

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発とその  
実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

LC-MS による生体試料中のノニルフェノール，オクチルフェノールの分析

主任研究者 牧野恒久（東海大学医学部教授）

分担研究者 織田 肇（大阪府立公衆衛生研究所）

協力研究者 丹野瑤喜子（埼玉県衛生研究所）

堀江正一（埼玉県衛生研究所）

吉田栄充（埼玉県衛生研究所）

【研究要旨】

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC-MS）を用いたさい帯血，母体血，腹水及び尿中のノニルフェノール（NP）及びオクチルフェノール（OP）の分析法を検討した．分析に供したさい帯血，母体血，腹水及び尿，計35検体中のNP，OP濃度はいずれも検出限界（0.1-1.0ng/mL）以下であった．また，1名のボランティアに4-*t*-OP及び4-NPを6及び8mgの用量で経口投与し，尿中への排泄（未変化体及び抱合体）を調べた結果，4-*t*-OP及び4-NPは速やかに尿中に排泄され，その殆どが抱合体であった．

A. 研究目的

ノニルフェノール（NP），オクチルフェノール（OP）等のアルキルフェノール類には内分泌かく乱作用が疑われている．中でもNPについては平成13年8月，魚類に対して内分泌かく乱作用が認められたと環境省から報告された．

近年，河川水や下水処理水中の

NP，OPの分析例は数多く報告されている．しかし，ヒト血液や尿など，生体試料中の分析例は数少なく，さい帯血，腹水等进行分析した例は殆ど報告されていない．そこで今回，さい帯血，腹水，尿等について，高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC-MS）を用いたNP，OPの代謝体も含めた高感度分析法を検討した．

## B. 研究方法

### B.1 試料及び試薬

さい帯血，母体血及び腹水は東海大学牧野教室から提供されたものを用いた．さい帯血及び母体血は産科グループのボランティアから，腹水及び血液は婦人科グループのボランティアから採取した．採取した血液試料は，常法に従って血清を調製し，15分以内に凍結し，測定するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した．腹水も同様に採取後即座に凍結し，測定するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した．

尿は埼玉県衛生研究所職員から採取し，測定するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した．

標準品：4-ノニルフェノール(4-NP)，4-*n*-ノニルフェノール(4-*n*-NP)及び4-(1-メチル)オクチルフェノール- $\text{d}_5$ (NP- $\text{d}_5$ )は林純薬工業(株)製の環境分析用試薬，4-*t*-オクチルフェノール(4-*t*-OP)及び4-*n*-オクチルフェノール(4-*n*-OP)は関東化学(株)製の環境分析用試薬を用いた．

$\beta$ -グルクロニダーゼ：SIGMA社製 Type H-2 ( $\beta$ -Glucuronidase 105,000 units/mL, Sulfatase 4,300 units/mL)．

標準溶液：各標準品 10mg を精秤し，メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し，適宜 HPLC 移動相で希釈して標準溶液とした．

ISOLUTE Multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd.製，カートリッジは予めメタノール 10mL 及び水 5mL の順で洗浄した後使用した．その他の

試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた．

### B.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS)：Agilent 社製 1100 series LC-MSD を使用した．測定条件は表 1 に示した．

### B.3 検量線の作成

4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP 及び NP- $\text{d}_5$  の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 50 ng/mL の混合標準溶液を調製し，その 20  $\mu\text{L}$  を LC-MS に注入した．検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し，それぞれモニターイオンにより得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め，絶対検量線法により検量線を作成した．

### B.4 試験溶液の調製

#### B.4.1 遊離体の前処理法

血清，腹水は試料 1mL にメタノール 3mL を加え 1 分間ミキシングした後，遠心分離 (3000rpm, 10 分間) した．上清を採り，蒸留水 6mL を加えた後，前処理カートリッジに負荷した．50% メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 6mL で溶出した．溶出液に 0.1M 水酸化カリウム溶液 0.1mL を加えた後，約 0.1mL まで窒素気流下で減圧濃縮し，70%メタノールを用いて 1mL に定容して試験溶液とした．なお，尿にあっては試料 10mL を用い，直接カートリッジに負荷した．その

後の操作は，血清と同様に行い試験溶液を調製した．

#### B.4.2 抱合体の前処理法

血清，腹水は試料 1mL，尿は試料 10mL に 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL，NP-d5 2ng， $\beta$ -グルクロニダーゼ 20  $\mu$ L を加え，37℃，10 時間インキュベートした．その後の操作は遊離体と同様に行い試験溶液を調製した．

### C. 結果及び考察

#### C.1 LC-MS 測定条件の検討

一般に，工業用としてはノニルフェノール及びオクチルフェノール共に分岐タイプの 4-NP 及び 4-*t*-OP が用いられているが，今回は試薬標準品として市販されている直鎖タイプの 4-*n*-NP 及び 4-*n*-OP も含めて分析対象物質とした．

イオン化モードを検討した結果，いずれもフェノール性水酸基を有していることから **Negative mode** が適していた．また，移動相に微量の酢酸及び酢酸アンモニウムを加えることにより，各成分ともより高感度に検出された．しかし，酢酸及び酢酸アンモニウムの濃度が高くなるに従い検出感度は逆に低下することから，酢酸濃度は 0.005%，酢酸アンモニウム濃度は 1mM とした．

次にイオン強度に及ぼすフラグメント電圧の影響を検討した結果，各成分の脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  を効率良く生成する 90V に設定し

た．更に，他のパラメーターの最適測定条件を検討し，表 1 に示す条件を設定した．本条件によって得られた 4-NP，4-*n*-NP，4-*t*-OP，4-*n*-OP の検出限界は，SIM モードで 0.1ng/ml (絶対量として 2pg) であった (図 1) ．

#### C.2 前処理法の検討

##### C.2.1 抽出溶媒の検討

尿中の NP，OP は，尿試料を直接カートリッジに負荷することにより良好に回収された．しかし，血清試料では直接カートリッジに負荷した場合，直鎖タイプの 4-*n*-NP 及び 4-*n*-OP の回収率が極めて低く，20-30%程度であった．そこで，血清試料においてはメタノールで徐タンパクと同時に抽出し，遠心分離後メタノール層に蒸留水を加えてからカートリッジに負荷した．本操作を用いることにより，直鎖タイプの 4-*n*-NP 及び 4-*n*-OP を含め，いずれも良好に回収された．

##### C.2.2 カートリッジの検討

血液試料中の NP，OP 分析では超微量レベルの定量が求められており，試料調製法の構築に当たってはサンプリング時と同様に実験器材や試薬からのコンタミネーションを極力避けることが求められる．実際，前処理法を構築するに当たり，実験環境や実験器材・試薬から 4-NP の微量汚染が問題となった．そこで，より信頼性の高い前処理法を構築するため，4-NP の溶出量が少なく且つクリ

ーンアップ効果に優れたカートリッジを検討した。その結果，ISOLUTE Multimode が最も夾雑成分の除去効果に優れ，且つ 4-NP の溶出量が少なかった。

### C.2.3 0.1M 水酸化カリウムの効果

NP, OP は減圧乾固時に揮散し，その多くが損失された（メタノールで調製した 10ng/mL 混合標準溶液 1mL を 40℃，10 分間減圧乾固した時の残存量は，4-NP=16%，4-*n*-NP=82%，4-*t*-OP=9%，4-*n*-OP=52%，NP-d5=12%であった）。そこで，NP, OP が弱酸性化合物であることからアルカリ添加による揮散抑制効果について検討したところ，乾固時に 0.1M 水酸化カリウム溶液 0.1mL を加えることにより揮散を抑制できた（いずれの成分も 95%以上残存した）。なお，減圧濃縮時の実験室内空気からの 4-NP の汚染を防ぐために，減圧濃縮は窒素気流下で行った。

