化合物による AChE 活性阻害 実験に供した 4 種の有機リン系農薬が AChE 活性に及ぼす影響を Table 1 に示した。活性測定系での濃度が 1 mg/L のとき、最も強い阻害力を示したのは DDVP であり、86% であった。ダイアジノンと MEP の阻害力はそれぞれ 24%, 11% とかなり低く、IBP は全く阻害を示さなかった。もっとも阻害力が強かった DDVP については

Table 1. Inhibition of acetylcholinesterase activity by several organophosphorus pesticides

Compound	Concentration (mg/L)	Inhibition (%)
Fenitrothion (MEP)	1	11
Diazinon	1	24
Dichlorvos (DDVP)	1	86
	0.5	57
	0.1	17
Iprobenfos (IBP)	1	None

Inhibitors were preincubated with enzyme for 15 min prior to the addition of substrate.

0.5, 0.1 mg/L でも実験を行った。その結果、0.1 mg/L の濃度においても 17% の阻害力を示した。

OPEs については、活性測定系に 1, 10, 100 mg/L の濃度で添加して実験を行った (Fig. 3)。TMP, TBXP, TEHP, TDCPP, TCEP は活性をほとんど阻害しなかったが、TEP, TBP では 10 mg/L 添加でそれぞれ 21%, 14% の阻害が認められた。TPP, TCP, CDP は 10 mg/L の添加で 68%, 100%, 57%, といずれも高い活性阻害を示した。

固相抽出による有機リン化合物の回収 固相抽出による有機リン化合物の回収率を求めた。有機リン系農薬では 5 ng/L, OPEs は 280 ng/L となるように精製水に添加し、その 1 L を Sep-Pak PS-2 カラムで濃縮・溶出した液を GC-FPD で定量した。その回収率を Table 2 に示す。4 種の有機リン系農薬類および 10 種類の OPEs のうち、TBP, TBXP, TDCPP, TCEP, TPP, CDP の回収率は 65% 以上とほぼ良好であった。一方、TCP の回収率は 35% とかなり低く、TMP, TEP, TEHP は 4% 以下でほとんど回収されなかった。

AChE 活性阻害法による下水の水質評価 本法を用いて兵庫県南部の下水処理場において、生下水および活性汚泥処理後の放流水を採取し、濃縮後の AChE 活性阻害を調べた。その結果、生下水量と活性阻害率との間には比例関係が認められ、生下水の IC₅₀ (AChE 活性の 50% 阻害率) は原液換算で 20 mL に相当した (Fig. 4)。

AChE 活性阻害法による河川水の水質評価 兵庫県

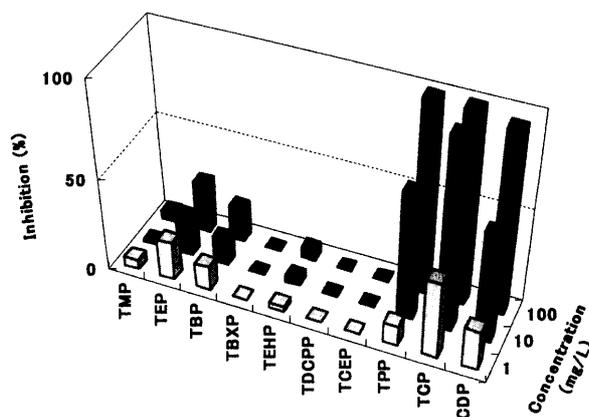
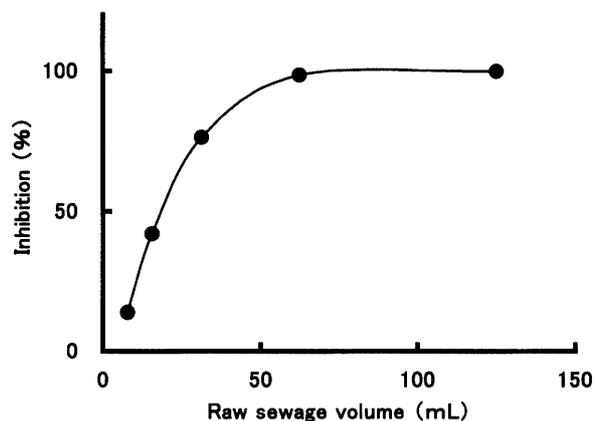


