

酵母Two-Hybridアッセイの食品試料への適用

Application of Yeast Two-Hybrid Assay to The Endocrine Disruptors in Food Samples

石川 潔 氏家 愛子 佐藤 信俊

Kiyoshi ISIKAWA, Aiko UJIIE, Nobutoshi SATO

内分泌かく乱物質を評価する手法として、酵母Two-Hybridアッセイを導入し、種々の食品試料を対象とし、酸性、アルカリ性、中性下での有機溶媒抽出画分のアゴニスト（-S9, +S9）試験、アンタゴニスト（-S9, +S9）試験、細胞毒性試験（-S9, +S9）を実施し、食品試料への適用について検討した。その結果、酵母Two-hybrid法を食品試料に適用する場合には、オレイン酸等のC18不飽和脂肪酸やその誘導体を成分とするマトリックスを十分に除去しておくことが不可欠であることが分かった。また、牡蛎、イボニシにはトリフェニルスズ以外の強いアンタゴニスト活性を有する物質の存在が示唆された。

キーワード：酵母Two-Hybridアッセイ；内分泌かく乱物質；アゴニスト作用；
アンタゴニスト作用；毒性作用

Keywords : Yeast Two-Hybrid Assay ; Endocrine Disruptors ; Agonist ; Antagonist ; Toxicity

1 はじめに

環境中の内分泌攪乱物質をとらえるバイオアッセイの一つとして、白石ら¹⁾²⁾は酵母Y190株にエストロゲン受容体遺伝子、コアクチベーターの発現プラスミド、 β -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを導入した酵母Two-Hybridアッセイを開発し、多くの化学物質に活性を認めたと報告している。しかし、これを食品のスクリーニングに適用した例はこれまで見られていない。一方、当センターにおけるプロジェクト研究テーマとして生物指標を用いた環境汚染物のスクリーニングを取り上げており、食品部門での適用について検討を行った。

2 方 法

エストロゲン・アゴニスト（以下アゴニスト、-S9, +S9）試験、エストロゲン・アンタゴニスト（以下アンタゴニスト、-S9, +S9）試験及び細胞毒性試験（-S9, +S9）は、白石らの酵母Two-Hybridアッセイにより実施した。

内分泌攪乱物質の疑いがある物質として、SPEED'98の67種類（現在65種類）の対象物質には、DDT等約40種類の農薬、PCB、トリブチルスズ（以下TBT）、トリフェニルスズ（以下TPT）等が掲載されている。国立環境研究所報告書³⁾では、これらの物質を酵母Two-Hybridアッセイによりスクリーニングした結果は、アゴニスト試験（-S9）ではDDTやPCBを含めた10種類（66種類のうち）

が陽性、アンタゴニスト試験（-S9）ではTBTやTPTを含めた6種類（63種類のうち）が陽性と報告している。

今回、酵母Two-Hybridアッセイを食品試料に適用するにあたっては、食品抽出物の調製は、溶媒の種類やpH等の変更による段階的な分画抽出アッセイを取らず、当部のルーティン業務として分析方アッセイが確定している残留農薬類の中性抽出物、PCBのアルカリ加熱還流抽出物、有機スズの酸性抽出物を、それぞれの精製法により精製したものをを用いた。

2.1 標準品

- β -エストラジオール：生化学用，和光純薬(株)製，200nM/DMSOに調製
- 塩化TBT：シグマアルドリッチジャパン製，TBTとして400 μ M/DMSOに調製
- 塩化TPT：シグマアルドリッチジャパン製，TPTとして80 μ M/DMSO，60 μ M/DMSOに調製
- 4-ヒドロキシタモキシフェン：SIGMA製，1mM/DMSOに調製
- ミリスチン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- パルミチン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- ステアリン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- オレイン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSO，