### C.3 抱合体の加水分解条件

NP, OP は，尿，血液中ではその大部分がグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体として存在するとされている。そこで，尿試料にあつては，C.6 で得た 4-NP 及び 4-*t*-OP 抱合体を含む尿を用いて，血清試料にあつては，血清 1mL に抱合体を含む尿 50  $\mu$ L 添加して加水分解条件を検討した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ量を 10, 20 及び 50  $\mu$ L と変えて加水分解率に及ぼす影響を調べた結果，いずれの量におい

ても 37℃，10 時間インキュベートすることによりほぼ完全に加水分解された。そこで，本法では酵素量は 20  $\mu$ L とした。

### C.4 添加回収実験

4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP 及び 4-*n*-OP を，血清にあつては 5ng/mL，尿にあつては 1ng/mL の濃度で添加し，回収率を求めた。その結果，血清及び尿ともいずれの成分も 70%以上の回収率であった（表 2）。本法による 4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP の検出限界は，血清では 0.1ng/mL，尿では 0.01ng/mL であった。一方，4-NP は尿及び血清ともに操作ブランク（最終試験溶液 1mL に対して  $0.32 \pm 0.18$  ng/mL）が観測された。一般に操作ブランクが観測された場合の検出限界 LOD は， $LOD = As - Ab = 3Sb$  ( $As$ =測定値， $Ab$ =操作ブランクの平均値， $Sb$ =操作ブランクの標準偏差)とされている。従って，血清中の 4-NP の LOD は 1ng/mL，尿にあつては 0.1ng/mL (検体量 10mL) であった。

### C.5 血液及び尿中の NP, OP 濃度

本法により，東海大学病院で採取されたさい帯血，母体血，腹水及び埼玉県衛生研究所で採取された尿，計 35 検体を分析した（表 3）。全ての試料において，4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP は先に示した本分析法の検出限界以下であった。尿及び血清試料の代表的な LC-MS クロマトグラムを図 2 に示す。なお，分析結

果をより確かなものとするために NP-d5 をサロゲートとして利用し、良好に回収されていることを確認した。

#### C.6 OP, NP の尿中への排泄

1 名のボランティアに 4-*t*-OP 及び 4-NP を 6mg 及び 8mg の用量で経口投与し、尿中への排泄（未変化体及び抱合体）を調べた。図 3 に示したとおり 4-*t*-OP 及び 4-NP は速やかに尿中へ排泄され、そのほとんどが抱合体であった。

#### D. 結論

・ LC-MS を用いた OP, NP の選択的且つ高感度な分析法を構築した。本法の検出限界は血液試料中濃度として 4-NP は 1ng/mL, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP 及び 4-*n*-NP は 0.1ng/mL, 尿試料中にあるのは、4-NP は 0.1ng/mL, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP 及び 4-*n*-NP は 0.01 ng/mL であった。

・ 1 名のボランティアに 4-*t*-OP 及び 4-NP を 6 及び 8mg の用量で経口投与し、尿中への排泄を調べた結果、OP, NP は速やかに尿中に排泄され、その殆どが抱合体であった。

・ さい帯血，母体血，腹水，尿等計 35 検体を分析した結果，試料中の NP, OP 濃度は，いずれも検出限界以下であった。

#### E. 研究業績

Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (投稿準備中)

表1 LC/MS測定条件

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)

| MS Conditions   |                         | HPLC Conditions |                             |
|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Ionization Mode | ESI, Negative Mode      | Column          | Cadenza CD-C18 (100 x 2 mm) |
| Fragmentor      | 90V                     | Eluent          | gradient                    |
| Nebulizer       | N2 (30 psi)             | Flow rate       | 0.2 mL/min                  |
| Drying gas      | N2 (10 l/min, 325°C)    | Oven temp.      | 40°C                        |
| V-cap           | 4500V                   | Injection size  | 20 µl                       |
| SIM ion         | m/z 205.1, 219.1, 224.1 |                 |                             |

グラジエント条件

A= 50% MeCN (0.005% 酢酸, 1mM酢酸アンモニウム)

B= 100% MeCN

| (min) | A  | B  |
|-------|----|----|
| 0     | 80 | 20 |
| 10    | 40 | 60 |
| 20    | 30 | 70 |

表2 添加回収実験

| 試料 | 添加濃度      | 回収率(% , mean ± SD) |          |          |          |           |
|----|-----------|--------------------|----------|----------|----------|-----------|
|    |           | 4-t-OP             | 4-n-OP   | 4-NP     | 4-n-NP   | d5-NP     |
| 尿  | 10ng/10mL | 93.5±3.6           | 95.7±1.6 | 91.1±4.0 | 93.2±2.7 | 91.2±3.9  |
| 血清 | 5ng/1mL   | 79.7±6.2           | 84.3±5.7 | 76.4±7.1 | 70.9±6.1 | 73.2±12.7 |

n=5

表3 さい帯血, 母体血, 腹水, 尿中のOP, NPの分析

| 試料  |       | 遊離体    |        |      |        | 遊離体+抱合体 |        |      |        |
|-----|-------|--------|--------|------|--------|---------|--------|------|--------|
|     |       | 4-t-OP | 4-n-OP | 4-NP | 4-n-NP | 4-t-OP  | 4-n-OP | 4-NP | 4-n-NP |
| 臍帯血 | IW-16 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-17 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-23 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-24 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-28 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-29 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-31 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
| 母体血 | IW-16 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-17 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-23 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-24 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-28 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-29 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IW-31 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
| 血液  | IZ-40 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-41 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-42 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-43 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-44 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-59 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-70 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
| 腹水  | IZ-82 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-40 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-41 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-42 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-43 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-44 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-59 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
| 尿   | IZ-70 | -      | -      | -    | -      | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | IZ-82 | <0.1   | <0.1   | <1.0 | <0.1   | <0.1    | <0.1   | <1.0 | <0.1   |
|     | SE-1  | <0.01  | <0.01  | <0.1 | <0.01  | <0.01   | <0.01  | <0.1 | <0.01  |
|     | SE-2  | <0.01  | <0.01  | <0.1 | <0.01  | <0.01   | <0.01  | <0.1 | <0.01  |
|     | SE-3  | <0.01  | <0.01  | <0.1 | <0.01  | <0.01   | <0.01  | <0.1 | <0.01  |
|     | SE-4  | <0.01  | <0.01  | <0.1 | <0.01  | <0.01   | <0.01  | <0.1 | <0.01  |
|     | SE-5  | <0.01  | <0.01  | <0.1 | <0.01  | <0.01   | <0.01  | <0.1 | <0.01  |