Fig. 3. Inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphoric acid triesters. TMP: Trimethyl phosphate, TEP: Triethyl phosphate, TBP: Tributyl phosphate, TBXP: Tris (butoxyethyl) phosphate, TEHP: Tris (2-ethyl hexyl) phosphate, TDCPP: Tris (1,3-dichloro isopropyl) phosphate, TCEP: Tris (2-chloroethyl) phosphate, TPP: Triphenyl phosphate, TCP: Tricresyl phosphate, CDP: Cresyl diphenyl phosphate

Table 2. Recoveries of organophosphorus compounds with Sep-Pak PS-2 cartridge

Compound	Inlet conc. (ng/L)	Inlet vol. (L)	Flow rate (mL/min)	Recovery (%)
MEP	5	1	7	81
Diazinon	5	1	7	82
DDVP	5	1	7	94
IBP	5	1	7	97
TMP	280	1	7	3
TEP	280	1	7	4
TBP	280	1	7	71
TBXP	280	1	7	93
TEHP	280	1	7	0
TDCPP	280	1	7	65
TCEP	280	1	7	95
TPP	280	1	7	96
TCP	280	1	7	35
CDP	280	1	7	96

The adsorbed compounds were desorbed with 5 mL ethanol from PS-2.

**Fig. 4.** Relation between raw sewage volume and inhibition of acetylcholinesterase activity.

南東部の5つの都市河川水および岩手県の11河川水から固相抽出で得られた濃縮物のAChE活性阻害率を測定した (Table 3)。兵庫県内河川において、AChE活性を顕著に阻害したのは庄下川であり、56%の阻害率を示した。夙川、神崎川、武庫川のAChE活性阻害率はそれぞれ20%、9%、8%と低レベルであり、芦屋川については活性阻害を示さなかった。

岩手県の11河川水では、小釜川と鶴住居川においてそれぞれ22%、18%の阻害が認められたが、その他の9河川では活性阻害を示さなかった。

兵庫県内5河川水中の有機リン化合物の測定 AChE活性阻害による毒性評価を実施したそれぞれの河川水濃縮液の有機リン化合物13種類を、GC-FPDで定量した

Table 3. Acetylcholinesterase inhibition by river water concentrate using a porous polystyrene cartridge PS-2

River	AChE inhibition (%)
Hyogo prefecture	
Kanzaki river	9
Shoge river	56
Muko river	8
Syukugawa river	20
Ashiya river	N.D*
Iwate prefecture	
Natsui river	N.D
Kuji river	N.D
Osanai river	N.D
Omoto river	N.D
Heii river	N.D
Tsugaruishi river	N.D
Origasa river	N.D
Ohtsuchi river	N.D
Kozuchi river	22
Unosumai river	18
Kasshi river	N.D

* N.D: not detected

Table 4. Concentrations of organophosphorus compounds in five rivers water in the southern part of Hyogo prefecture

Compound	Kanzaki river	Shoge river	Muko river	Syukugawa river	Ashiya river
MEP	0.04	0.25	N.D	0.11	1.34
Diazinon	0.05	0.08	N.D	0.05	N.D
DDVP	0.08	0.27	N.D	N.D	N.D
IBP	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
TEP	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
TBP	0.09	0.06	0.05	0.05	0.04
TBXP	0.49	1.18	N.D	0.35	N.D
TEHP	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
TDCPP	0.34	0.63	0.15	0.38	N.D
TCEP	0.30	0.26	0.37	0.10	0.05
TDCPP	0.02	N.D	N.D	N.D	N.D
TPP	0.02	N.D	N.D	N.D	0.06
TCP	N.D	N.D	N.D	N.D	0.25

N.D: not detected

Values are expressed as $\mu\text{g/L}$

(Table 4)。河川によって、4~10種類が検出されているが、有機リン化合物の組成と濃度にはかなりの相違がある。MEPは4河川で検出 (0.04~1.34 $\mu\text{g/L}$)、ダイアジノン3河川で検出 (0.05~0.08 $\mu\text{g/L}$)、DDVPは2河川で検出 (0.08と0.27 $\mu\text{g/L}$) された。

OPEsについてはTEP (0.01~0.02 $\mu\text{g/L}$)、TBP (0.04~0.09 $\mu\text{g/L}$)、TCEP (0.05~0.37 $\mu\text{g/L}$) が5河川