100mM/DMSOに調製

- ・PCB：カネクロール300：400：500：600（1：1：1：1），5 μg/ml・DMSOに調製

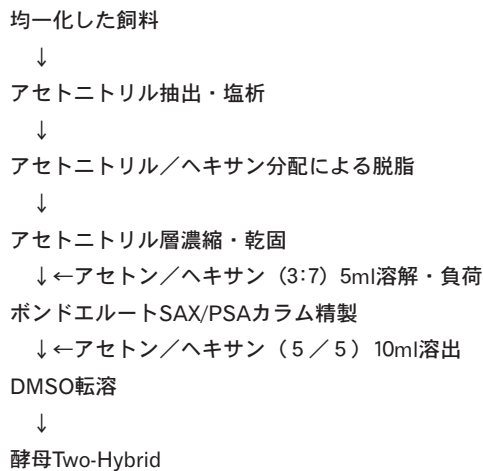


図1 TDS試料の中性抽出試験液調整アッセイ

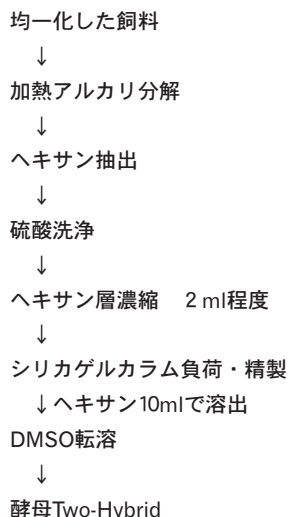


図2 アルカリ抽出試験液調整アッセイ

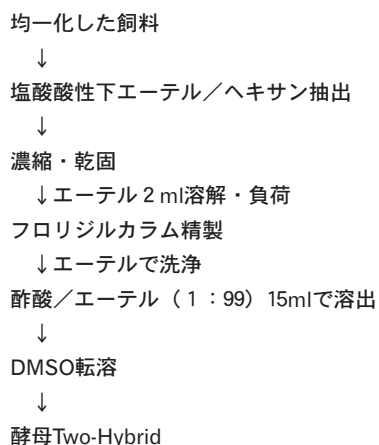


図3 酸性抽出試験液調整アッセイ

- ・p,p'-DDT, o,p'-DDT:残留農薬分析用, Dr.Ehrenstorfer GmbH製, 0.5 μM/DMSOに調製
- ・クロロフィルa: SIGMA製, 100 μg/ml・DMSOに調製
- ・β-カロチン: 高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬

2.2 検討対象品目および試験液の調製

アゴニスト試験は, 上記のとおり, 酵母Two-Hybridアッセイスクリーニングによるアゴニスト陽性報告がある残留農薬及びPCBの分析用抽出物を対象とした。対象品目は, 1999年~2002年にマーケットバスケット方式により購入・調製したトータルダイエット (以下TDS) 試料とした。TDS試料は, 全14群のうち, I群 (穀類), II群 (いも類), III群 (菓子類), V群 (豆製品), VI群 (果実類), VII群 (淡黄色野菜), VIII群 (緑黄色野菜), X群 (魚介類), XI群 (肉・肉製品), XII群 (乳・乳製品), XIII群 (嗜好品) の11群を使用した。

アンタゴニスト試験は, アンタゴニスト陽性の報告があるTBTおよびTPTの分析抽出物を対象とした。対象品目は, 県内産牡蠣と環境試料のインボセックス発現イボニシとした。

試料液の調製は, 図1に示す食品中の残留農薬抽出法⁴⁾による中性抽出物, 図2に示すPCBの加熱アルカリ分解法⁵⁾によるアルカリ抽出物, 図3に示す有機スズ試験方法⁶⁾による酸性抽出物を, それぞれDMSOに転溶して調製した。

中性抽出物は, 上記11群のそれぞれの群毎に4年分をまとめて1試料として, 約15~25g (食品重量として) の抽出物を濃縮乾固し, 100 μlのジメチルスルホキシド (以下DMSO) に溶解し調製した。アルカリ抽出物は同様に, X群, XI群, XII群について, 約20g~45g・食品重量/100 μl・DMSOに調製した。

また, イボニシ抽出物は, 三沢らがイボニシのインボセックスグレードとイボニシ体内のTBT, TPT濃度との関係について報告⁷⁾した抽出物の半量を, フロリジル精製後, ヘキサン転溶し冷凍保存して使用したものである。両試験において, 全ての試料で細胞毒性試験を実施した。