図1 NP, OP標準溶液のLC/MS-SIMクロマトグラム

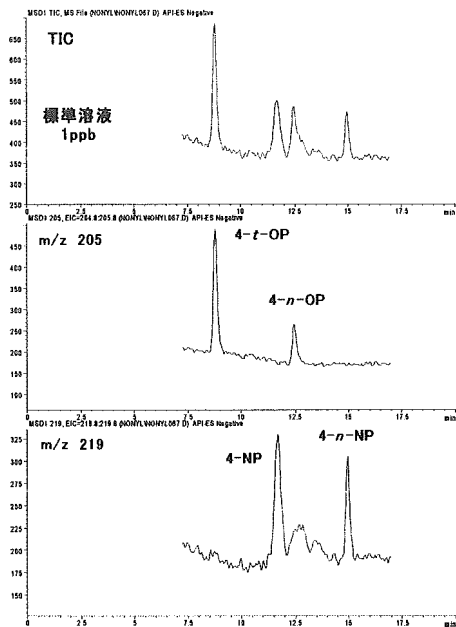


図3 OP, NPの尿中への排泄量

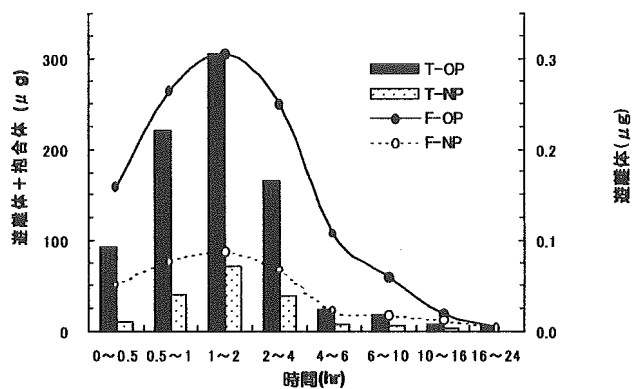
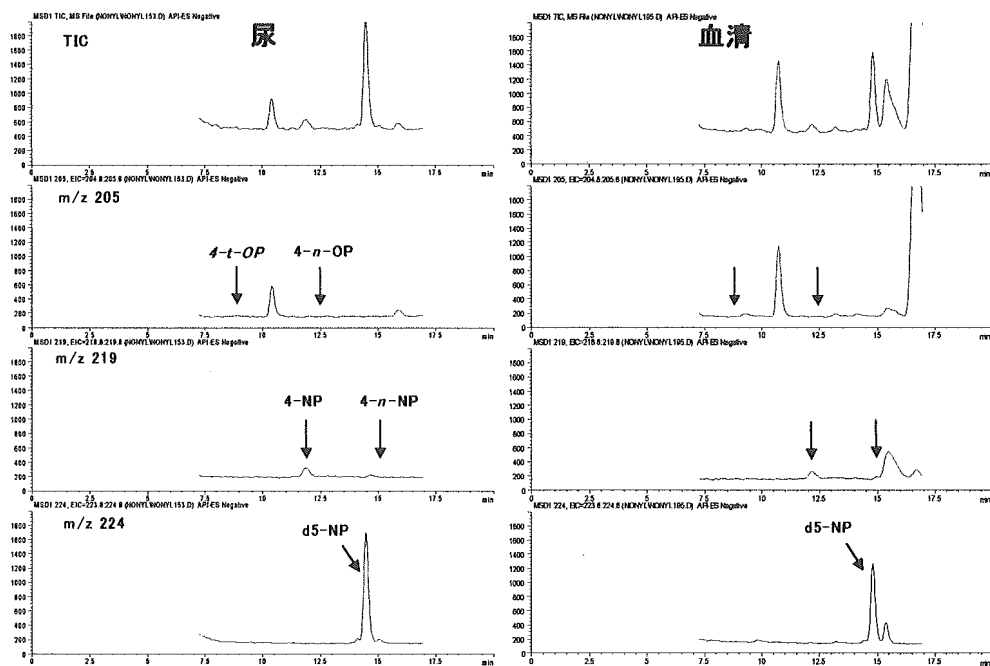


図2 尿及び血清の代表的なLC/MS-SIMクロマトグラム



平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト生体試料中多環芳香族炭化水素類(PAHs)及びその代謝物に関する分析法開発

主任研究者：牧野 恒久（東海大学）

分担研究者：中澤 裕之（星薬科大学）

協力研究者：早川 和一（金沢大学）

鳥羽 陽（金沢大学）

研究要旨

PAHs の代謝物の中でエストロゲン様活性を有する、2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)の HPLC-蛍光検出法による分析法を開発した。また、活性は弱いが従来から PAHs 曝露の指標として用いられてきた 1-ヒドロキシピレン(1-OHP)も同時に測定した。2-OHF の分析には、2 本の分離カラムを組み合わせたカラムスイッチング HPLC システムを用いた。尿試料は、抱合体を加水分解した後、固相抽出を用いて濃縮し検液とした。その結果、エストロゲン様活性を有する 2-OHF を健常人の尿中から検出した。また 2-OHF と 1-OHP について、PAHs の摂取源の一つである喫煙の影響を検討したところ、両化合物ともに喫煙者でそれらの尿中濃度が有意に高く、PAH 曝露の有用な指標になることが分かった。更に、毛髪や母乳中の PAHs の測定法を開発した。毛髪中 PAHs について、喫煙との関連は認められなかったものの、長期的な曝露指標となりうる可能性が示唆された。以上の結果から、PAHs の摂取により、抗エストロゲン、抗アンドロゲン様作用を有する PAHs が毛髪や母乳中に蓄積され、また同時に生体内でエストロゲン様活性を有する代謝物が生成し、尿中に排泄されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

化石燃料などの有機物の不完全燃焼によって生成する多環芳香族炭化水素(PAHs) (Fig. 1)は、癌や喘息などの原因となることが知られている。一方、著者らは、ベンゾ[a]ピレン(BaP)をはじめとする数種類の PAHs が抗エストロゲン、抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。またヒトエストロゲンレセプター (hER) に対する競合

実験及び酵母の hER に応答した  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現系を用いた実験では、BaP の代謝物(Fig. 1)として知られている モノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OHBaP)の水酸基の位置の異なる異性体 12 種のうち、3-OHBaP がビスフェノール A に匹敵する強さの結合能を有していた。また大気中で BaP が粉じん中に分布し易いのに対し、ほとんどが気相中に存在し、その濃度が BaP



より高いフルオレンの代謝物である 2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)も 3-OHBP と同等のエストロゲン様活性を有することを見いだした。このことから、PAHs の内分泌かく乱作用の全容を明らかにするためには、代謝物を含めたホルモン活性 PAHs 関連化合物の生体試料中濃度からヒトの PAHs の暴露量を把握すること、及びそれらから内分泌攪乱の可能性を推定することが不可欠であると考えられた。そこで、生体試料中の PAHs やその代謝物のモニタリング法の開発を目的として以下の検討を行った。

平成 11、12 年度の厚生科学研究においては、カラムスイッチング HPLC による OHBP の異性体の分離分析法を開発した。平成 13 年度はそれに加えて、2-OHF のカラムスイッチング HPLC による分離分析法を開発した。更に活性は弱いが従来から PAHs 暴露の指標として用いられてきた 1-ヒドロキシピレン(1-OHP)の分析法も同時に開発した。開発したこれら分析法をヒト尿試料に適用し、PAHs の摂取源の一つである喫煙の影響を検討した。また長期暴露及び次世代暴露の評価方法の開発を目的として、毛髪、母乳中 PAHs の分析法も開発した。

## B. 研究方法

### B・1 試薬

EPA610 PAHs Mix は Supelco 製、2-OHF、1-OHP 及び  $\beta$ -グルクロニダーゼ(110350 U/mL) / アリルスルファターゼ(4194 U/mL), Type H-2, From *Helix pomatia* は Sigma 社製、また、固相抽出カートリッジ(Sep-Pack C<sub>18</sub>)は Waters から購入した。その他の試薬は、HPLC 用または特級を用いた。

### B・2 2-OHF の HPLC 条件

カラムスイッチング HPLC による 2-OHF の分析法の概略図を Fig. 2 に示した。移動相 MP1、MP2 とともにアセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) (40/60, v/v)を用いた。まず、C1 カラム Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS, (250 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Nacalai)で粗分離した後、2-OHF の溶出位置でスイッチングバルブを Position A から B へ切り換え、C2 カラム Discovery RP-Amide-C16 (50 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Supelco)に導入した。3 分後再びバルブを Position A に切り替え、移動相 MP2 により C2 カラムから溶出させ、C3 カラム Discovery RP-Amide-C16 (250 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Supelco)に導入分離し、蛍光検出した。検出波長は 2-OHF の極大励起波長 270nm、蛍光波長 327nm とした。

### B・3 1-OHP の HPLC 条件

アセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) (55/45, v/v)を移動相として用い、分離カラム Discovery RP-Amide-C16 (250 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Supelco)で 1-OHP を分離、蛍光検出した。検出波長は 2-OHF の極大励起波長 240nm、蛍光波長 387nm とした。内部標準物質として、重水素化ピレンより酵素的に合成、精製した重水素化 1-OHP (1-OHP-*d*<sub>9</sub>)を用いた。