すべてで, TCP は 4 河川で (0.15~0.63 $\mu\text{g/L}$) 検出された。

考 察

水環境中に存在する様々な有機汚染物質の複合系での毒性を評価する方法の一環として, 固相抽出法による濃縮物の AChE 活性阻害を利用した迅速, 簡便な毒性スクリーニング方法を検討した。

水環境中で検出される頻度が比較的高い 4 種の有機リン系農薬と, 10 種の OPEs の AChE 阻害力を測定した。有機リン系農薬では DDVP が最も強い阻害力を示し, MEP, ダイアジノン, IBP の阻害力は弱いことが明らかになった (Table 1)。このように農薬原体の AChE 阻害力に大きな差が生じるのは, 化学構造の相違によると考えられる。すなわち, MEP やダイアジノンは分子内にチオホスホリル基 ($\text{P}=\text{S}$) をもち, 代謝過程でオクソン型 ($\text{P}=\text{O}$) に酸化されることで, AChE 阻害力が増強される。一方, DDVP では最初からオクソン型であるため, 環境中での分解性は高いが強い阻害力を示す。巻幡ら¹³⁾はヒト赤血球の AChE を用いて有機リン系農薬 33 種, そのオクソン体 8 種, およびカーバメイト系農薬 12 種の活性阻害力を調べている。その結果によれば, 有機リン系農薬では本報とほぼ同様の傾向が認められており, MEP やダイアジノンでは原体の活性阻害力は弱いがおクソン体になると非常に強い阻害力を示すことを明らかにしている。したがって, 環境試料中にオクソン体が存在すると, 本法ではその濃度に応じて強い AChE 活性阻害が得られることになる。今回, 著者らが実験に用いた OPEs では TPP, TCP, CDP がかなり強い活性阻害を示した (Fig. 3)。

OPEs の AChE 活性阻害には, オクタノール・水分配係数で示される疎水性との相関よりも, むしろ分子構造との関係が示唆される。すなわち, 分子中にアシル基を有する TPP, TCP, CDP はアシル基を持たない分子よりも強い活性阻害を示している。TPP, TCP, CDP などのアシル系 OPEs は細胞毒性が高く,¹⁶⁾ TCP の中ではリン酸トリオルトクレジルが他の OPEs と比べて高い神経毒性を持つことが報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ これらは AChE 活性阻害の結果とほぼ一致している。

次にスチレンジビニルベンゼン共重合体からなる Sep-Pak PS-2 カートリッジを用いて, 水中に添加した有機リン系農薬や OPEs を濃縮・溶出して回収率を測定した。TMP, TEP, TEHP 以外の物質では良好な回収率 (65~97%) が得られた (Table 2)。

石井ら²⁰⁾は Sep-Pak PS-2 カートリッジを用いて 44 種の水に微量有機化合物の濃縮条件を検討し, このカラムは実際の河川水からの疎水性物質の抽出に高性能を示すことを明らかにしている。今回の実験において,

TMP と TEP の回収率が低いのは, これらの物質の $\log P_{\text{ow}}$ が 0.1 以下と疎水性が低いことに起因している。DDVP は $\log P_{\text{ow}}$ が 1.5 と少し極性を有するにもかかわらず, 良好な回収率を示している。なお TCP と TEHP は $\log P_{\text{ow}}$ が 4~5 と疎水性が高いにもかかわらず回収率が低いのは, カートリッジからの溶出条件や容器への壁面吸着など種々の理由に基づくと考えられる。

なお, Hg, Cd, Cu などの重金属も AChE を阻害するが, これらの重金属類は Sep-Pak PS-2 に吸着されないため, 本実験法では対象外の物質となる。

本法を下水処理場での水試料に適用したところ, 生下水の濃縮物には非常に強い AChE 活性阻害が認められた。明瞭な dose-response 関係も得られ, この生下水の IC_{50} は生下水の原液 20 mL に相当した。Table 1 に示した実験結果を参考にして生下水原液の IC_{50} を DDVP 当量換算すると 60 $\mu\text{g/L}$ に相当することになる。

生下水にはこのような強い AChE 活性阻害が認められたが, 下水処理場からの放流水は活性阻害が 20% であり, 生下水に比べ活性阻害は 1/5 に低下していた。このことは, 下水処理過程において, AChE を阻害する種々の物質が活性汚泥に吸着あるいは微生物によって分解されたことを意味している。