3 結果及び考察

3.1 試験系の再現性と確認

試験の再現性について, アゴニスト試験はβ-エストラジオール (以下E2と略す) 200nM, アンタゴニスト試験は4-ヒドロキシタモキシフェン (以下4-OH-TFと略す) 1mM, TBT400 μM, TPT80 μMを試験液として, 4回の並行試験を実施した結果, 図4に示すように良好な再現性が得られた。

この試験でのE2のコントロールとの化学発光比を10倍誘導する濃度 (以下EC₁₀値) は0.42nM, 4-OH-TFの50%影響 (E2活性抑制) 濃度 (以下EC₅₀値) は1400nM, TBTのEC₅₀値は1100nM, TPTのEC₅₀値は110nMであり, TBT, TPTのEC₅₀値は白石らの報告値560nM, 32nMより若干高い濃度であった。

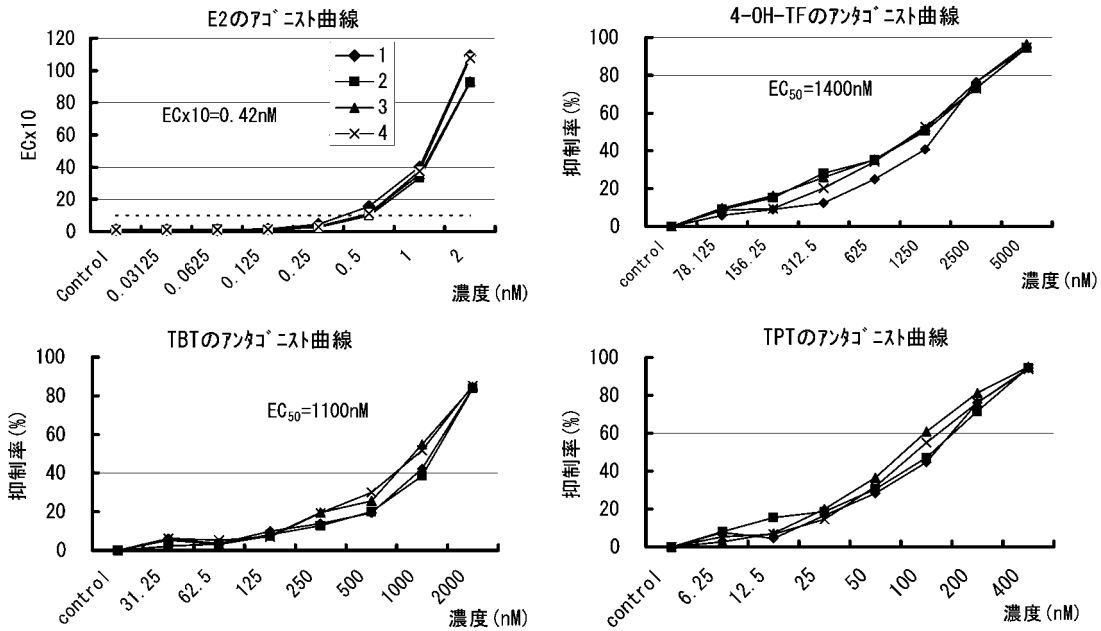


図4 アゴニスト, アンタゴニスト試験の再現性

3.2 TDS試料のアゴニスト活性及び細胞毒性

3.2.1 中性抽出物

TDS試料14群のうち、IV、IX、XIV群を除く11群の中性抽出物のアゴニスト試験結果を表1に示す。

VII群(緑黄色野菜: -S9, +S9)及びXI群(肉類: -S9)にアゴニスト活性が認められた。XI群については、肉類に存在するエストラジオール等による活性と考えられた。VII群については、抽出液が着色し葉緑素がかなり残っていたため、色素の主成分であるクロロフィルa (100ppm) およびβカロチン (250ppm) について市販標準品を用いてアゴニスト試験を行ったが、-S9, +S9ともE2活性は認められなかった(表2)。これらの濃度は、プレート上での懸濁を生ずる限界濃度であり、これ以上の濃度の試験はできなかった。