### B・4 PAHs の HPLC 条件

PAHs は分離カラム Inertsil ODS-P (250 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, GL Sciences)で分離し、蛍光検出した。移動相として A:水及び B:アセトニトリルを用いた。グラジエントプログラムは、0-20 分(B, 55%)、20-35 分(B, 70-80%)、35-45 分(B, 90%)、45-60 分(B, 90-100%)とした。また測定蛍光波長は、0-30 分( $\lambda_{ex}$  280,  $\lambda_{em}$  340 nm)、30-32.5 分( $\lambda_{ex}$  250,  $\lambda_{em}$  400 nm)、

32.5-35.1 分( $\lambda_{\text{ex}}$  286,  $\lambda_{\text{em}}$  433 nm)、35.1-40 分( $\lambda_{\text{ex}}$  331,  $\lambda_{\text{em}}$  392 nm)、40-68 分( $\lambda_{\text{ex}}$  264,  $\lambda_{\text{em}}$  407 nm)、68-75 分( $\lambda_{\text{ex}}$  294,  $\lambda_{\text{em}}$  482 nm)とした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 20°Cとした。内部標準物質として、重水素化 Nap (Nap- $d_8$ )、Phe (Phe- $d_{10}$ )、Pyr (Pyr- $d_{10}$ )、BaP (BaP- $d_{12}$ )を用いた。

#### B-5 2-OHF 及び 1-OHP 測定のための尿試料の前処理

被験者尿 10 mL を 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 20 mL で希釈した後、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(170 U/mL 尿)/アリルスルファターゼ(6 U/mL 尿)を添加し、37°C、2 時間インキュベートした。その後、内部標準物質を加え、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いて濃縮した。溶出液としてメタノール 10 mL を用い、溶出液を減圧乾固し、残渣をメタノール 1 mL に再溶解し、検液とした。

#### B-6 PAHs 測定のための毛髪試料の前処理

毛髪約 50 mg を 1 cm 程度に切り、メタノール及び水で洗浄した後、内部標準物質を添加し、2.5M 水酸化ナトリウム水溶液(1.5 mL)中で 2 時間インキュベートし、毛髪を溶解させた。酢酸エチル(2 mL)で 3 回抽出し、有機相を窒素ガスで乾固し、残渣をアセトニトリル 200  $\mu$ L に再溶解し、検液とした。

#### B-7 PAHs 測定のための母乳試料の前処理

母乳 2 mL に内部標準物質を添加し、シュウ酸カリウム(20 mg)及びエタノール(2 mL)を加え、ヘキサン/ジエチルエーテル(1/1, v/v)混液(2 mL)で 3 回抽出した。得られた有機相を硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧乾固し残渣を得た。残渣(脂肪)の重量を測定した後、5M 水酸化カリウム水溶液(0.6

mL)及びエタノール(2.4 mL)を加え、沸騰水浴上で 2 時間還流した。ヘキサン(3 mL)で 3 回抽出し、有機相を減圧乾固し、残渣をアセトニトリル 200  $\mu$ L に再溶解し、検液とした。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、被験者に対してインフォームドコンセントに努め、理解と同意を得た上で試料の提供を受けた。得られた結果を含め、被験者の人権には十分に配慮し、倫理面の問題はないと判断した。

### C. 研究結果及び考察

#### C-1 2-OHF 分析システムの開発

1 台のスイッチングバルブ、3 本のカラム、及び 1 台の検出器からなる 2-OHF 分析 HPLC システム(Fig. 2)で標準物質を分析したときのクロマトグラムを Fig. 3 に示した。まず、通常の ODS カラム(C1)で粗分離した後、2-OHF を 5cm のアルキルアミド型逆相カラム(RP-Amide) (C2)に選択的に吸着させ、さらに RP-Amide カラム(C3)で分離することによって、2-OHF を特異的に分離することが可能となった。検出限界は 15 fmol/injection (S/N = 3) であった。また検量範囲は 50 - 1000 pmol/injection であった。

#### C-2 ヒト尿中 2-OHF 及び 1-OHP の測定

2-OHF、1-OHP ともに、尿試料 10 mL を酵素処理した後、Sep-Pak C<sub>18</sub> による固相抽出操作を経て、上述の分析システムに適用した。2-OHF に関する代表的な尿試料のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。また、1-OHP についての代表的な尿試料のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。1-OHP は、1-OHP- $d_9$  と良好な分離( $R_s$  = 1.45)を示し、1-OHP の重水素化体が優れた内部標準物質

であることが明らかとなった。

### C・3 PAHs 摂取源としての喫煙の影響

健康人 13 名を喫煙群 4 名、非喫煙者群 9 名に分け、起床後すぐの尿 10 mL を採取してもらい、試料とした。測定結果を Table 1 に示した。喫煙者群の尿中 2-OHF 濃度は  $516.4 \pm 176.1$ 、1-OHP は  $58.8 \pm 23.5$  (mean  $\pm$  SD) nmol/mol creatinine であった。また、非喫煙者群では、2-OHF は  $172.0 \pm 114.2$ 、1-OHP は  $22.8 \pm 22.0$  (mean  $\pm$  SD) nmol/mol creatinine であった。両群を比較すると、喫煙者群で両化合物とも有意に尿中濃度が高い ( $P < 0.01$ ) ことが明らかとなった。

### C・4 毛髪中 PAHs の測定と喫煙の影響

健康人 20 名を喫煙群 6 名、非喫煙者群 14 名に分け、毛髪を後頭部から 50 mg 程度採取し、試料とした。毛髪試料について PAHs を測定したときの代表的なクロマトグラムを Fig. 5 に示す。また、20 名の定量結果について Table 2 に示した。測定した 15 種類の PAHs のうち、12 種の PAHs を定量することができた。喫煙者と非喫煙者の毛髪中 PAHs 濃度を比較すると、個人差が大きいこともあって、喫煙者群で有意に濃度が高い ( $P < 0.05$ ) 化合物は Ant だけであった。尿中への PAHs 代謝物の排泄は、半減期が短く、短期的な PAHs 曝露の指標となりうるが、毛髪中の PAHs は長期的な曝露の指標となりうると考えられた。

### C・5 母乳中 PAHs の測定

母乳から脂肪を抽出し、得られた脂肪をアルカリ分解した後、ヘキサン抽出した。1 例だけであるが、PAHs を測定したときのクロマトグラムを Fig. 6 に示した。その結果

11 種類の PAHs を同定し、9 種類について定量を行った。それぞれの PAHs の定量値は、脂肪重量あたりの濃度で、Nap (245.0 ng/g fat)、Ace (306.4 pg/g)、Phe (36.5 ng/g)、Ant (187.2 pg/g)、Flu (493.6 pg/g)、Pyr (765.0 pg/g)、BaA (408.5 pg/g)、BbF (102.1 pg/g)、BaP (32.3 pg/g) であった。

### D. 結論

- ・ 2-OHF について、粗分離のための ODS カラムと、RP-Amide カラムとをカラムスイッチングにより組み合わせることで、分析法の開発に成功した。
- ・ 開発した 2-OHF の分析法をヒト尿試料に適用するとともに、1-OHP についても同時に測定したところ、両化合物とも尿試料 10mL で定量可能であった。
- ・ 喫煙者群と非喫煙者群の尿中 2-OHF 及び 1-OHP 濃度を比較すると、それらの濃度は、喫煙者群で有意に高かった。このことから、喫煙者において PAHs の摂取量が増加していることが考えられた。また、PAHs の摂取により、生体内でエストロゲン活性を有する代謝物が生成し、尿中に排泄されていることが明らかとなった。
- ・ ヒト毛髪中に PAHs が蓄積されることが明らかとなった。喫煙による PAHs 濃度への影響はほとんど観察されなかったものの、短期的な曝露指標としての尿中 PAHs 代謝物の測定に対して、毛髪中 PAHs が長期的な PAHs 曝露の指標になると考えられた。
- ・ ヒト母乳中の PAHs の前処理法を確立し、母乳中に PAHs が存在することが明らかとなった。乳幼児への影響は問題となることから、例数を増やして継続的にモニ

タリングを行う必要があると考えられた。

#### E. 研究業績

##### 論文

1. T. Chetianukornkul, A. Toriba, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by HPLC with Fluorescence Detection Using a Deuterated Internal Standard. *J. Chromatogr. A*, in press.
2. A. Toriba, H. Nakamura, T. Chetianukornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, T. Yokoi, K. Hayakawa, Determination method of monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching HPLC. *Anal. Biochem.*, submitted.
3. A. Toriba, Y. Kuramae, T. Chetianukornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa and K. Hayakawa, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: A biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs. *Atmos. Environ.*, submitted.