大戸ら²¹⁾は塩素処理によってダイアジノンや MEP などの有機リン系農薬は 1 時間以内に 50% 以下に減少することを示している。また, 巻幡ら¹³⁾は塩素処理によって有機リン系農薬はオクソン型に酸化されて, 強い AChE 活性阻害を示す物質に変化することを明らかにしている。今回試料とした下水処理場からの放流水には AChE 活性阻害がわずかしか認められなかったが, 塩素処理による有機リン化合物の挙動と AChE 活性阻害との関係については今後解明すべき重要な課題である。

河川水への応用例として兵庫県南東部の 5 河川および岩手県の 11 河川水に本法を適用した結果, 尼崎市内を流れる庄下川では AChE 阻害率が最も高く 56% を示した。庄下川は尼崎市中央部を流れ, 溶存酸素, 生物化学的酸素要求量, 浮遊物質などの分析結果から考えると水質汚濁がかなり進んだ河川である。なお, 筆者らは武庫川について, Table 3 に示した実験結果以外にも調査を重ねており, 夏期の方が冬期よりも活性阻害が高い傾向を認めている²²⁾。このことは, 武庫川の流域で使用される農薬類が夏期に多いことを示唆している。

岩手県の 11 河川で阻害が認められた 2 河川はいずれも大槌湾に流入する近接した河川である。岩手県内河川周辺の環境は農村型であり, 農薬散布量の多い夏期には散布農薬類の河川への流出が予測されるが 7 月にサンプリングした試料の活性阻害率は低かった。このことより, 岩手県内河川では農業, 工業排水, 生活雑排水などに含まれる有機リン化合物の濃度レベルはかなり低いと

推察される。

兵庫県内5河川について有機リン化合物を測定した結果、11種類を検出した (Table 4)。芦屋川での MEP が $1.34 \mu\text{g/L}$ と高濃度であったが、福島¹⁹⁾は河川水では、有機リン系農薬の季節変動が大きいこと、および OPEs はある濃度を不規則に変化するという特徴を挙げている。永井ら²³⁾は、MEP, ダイアジノン, DDVP, IBP の琵琶湖、淀川水系での河川水中濃度は時期によって異なるが、通常数 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g/L}$ 前後で、高くても数 $\mu\text{g/L}$ のレベルと報告しており、本報でも IBP を除いては同様の傾向が得られている。なお、GC-FPD の溶出パターンにおいて同定および定量不可能なピークが数多く認められた。このことは、河川水中には多種多様な物質が共存しており、今回の実験で定量された有機リン化合物は、その一部にすぎないことを意味している。芦屋川で測定された $1.34 \mu\text{g/L}$ の MEP 濃度は活性測定系では $4.7 \mu\text{g/L}$ に相当するので、Table 1 の実験結果より AChE 活性を阻害しない濃度である。今回の実験では、活性測定系中の有機リン化合物の総量が Table 4 の実験結果に基づいて 27 ng と求められる庄下川の河川水において 56% の阻害率が認められた。この阻害率は DDVP に換算すると 1.4 ng に相当する。一方、Table 4 から活性測定系中の DDVP は 2.7 ng と求められるので、計算上の厳密な一致はみないが両者はほぼ近似した値である。これより、床下川の AChE 活性阻害の大部分は DDVP に基づくと推察される。

水系の環境調査では最初から数多くの化学物質について水の精密分析を行っている例が多い。しかし、有機リン化合物を調査対象とする場合にはまず本法のような迅速・簡便な方法で試料を一次スクリーニングし、AChE 活性阻害が認められれば、その後限定された試料について精密分析をすることが経済性および実用性の観点から望ましいと考えられる。また、本法では水中の有機リン化合物を個別に測定しなくても、有機リン化合物の作用を相加的に評価できるという研究上のメリットがある。今回の実験条件では 1 L の試料を濃縮して 5 mL とすることを基本としますが、AChE 活性阻害の測定にはわずか 0.05 mL しか必要としないため、より少量の試料で実験することも可能である。また、AChE 活性阻害が弱い試料では濃縮倍率を上げることで応用性をより高くできる。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、試料の採取や実験において神戸女学院大学卒業生の友田聡子、中村順子、坂本理沙、高見美智子、難波真理子諸氏の協力を得た。また、東京大学海洋研究所大槌臨海研究センターのスタッフの方々には、研究上の便宜を図っていただいた。なお、本