また、VII群に検出された農薬は、ダイアジノン、テフルトリン、ピリダベン、フルトラニル、マラチオン、ミクロブタニル、メタラキシル、メプロニルの8農薬であるが、このうちアゴニスト活性の無かった他の各群に検出されず、VII群だけに検出された農薬は、ダイアジノン、テフルトリン、ピリダベン、メタラキシル、メプロニルの5農薬であった。各群のアゴニスト試験時の全農薬濃度は、試料換算で0.2ppb (I群) ~120ppb (VI群) で、アゴニスト活性の無かったVI群に比べてVII群は38ppbであり、特に高い濃度ではなかった。農薬毒性辞典⁸⁾では、VII群に特異的に検出された5農薬のうち、テフルトリン、ピリダベン、メタラキシルの3種の農薬は環境ホルモン作用を有しないもの、ダイアジノンは疑いがあり今後検討を要するものとされており、メプロニルについての記載はない。ダイアジノン及びメプロニルのみを対象として算出した場合、試料換算で23ppbとなり、アゴニスト活性が農薬によるものである可能性も否定できない。

表1 TDS試料中性抽出物のアゴニスト試験結果

	-S9		+S9	
	EC _{x10}	IC ₅₀	EC _{x10}	IC ₅₀
I				3.1
II				2.5
III		45		3.0
V		36		3.5
VI				12
VII	4.3	11	>7.7	2.4
VIII		22		16
X				
XI	>51			27
XII				3.5
XIII		15		22

表2 標準品のアゴニスト試験結果

	-S9		+S9	
	EC _{x10}	IC ₅₀	EC _{x10}	IC ₅₀
PCB	-	-	-	-
pp'-DDT (ppb)	-	-	-	-
op'-DDT (ppb)	25	-	27	-
クロロフィルa	-	-	-	-
βカロチン	-	-	-	-

また、細胞毒性は-S9では、III、V、VII、VIII、XIII群に認められたが、+S9では試験を行った各群のうち、X群を除く全群で細胞毒性が強くなった。これらの抽出物について、GC/MS-SCAN測定により定性分析を行った結果、表3に示したとおり、C18のリノレン酸の誘導体等の不飽和脂肪酸とステロイド骨格の不飽和炭化水素類が主成分であった。

3.2.2 加熱アルカリ分解抽出物

X群（魚介類）、XI群、XII群（乳類）の加熱アルカリ分解で脂肪分をけん化することにより、分解・精製したPCB分析用抽出物について、アゴニスト試験結果およびマトリックス成分を表4および表5に示した。-S9では、中性抽出物においてE2活性が見られたXI群は、加

熱アルカリ分解抽出物では加熱分解処理によって肉中に含有するE2等が分解されてしまい、E2活性が消失した。また、抽出物中のマトリックスは、中性抽出物の場合と同様に、細胞毒性に関わる主要な成分と考えられる。この毒性については、XI群では-S9、+S9両方で無かったが、XII群の+S9では中性抽出物より弱い毒性が、中性抽出物で毒性のなかったX群試料に+S9で毒性が認められた。

3.3 アンタゴニスト活性及び細胞毒性

3.3.1 牡蠣抽出物

牡蠣中の有機スズは、図3に示す酸性抽出アッセイで調製するが、抽出物中の脂肪等夾雑物の除去精製に使用するSep Pak Plusフロリジル（910mg）は、ロットにより