##### 学会発表

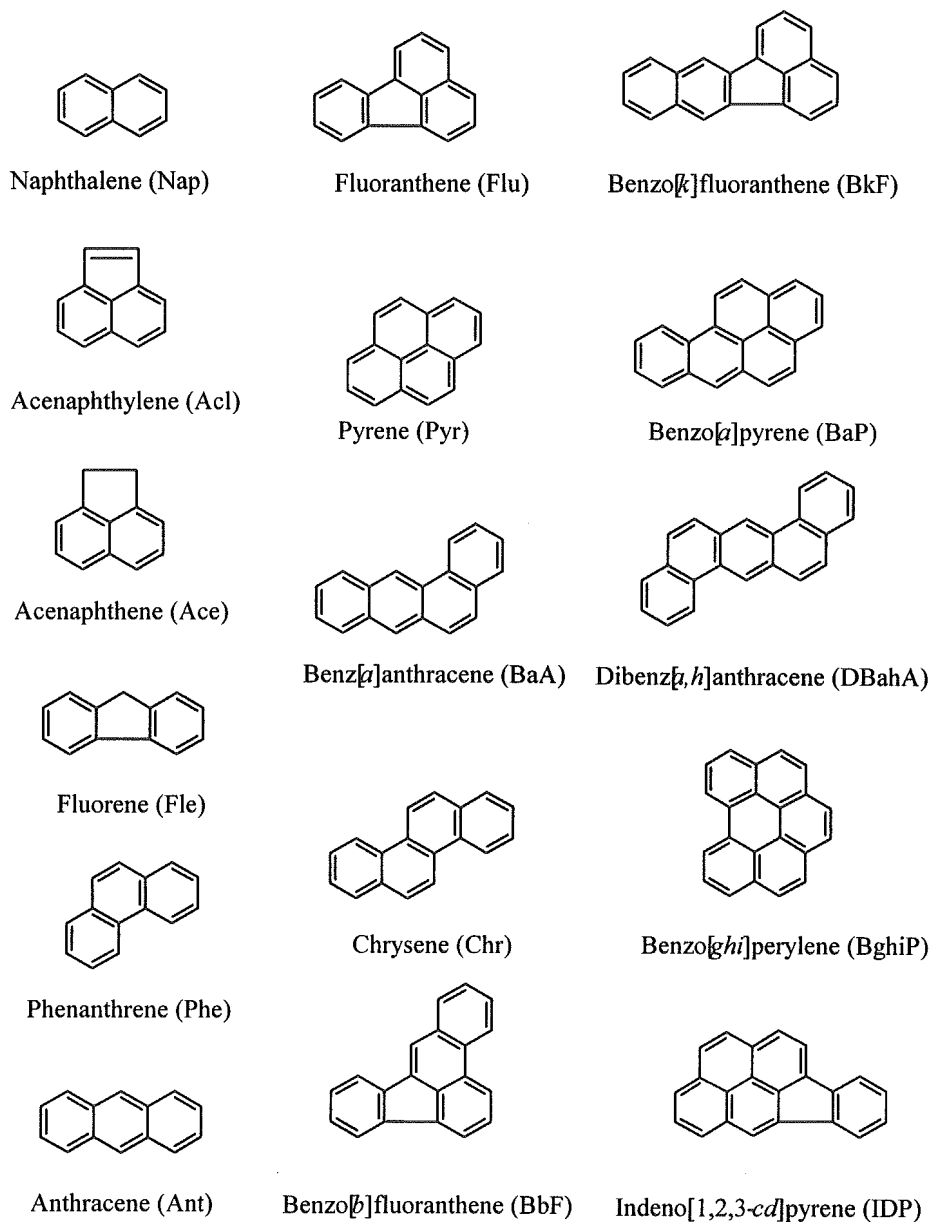
1. T. Chetianukornkul, A. Toriba, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by HPLC with Fluorescence Detection Using a Deuterated Internal Standard method. HPLC Kyoto, PW303, September, 2001, Kyoto.
2. A. Toriba, T. Chetianukornkul, R. Kizu, H. Oka, T. Makino, H. Nakazawa, K.

Hayakawa, Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) as Biomarkers of Exposure to PAHs in Cigarette Smoke, SETAC/AP Symposium 2001, PB11, November, 2001, Kanazawa.

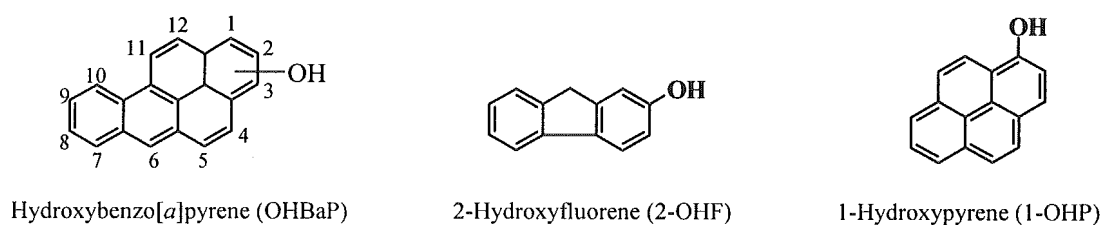
#### F. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