研究の一部は Cooperative International Research Project on Marine and Coastal Environment of Iwate Prefectural Government による研究助成金、および神戸女学院大学研究助成金によって行った。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 小野寺祐夫, 石倉俊治, 香川容子, 田中恵子. 塩素処理による水中有機物の化学変化 (第1報) P=S型有機リン系農薬から P=O型の生成. 衛生化学 1976; **22**: 196-205.
- 2) 宮本 徹. 含イオウ有機リン殺虫剤の活性化と解毒. 薬物動態 1986; **1**: 413-421.
- 3) Meijers AP, Chr van der Leer R. The occurrence of organic micropollutants in the River Rhine and the River Maas in 1974. *Water Res.* 1976; **10**: 597-605.
- 4) Sheldon LS, Hites RA. Organic compounds in the Delaware River. *Environ. Sci. Technol.* 1978; **12**: 1188-1194.
- 5) 山田 久. 有機リン酸トリエステル類による水質汚濁と水生生物への影響. 東海水研報 1987; **123**: 15-30.
- 6) 福島 実, 川合真一郎. 難燃性可塑剤有機リン酸トリエステル類による水質汚濁の現状と推移. 生態化学 1986; **8**: 13-24.
- 7) Escartin E, Porte C. Bioaccumulation, metabolism and biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 1996; **15**: 916-921.
- 8) Escartin E, Porte C. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Toxicol. Environ. Safety* 1996; **34**: 160-165.
- 9) Najimi S, Bouhaimi A, Daubeze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1997; **58**: 901-908.
- 10) 田畑真佐子, 西蘭大実, 坂内栄理子, 鈴木静夫. コリンエステラーゼ阻害にもとづく多摩川及び浅瀬川底質の毒性評価. 水質汚濁研究 1984; **7**: 640-643.
- 11) 小野寺祐夫, 若林修一, 古川 昇, 小川 正, 松浦義昌, 真鍋后輝, 鈴木 忍, 石倉俊治, 鈴木静夫. 酵素阻害法による環境中の微量有機リン農薬の検出-試料調製方法の検討. 環境化学 1992; **2**: 547-556.
- 12) Henmi N, Tsuji H, Teranishi K, Kaneda Y. Assay of pesticides in water by use of acetylcholinesterase in human red blood cell. *Anal. Sci.* 1995; **11**: 441-443.
- 13) 巻幡希子, 川元達彦, 寺西 清. ヒト血球アセチルコリンエステラーゼを用いた農薬検出法に関する基礎的検討. 水環境学会誌 1997; **20**: 797-802.
- 14) Kinugasa H. The Detection of the residual organophosphorus pesticides in the aquatic environment by using the inhibitory activity of acetylcholinesterase-1. Basic experimental conditions. *Sonoda Women's University Studies* 1998; **33**: 13-22.
- 15) Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone Jr RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; **7**: 88-95.
- 16) 川合真一郎. 有機リン酸トリエステルの水中細菌による分解と毒性. 水環境学会誌 1996; **19**: 700-707.
- 17) World Health Organization. Tricresyl phosphate. *Environmental Health Criteria.* 1990; 110.

- 18) 広瀬明彦. 有機リン酸トリエステル類の健康影響. 水環境学会誌 1996; **19**: 708-712.
- 19) 福島 実. 有機リン酸トリエステル類の水環境中での動態. 水環境学会誌 1996; **19**: 692-699.
- 20) 石井誠治, 浦野絃平, 亀屋隆志. 多孔質ポリスチレン樹脂カートリッジによる水中微量有機化合物の濃縮条件の一般化. 水環境学会誌 2000; **23**: 85-92.
- 21) 大戸幹也, 山本 敦, 松本明信, 高橋信孝, 健名智子, 斎藤行雄, 水上英一. 塩素処理水中のゴルフ場使用農薬の分解. 環境化学 1993; **3**: 59-64.
- 22) 衣笠治子, 中村順子, 坂本理沙, 高見美智子, 難波真理子, 奥村昌美, 山本義和. アセチルコリンエステラーゼ活性阻害による水質評価. 平成 12 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2000; 80.
- 23) 永井勉夫, 福島 実. 「1996 日本河川水質年鑑」(日本河川協会編) 山海堂, 1998; 975-984.