表3 中性抽出物の成分（GC/MS-SCAN測定）

物質名		I	II	III	V	VI	VII	VIII	X	XI	XII	XIII
二重結合を有する化合物	Nicotinamide									◎		
	Butylated hydroxytoluene									◎		
	Caffeine			◎								
	Vitamin E							◎				
	Cholest- 5-en-ol (3 beta) -			◎						◎	◎	
	ergost- 5-en- 3-ol							◎				
	Stigmasterol	◎										
	Clionasterol	◎				◎	◎	◎	◎			
脂肪酸	Palmitic acid						○					
	Ethyl palmitate				○							
炭素数18の化合物	1-Octadecene						●					
	8, 11-Octadecadienoic acid, methyl ester							●				
	9, 12, 15-Octadecatrienoic acid, methyl ester							●				
	Linoleic acid						●					
	Ethyl linoleate		●		●							
	9, 12, 15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester						●					
	Ethyl linoleate		●									
	Oleamide										●	
	Oleic acid, 3-hydroxypropyl ester										●	
	9-Octadecenoic acid (Z)-			●								
	9, 12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,...		●					●				
	2, 6, 10, 14, 18, 22-Tetracosahexaene	●										

表4 TDS試料加熱アルカリ分解抽出物のアゴニスト試験結果 試料量 (mg)

	-S9		+S9	
	EC _{×10}	IC ₅₀	EC _{×10}	IC ₅₀
X群	-	-	-	31
XI群	-	-	-	
XII群	-	-	-	32

表5 加熱アルカリ分解抽出物の成分 (GC/MS-SCAN測定)

物質名	X	XI	XII
Pristane		○	
Cholesterilene		◎	◎

◎：二重結合を有する化合物

活性度の差が大きく、事前に標準品での検討が不可欠である。2段に重ねたSep Pak Plusフロリジル (910mg) 精製の際、洗浄に使用するエーテル量とTBT, TPTの回収率との関係を、予め標準品で検討した結果を図5に示す。TPTは、エーテル3mlの洗浄では100%に近い回収率であるが、10ml以上の洗浄では75%程度に低下した。そこで、アンタゴニスト試験に用いる抽出物は事前にエーテル3mlで洗浄し調製を行った。

牡蠣抽出物 (TPT含有量 $<1.6\mu\text{M}$) と、この抽出物に、塩化TPT標準液を添加し、TPT標準品で確実にアンタゴニスト活性が認められる濃度 (TPTとして $60\mu\text{M}$) に調製したものを対象に、アンタゴニスト及び細胞毒性試験を行った。

この結果、図6に示すとおり、アンタゴニスト活性は、TPT無添加の牡蠣抽出物がTPT添加より若干上回り、ほぼ同様な曲線を示した。この結果、TPT無添加の牡蠣抽出物のアンタゴニスト作用の50%影響濃度 (EC_{50}) 値は、牡蠣生重量換算で 0.14mg 、毒性による50%抑制濃度 (IC_{50}) 値は 0.42mg 、 $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=3.0$ であった。TPT添加の EC_{50} 値は 0.18mg 、 IC_{50} 値は 0.33mg 、 $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=1.8$ となり、両者とも、白石らのアンタゴニスト陽性評価基準である $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=4$ より低い値となった。そこで、両試料をDMSOで8倍に希釈し再試験を行ったところ、図7に示すように、細胞毒性が消失し、TPT無添加の牡蠣抽出物の EC_{50} 値は牡蠣生重量換算で 0.08mg 、TPT添加の EC_{50} 値は 0.09mg と算出され、アンタゴニスト活性がほぼ同程度認められた。

これについて、TPT添加牡蠣抽出物のアンタゴニスト活性をTPT濃度で計算すると、 EC_{50} 値はTPTとして 3nM であり、TPT標準品での EC_{50} 値 110nM と比較すると約1/40の低い濃度となった。このことから、牡蠣抽出物にはTPTのアンタゴニスト活性を大きく上回る物質が存在することが示唆された。

そこで、マトリックスをフロリジル精製段階で十分 (エーテル 15ml) 洗浄し、この抽出物で前段と同様の試験を実施したところ、図8のとおり、細胞毒性も40%以下に減少し、牡蠣に添加したTPTの EC_{50} 値は 106nM となった。この値は、TPTの標準品の EC_{50} 値 110nM とほぼ同じ値であり、上記TPT以外の強いアンタゴニスト活性を有する物質は、エーテル洗浄により、洗浄液とともに流出したものと考えられた。