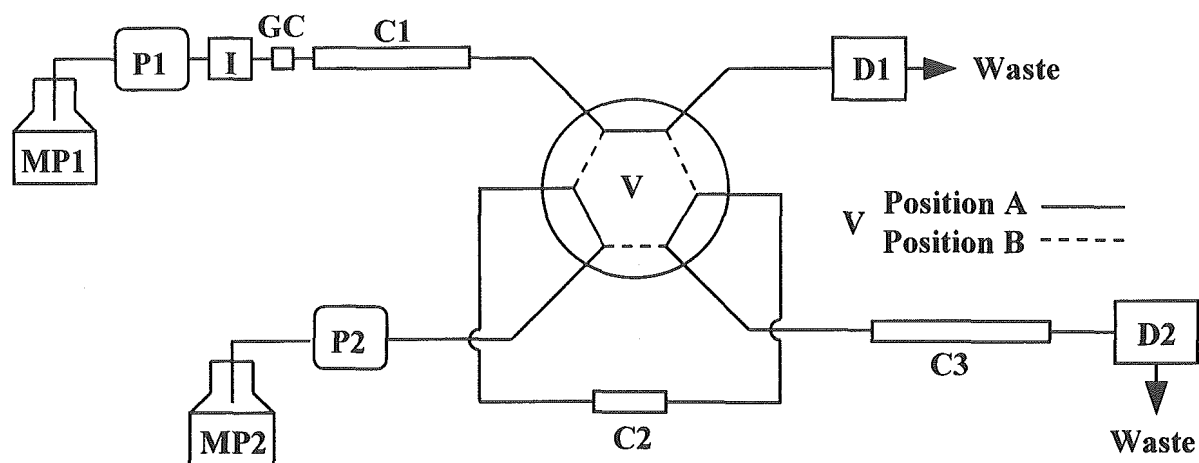
## PAHs



## PAH metabolites

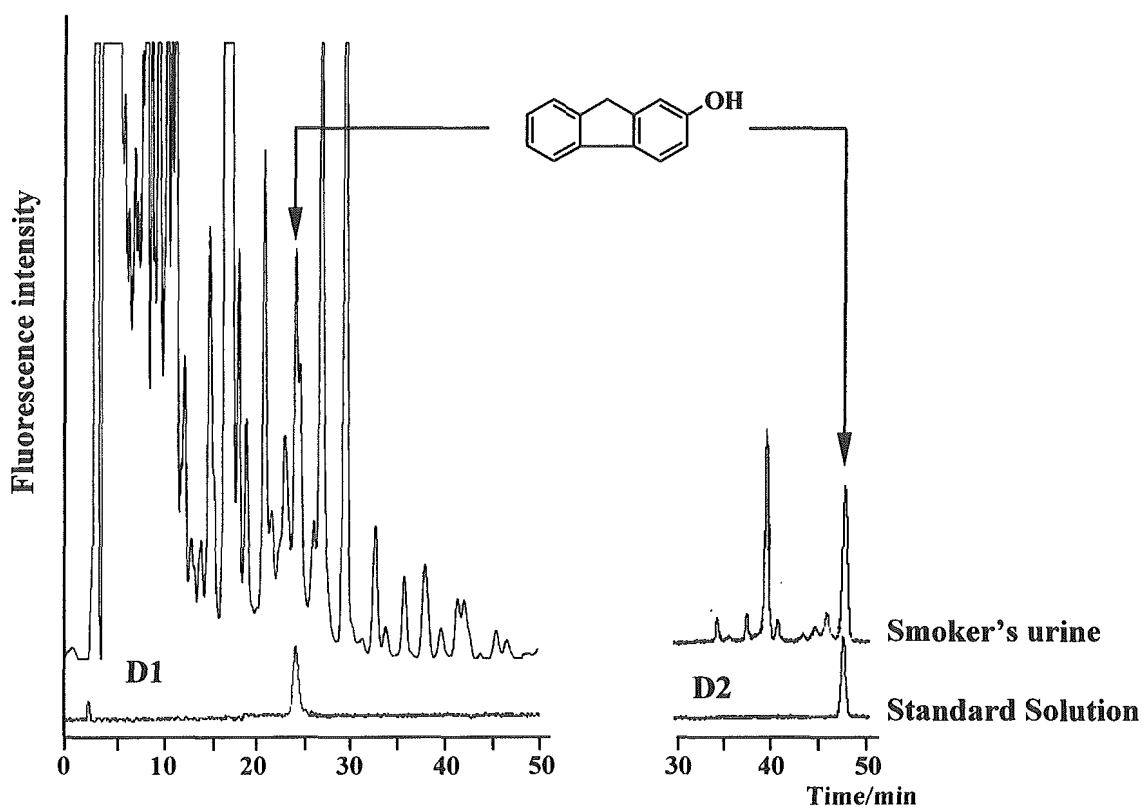


**Fig. 1 Chemical structures of several PAHs and those metabolites**

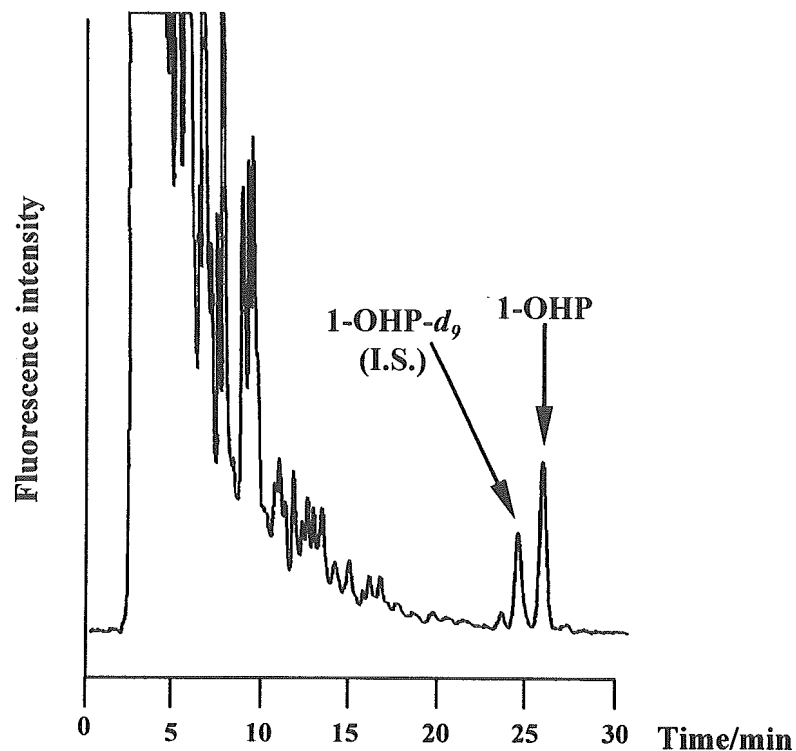


**Fig. 2 Block diagram for the determination of 2-OHF.**

I: injector, D1, D2: Fluorescence detectors, V: Switching valve, P1, 2: Pumps, Flow rate: P1; 1.0, P2; 1.0 mL/min, C1, Cosmosil 5C18-MS, 250 × 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Nacalai; C2, Discovery RP-Amide-C16, 50 × 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Supelco; C3, Discovery RP-Amide-C16, 250 × 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m; GC, Cosmosil 5C18-MS, 10 × 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Column temp.; C1, 3; 40°C, C2, Room temp, MP1, 2: Mobile phases; Acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 7)(40/60, v/v).



**Fig. 3 Chromatogram of 2-OHF in the standard solution and a smoker's urine**



**Fig. 4 HPLC chromatogram of a urine sample from a smoker.**

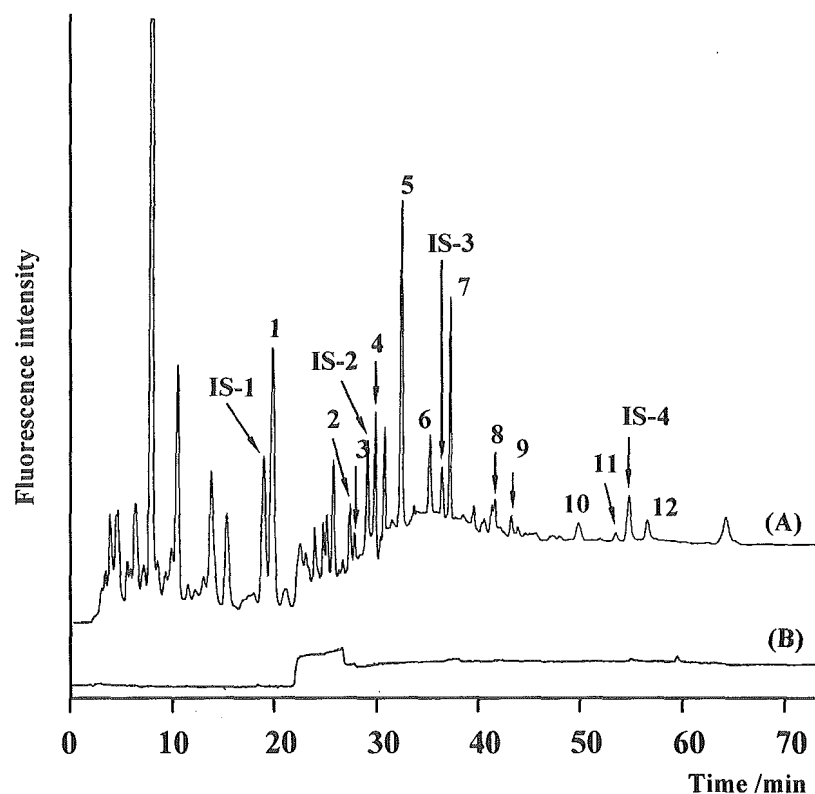
HPLC conditions: Column, Discovery RP-Amide C<sub>16</sub> (250 × 4.6 mm I.D., 5 µm, Supelco) at 40°C; Mobile phase, Acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 7.0) (57/43, v/v); Flow rate, 1.0 mL/min; Fluorescence detection,  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  387 nm.