3.3.2 洗浄流出成分の同定とアンタゴニスト活性への影響

強いアンタゴニスト活性を示し、洗浄により除去されるマトリックス成分について、GC/MS-SCAN測定による定性分析を行った。この結果、主成分はミリスチン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸等のC18の飽和・不飽和脂肪酸であった (図9)。そこで、これら 50mM 、 100mM の標準品を、培地またはS9 mixと4%-DMSOで50倍希釈して試験液とし、アンタゴニスト及び細胞毒性試

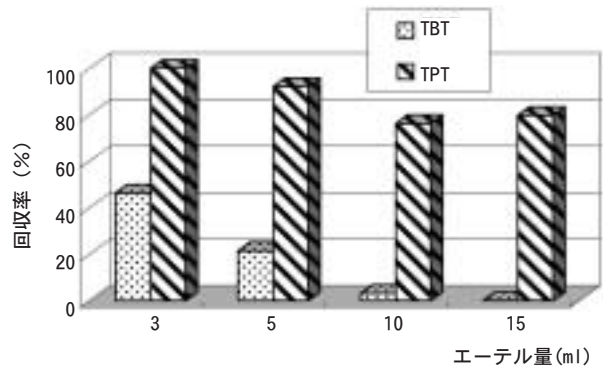


図5 エーテル洗浄量と回収率の関係

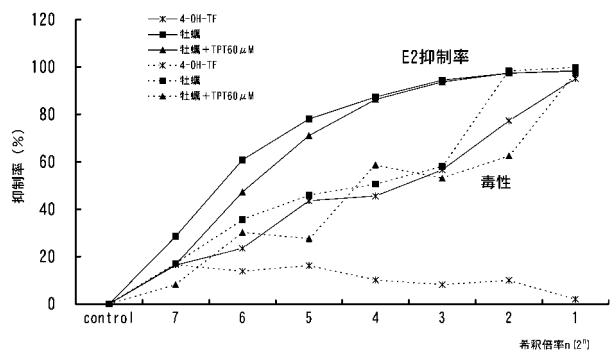


図6 牡蠣抽出物のアンタゴニスト試験 (エーテル洗浄 3ml)

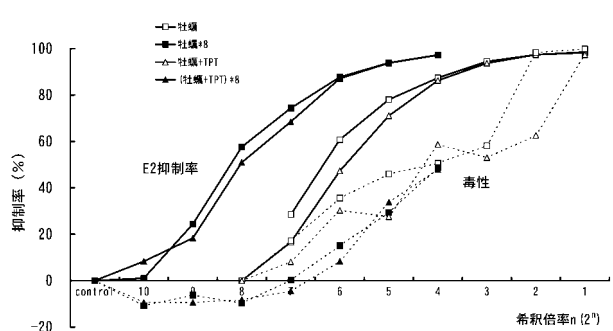


図7 牡蠣抽出物 (8倍希釈) のアンタゴニスト試験

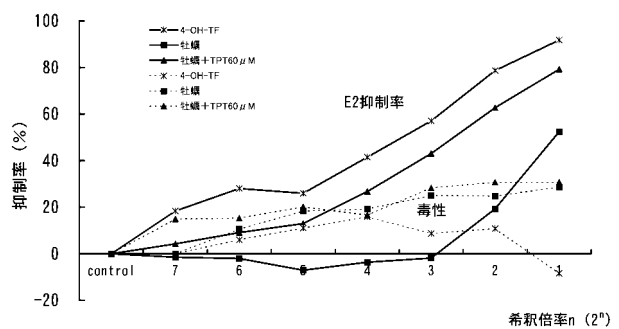


図8 牡蠣抽出物 (エーテル洗浄 15ml)

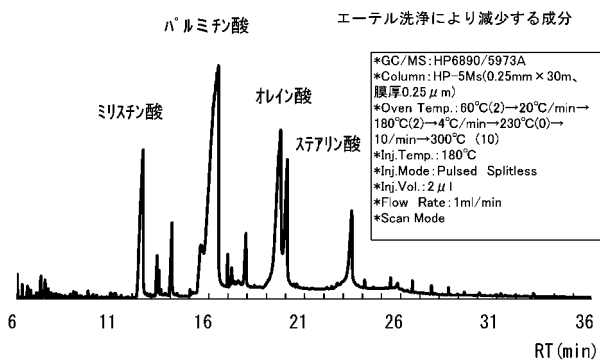


図9 マトリックス成分

表6 脂肪酸類のアンタゴニスト試験結果

(μM)

脂肪酸名	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
ミリスチン酸 (50mM)	-	-	-	-
パルミチン酸 (50mM)	-	-	-	-
ステアリン酸 (50mM)	-	-	-	-
オレイン酸 (50mM)	190	260	57	47
オレイン酸 (100mM)	370	330	170	81

表7 TPT, オレイン酸のアンタゴニスト試験結果

TPT濃度として (nM)

	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
TPT	120	-	13	-
TPT+オレイン酸 (50mM)	240	300	17	77
TPT+オレイン酸 (100mM)	190	200	80	56

表8 イボニシ抽出物のアンタゴニスト試験結果

(ng/ml)

	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
TPT	47	-	5.1	-
イボニシ	0.80	4.2	-	-

験を行った。結果を表6に示す。

ミリスチン酸等飽和脂肪酸3種は、アンタゴニスト活性(-S9, +S9)、細胞毒性(-S9, +S9)とも認められなかったが、不飽和脂肪酸であるオレイン酸はアンタゴニスト陽性であった。しかし、50mM濃度の-S9及び+S9でのIC₅₀/EC₅₀値は、それぞれ1.4, 0.8であり、アンタゴニスト活性の暫定判定基準であるIC₅₀/EC₅₀=4未満によりアンタゴニスト活性は無いと判断された。また、S9処理をしたオレイン酸は、細胞毒性が非常に強

くなることがわかった。

更に、オレイン酸にTPTを添加し、試料溶液としてそれぞれ50mM, 60 μM に調整したものを対象に、アンタゴニスト及び細胞毒性試験を行った。オレイン酸の添加により、TPTのEC₅₀値(-S9)は120nMから240nM, +S9では13nMから37nMに、アンタゴニスト活性が弱められる結果となった。

炭素数が18個の不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノレン酸については、発ガン抑制のアポトーシス誘導能があることが報告⁹⁾されているが、本試験での酵母に対する細胞毒性として発現している現象が、アポトーシス誘導能が酵母増殖抑制に働いた擬似細胞毒性である可能性も考えられる。

また、牡蠣中に存在が示唆された、強力なアンタゴニスト作用を持つ成分の同定はできなかった。

3.3.3 インボセックス発現イボニシ

冷凍保存をしておいたイボニシ抽出液は、更に、孔径20 μm でろ過後、フロリジル3gと上層にNa₂SO₄5gを積層したカラムに負荷し、エーテル40mlでマトリックスを十分に洗浄、1%酢酸/エーテル40mlで溶出した。溶出液を減圧乾固後、エーテル5mlに定容し、4/5量を酵母試験に、1/5量を有機スズ濃度測定用に用いた。有機スズ濃度は、エチルマグネシウムプロミドでエチル化し、最終検液1mlにしてGC/FPDで測定した結果、DBT, TPTがそれぞれ0.044ppm, 0.025ppm検出され、TBTは検出下限未満であった。この結果、冷凍保存したイボニシ抽出液のTPT全含有量は0.125 μg で、この値は平成14年度の有機スズの測定結果からの計算値の約1/7であり、冷凍保存中の分解による減少と考えられた。

そこで、計算値から得られる濃度相当量のTPT標準品をイボニシ抽出物に添加し、DMSO溶液に溶解して、各20 μl ずつを-S9, +S9のアンタゴニスト、細胞毒性試験に供した。この結果、原液ではE2活性の抑制が強すぎたため、10倍希釈による再試験を実施したところ、TPTとして計算した場合のEC₅₀(-S9)値は0.8ng/ml, IC₅₀/EC₅₀値は5.2であり、アンタゴニスト活性ありと判定された(表8)。