**Table 1. Distribution of urinary 2-OHF and 1-OHP concentrations (nmol/mol creatinine) in smokers and non-smokers.**

|                                 | Smokers         | Non-smokers      |
|---------------------------------|-----------------|------------------|
| n                               | 4               | 9                |
| Mean age (y)                    | 22.6            | 32.7             |
| 2-OHF concentration (Mean ± SD) | 516.4 ± 172.1 * | 172.0 ± 114.2 ** |
| Range                           | 272.8 - 977.6   | 86.9 - 301.9     |
| 1-OHP concentration (Mean ± SD) | 58.8 ± 23.5 *   | 22.8 ± 22.0      |
| Range                           | 38.7 - 92.8     | 7.8 - 77.1       |

\* Significantly different from the value of the non-smoker group ( $P < 0.01$ ).

\*\* Except value of person who could not detected.



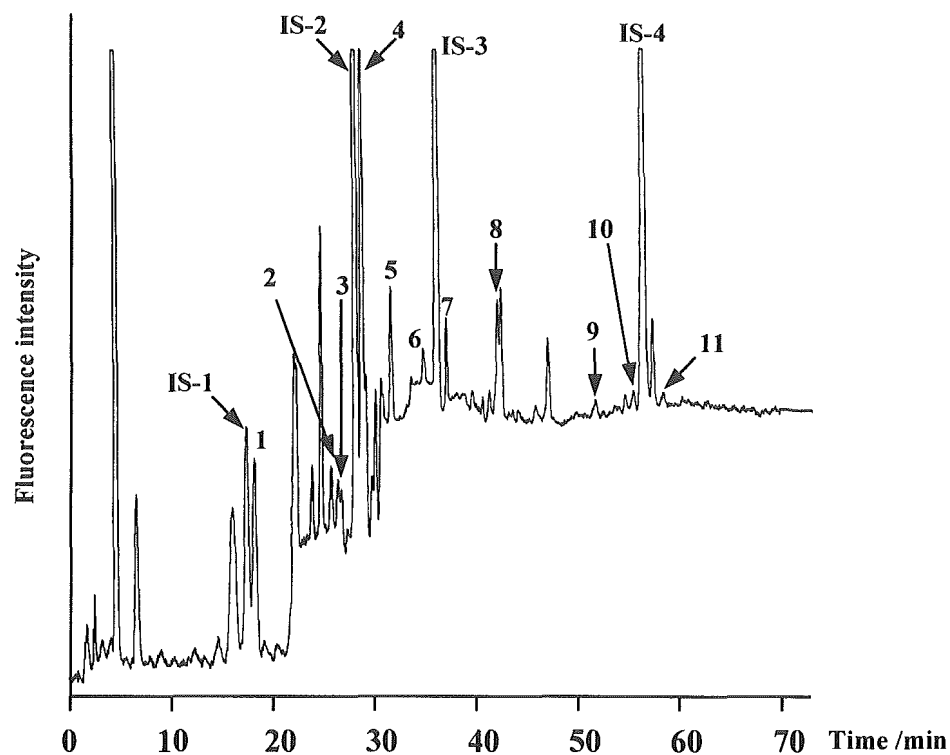
**Fig. 5 Chromatograms of (A) hair sample and (B) blank sample of pretreatment method.** Each peak of PAHs corresponds to Nap (peak 1), Ace (2), Fle (3), Phe (4), Ant (5), Flu (6), Pyr (7), BaA (8), Chr (9), BbF (10), BkF (11) and BaP (12). IS-1, IS-2, IS-3 and IS-4 indicate Nap- $d_8$ , Phe- $d_{10}$ , Pyr- $d_{10}$  and BaP- $d_{12}$ , respectively.

**Table 2 Levels of PAHs in hair on the study group** (mean  $\pm$  SD, pg mg<sup>-1</sup> hair)

| Group       | Number | Age          | Nap             | Ace           | Fle             | Phe              | Ant            | Flu             |
|-------------|--------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|
| Smokers     | 6      | 23 $\pm$ 1.2 | 1053 $\pm$ 910  | 2.3 $\pm$ 2.6 | 22.4 $\pm$ 17.5 | 126.2 $\pm$ 82.1 | 7.6 $\pm$ 7.4* | 39.3 $\pm$ 33.9 |
| Non-smokers | 14     | 30 $\pm$ 8.7 | 796 $\pm$ 563   | 3.2 $\pm$ 2.2 | 22.8 $\pm$ 14.6 | 118.2 $\pm$ 67.4 | 3.3 $\pm$ 1.6  | 41.8 $\pm$ 28.5 |
| Group       |        |              | Pyr             | BaA           | Chr             | BbF              | BkF            | BaP             |
| Smokers     |        |              | 28.7 $\pm$ 29.8 | 1.1 $\pm$ 2.1 | 5.1 $\pm$ 4.9   | 2.9 $\pm$ 7.2    | 0.5 $\pm$ 0.7  | 0.9 $\pm$ 1.4   |
| Non-smokers |        |              | 27.1 $\pm$ 21.5 | 0.9 $\pm$ 1.6 | 4.0 $\pm$ 3.6   | 0.2 $\pm$ 0.7    | 0.6 $\pm$ 1.2  | 0.7 $\pm$ 0.9   |

\*Significantly different from non-smokers ( $P < 0.05$ )





**Fig. 6 Chromatogram of breast milk sample.**

Each peak of PAHs corresponds to Nap (peak 1), Ace (2), Fle (3), Phe (4), Ant (5), Flu (6), Pyr (7), BaA (8), BbF (9), BkF (10) and BaP (11). IS-1, IS-2, IS-3 and IS-4 indicate Nap- $d_8$ , Phe- $d_{10}$ , Pyr- $d_{10}$  and BaP- $d_{12}$ , respectively.

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）分担研究報告書  
内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発と  
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

主任研究者 東海大学 牧野 恒久

分担研究者 大阪府立公衆衛生研究所 織田 肇

協力研究者 大阪府立公衆衛生研究所 堀 伸二郎, 阿久津 和彦, 北川 幹也

ヒト生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析

要旨

GC/HRMS を用いるヒト生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の高精度分析法を開発し、本分析法を用いて 1999 年に東海大学病院および岡山県で採取された母乳 13 検体を分析した。その結果、全ての試料から 2,2',4,4'-テトラブロモジフェニルエーテル (BDE-47) をはじめとする 7 種類の PBDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183) が、一部の試料から 6 種類の PBDEs (BDE-37, 66, 75, 85, 77, 138) が検出された。母乳 12 検体については脂肪あたり数 ppb レベルの PBDEs 濃度であったが、ある 1 検体 (東海大学病院, No. 39) についてはその他より 2 桁程高い PBDEs 濃度 (291ppb) であった。

また、1973, 78, 83, 88, 93, 98, 99, 2000 年に大阪府下で採取された母乳のプール脂肪 8 検体を分析し、PBDEs 濃度の経年変化を調べた。PBDEs 濃度は 1973~88 年度にかけて上昇 (ND~1.6 ppb) し、その後は概ね 1~2ppb 程度で推移した。

A. 研究目的

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) は、合成樹脂の優れた難燃剤として広く使用されてきた。しかし近年、これらは内分泌攪乱作用が疑われる残留性環境汚染物質として注目されており、特に胎児や乳幼児への悪影響が懸念されている。

我が国においても 1980 年代から累積して約 10 万トンの PBDEs が消費されてきたが、国内の PBDEs 汚染に関する研究報告はわずかであり、その実態は明らかではない。我々は前年度、ヒト生体試料の分析に先立ち、魚介類中 PBDEs の簡易分析法を開発し瀬戸内海産食用魚の PBDEs 汚染レベルを明らかにした。本年度は、乳幼児期の PBDEs 暴露実態の解明を目的として、母乳中 PBDEs の高精度アイソマー分析を行った。

B. 研究方法

B.1. 試料

1999 年度に神奈川県東海大学医学部附属病院 (以下、東海大学病院) で採取された母乳 10 検体 (No. 20, 21, 22, 25, 27, 30, 38, 43, 45), 母血

清 1 検体 (No.39) および岡山県下で採取された母乳 3 検体を分析対象試料とした。母乳試料は予め全量の脂肪を抽出・秤量後、その一部 (約 0.5g) を分析に供した。

添加回収試験用の試料には、大阪府下で採取された母乳の抽出脂肪および日本赤十字社製分画用ブラズマ (凝固因子用 C, 430mL 入, 製造番号 B 型 18-0437-157) を用いた。

また、1973~2000 年度に大阪府下で採取・冷凍保存されていた母乳脂肪 (各年度 19~35 件のプール試料) 8 検体についても分析を行った。

B.2. 試薬

PBDEs の各標準品は Cambridge Isotope Laboratories 製または Wellington Laboratories 製のものを使用した (図 1)。

B.3. 機器条件

ガスクロマトグラフは Hewlett Packard 製の HP5890 series を使用した。分離カラムは J&W Scientific 製の DB-1 (15m×0.25mm φ, 膜厚 0.25 μm) を使用した。キャリアーガスは高純度ヘリウム (カラムヘッド圧 10psi 定圧) を用い、昇温条件

は 140℃ (2min) - 10℃/min ↑ - 180℃ - 3℃/min ↑ - 220℃ - 10℃/min ↑ - 325℃ (5min) とした。試料注入はスプリットレス方式 (注入量 2μL, パージオフ時間 0-1.5min, 注入口温度 275℃) により行った。二重収束型高分解能質量分析計 (HRMS) は日本電子 (株) 製の JMS-700 を EI モード (分解能 10,000, 10% 谷) で使用した。イオン源温度およびイオン化エネルギーは各々 270℃, 38eV に設定した。

### C. 研究結果

今年度は、まずアイソトープ希釈法および GC/HRMS を用いる高精度分析法について検討を行った。母乳抽出脂肪、または分画用プラズマ (血清の代替品として使用) に PBDEs (ネイティブ 3~7 臭素化体 16 種類および <sup>13</sup>C-ラベル化 3~6 臭素化体 5 種類) を添加し、室温アルカリ分解法および多層シリカゲルカラムを用いて前処理したときの PBDEs の回収率 (補正值) は概ね 80~110%, RSD < 10% の範囲内であり、満足できるものであった (図 2, 表 1)。なお、各異性体の検出限界はブランク試験等の結果から検液中濃度 0.1ng/mL (母乳脂肪あたり濃度 0.01ppb に相当) とした。

本法を用いて、東海大学病院で採取された母乳 10 検体および岡山県で採取された母乳 3 検体の分析を行ったところ、全ての検体から図 3 に示した 7 種類の PBDEs (3~7 臭素化体) が検出された。また、その他幾つかの異性体も一部の検体から検出された。なお、東海大学病院で採取されたある母乳試料 (No.39) から、他の検体より約 2 桁高濃度の PBDEs が検出された (表 2, 図 4)。確認のため、血清試料 (8.36g) についても分析を行ったところ、同様に高濃度の PBDEs が検出され、提供者の体内汚染レベルが高かったことが裏付けられた (図 5)。これらは、海外の報告値と比較しても極めて高い値であり、原因の特定が望まれた。そこで、担当医の協力により本試料提供者の職歴、食事嗜好、使用薬剤、住環境等について問い合わせたが、返答内容から特別な暴露要因は見いだせなかった。なお、母子の健康状態には特に異常なしとのことであった。

大阪府下で採取された母乳脂肪のプール試料 8 検体を分析し、PBDEs 濃度の経年変化を調べた結果、PBDEs 濃度は 1973~88 年度にかけて著しく上昇 (ND~1.6ppb) し、その後は概ね 1~2ppb 程度で推移した (表 3, 図 6)。

なお、国内外で大量に使用されているデカ-BDE (10 臭素化物工業原体) の主成分である BDE-209 については、EI 法 HRMS で十分な感度・精度が得られないこと、また、蓄積性が極めて低く、過去に生体中から高い濃度で検出された報告例がないこと等の理由から、今回の高精度アイソマー分析においては測定対象外としたが、負化学イオン化法 (NCI) 四重極 MS を用いた予備的な分析で、試料に添加した BDE-209 および BDE-15 (4,4'-DiBDE) が図 2 の前処理過程で他の PBDEs と同様に回収されることが確認できた。そこで残っていた試験液を用いて半定量的なスクリーニング分析を試みたところ、幾つかの母乳試料から BDE-209, BDE-15 および未同定の 9, 8 臭素化体に相当するピークが検出された。ただし、いずれも痕跡量程度~脂肪あたり数 ppb 以下であり、相対的に 3~6 臭素化体以外の PBDEs の生体蓄積量はそれほど大きなものではないと推測された。母乳試料および PBDEs 工業原体中の異性体パターンの参考として、図 7 にこれらの NCI クロマトグラム例を示した。

### D. 考察

我が国では 90 年代初頭から、業界の自主規制により PBDEs の低臭素化体製品は使用されておらず、最近では蓄積性が低いオクタ-・デカ-BDE 系難燃剤についても使用が避けられる傾向にある。また、摂南大学の太田らは、最近の学会で大阪湾の魚類中 PBDEs 汚染レベルが 80 年代後半から減少傾向を辿っていると報告している。これらの背景から、今後、我が国における母乳中 PBDEs のバックグラウンド濃度が現在の数 ppb レベルから著しく上昇する可能性は低いと考えられる。一方、埋め立て処分された古い樹脂製品からの PBDEs の流出、環境中における PBDEs の挙動 (移動性、半減期、分解経路等) については不明な点が多く、汚染がどの程度

長期化するか現時点で予測することは困難である。  
従って今後も国内の母乳汚染状況を調査し、その推移を見守っていくことが望ましいと思われる。

#### E. 結論

アイソトープ希釈法および GC/HRMS を用いるヒト生体試料中 PBDEs (3~7 臭素化体) の高精度分析法を開発し、我が国における母乳汚染の現状および大阪府における母乳汚染の経年変化を明らかにした。我が国における現在の平均的母乳中 PBDEs 濃度は脂肪あたり数 ppb であり、海外の報告値と同程度のレベルであった。また、蓄積性の高い低臭素化物が自主規制される前の期間 (1970 年代~80 年代後半) では PBDEs 濃度の経年的上昇が認められたが、以降は特に著しく上昇することもなく 1~2ppb 前後で推移していることから、我が国における母乳汚染は徐々に収束の方向に向かっていると期待される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

1) 阿久津和彦, 堀 伸二郎, 臭素化ジフェニルエーテルの環境中挙動とその毒性, 第 4 回日本水環境学会シンポジウム講演集, p147, 2001 年 9 月 10・11 日, 北九州。

2) 阿久津和彦, 堀 伸二郎, 北川幹也, 織田 肇, 中澤裕之, 牧野恒久, 母乳中の臭素系難燃剤ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) 濃度について, 日本食品衛生学会第 82 回学術講演会講演要旨集, p39, 2001 年 10 月 25・26 日, 長崎。