TPT標準品のEC₅₀値(-S9)は47ng/mlであり、イボニシのTPT換算EC₅₀値(-S9)は0.8ng/mlであることから、イボニシ中にはTPT以外のアンタゴニスト活性の強い物質が存在することが示唆された。この現象は、牡蠣にTPTを添加して行ったアンタゴニスト試験でも同様に認められている。酸性抽出物の主成分の一つであるオレイン酸は、上記試験結果から、酵母に対する細胞毒性作用により、共存するTPTのアンタゴニスト活性を弱める働きをすることが判明しており、アンタゴニスト活性の強い物質が脂肪酸類以外の何であるか、現在のところ不明である。

また、アゴニスト試験も併せて実施したが、E2活性はなかった。

以上の試験結果から、食品試料の大部分の抽出物には、炭素数18個の不飽和脂肪酸やその誘導体が、主成分として抽出されてきており、これら不飽和脂肪酸等は、酵母に対する細胞毒性を持ち、+S9では毒性が強くなることがわかった。従って、食品試料に酵母Two-Hybridアッセイによるアゴニスト試験、アンタゴニスト試験を導入する場合、不飽和脂肪酸等を主成分とするマトリックスを、十分に除去精製することが不可欠である。精製しない場合、細胞毒性の方が強く発現してしまう結果となり、良好な結果が得られないこととなる。上記試験で使用した抽出液は、いずれもミニカラム精製等の処理は行っているものであり、本試験ではGPCによる精製は行わなかったが、GPCでも農薬等と同程度の分子量である脂肪酸類の分離は理論的には難しいと考えられ、ミニカラムやGPC以外の精製法を検討する必要がある。

4 ま と め

- 1) マーケットバスケット方式により調製したトータルダイエツトスタディ試料については、中性抽出液のアゴニスト試験の結果、VII群（緑黄色野菜：-S9, +S9）およびXI群（肉類：-S9）に活性が認められた。XI群については、肉類に存在するエストラジオール等による活性と考えられる。
- 2) 細胞毒性は-S9では、III, V, VII, VIII, XIII群に認められたが、+S9では試験を行った各群のうち、X群を除く全群で細胞毒性が強くなった。これらのマトリックスについて、GC/MSスキャン測定により定性を行った結果、C18のリノレン酸の誘導体等の不飽和脂肪酸とステロイド骨格の不飽和炭化水素類が主成分であった。
- 3) 牡蠣及びインボセックスが発現したイボニシの酸性抽出物アンタゴニスト試験結果から、TPTより強いアンタゴニスト活性物質の存在が示唆される。また、こ

の物質は精製過程でエーテル洗浄により流出することが分かった。

- 4) 不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、酵母に対する細胞毒性があり、TPTとの共存下で、TPTのアンタゴニスト活性を低下させる。
- 5) 食品試料に酵母Two-Hybridアッセイによるアゴニスト試験、アンタゴニスト試験を導入する場合、C18の不飽和脂肪酸やその誘導体を主成分とするマトリックスの酵母細胞毒性が、試験結果に大きな影響を与えるため、十分に精製して除くことが不可欠である。

参 考 文 献

- 1) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 10, 57 (2000)
- 2) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 曾根義博, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 11, 65 (2001)
- 3) 独立行政法人 国立環境研究所特別研究報告: “環境ホルモンの新たな計測手アッセイの開発と環境動態に関する研究 (平成11~13年度)”, p29 (2002)
- 4) 菊地秀夫, 氏家愛子, 新目眞弓, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 19, 173 (2001)
- 5) 保健環境センター生活化学部: 標準作業書, “塩化ビフェニル (PCB)”
- 6) 保健環境センター生活化学部: 標準作業書, “有機スズ化合物”
- 7) 三沢松子, 阿部郁子, 佐久間隆, 氏家愛子, 阿部時男: 宮城県保健環境センター年報, 21, 106 (2003)
- 8) 植村振作, 河村宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫: “農薬毒性の辞典 改訂版” (2002), (三省堂)
- 9) 溝谷香壽美, 井上郁夫: 埼玉医科大学雑誌, 29, 117 (2002)