

8. 産業起源内分泌攪乱物質の環境複合毒性検出システムの開発と動態予測モデル作成に関する研究

担当機関 経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所 山下信義
竹田さほり
齋藤隆雄
鷲見栄一

重点強化事項 リスク

研究期間 平成 11 年度～平成 15 年度
研究予算総額 273,154 千円

- (1)-A 環境中 EDs の精製・純化法の開発
- (1)-B 難揮発性内分泌攪乱物質の高性能分析法の開発
- (1)-C 生化学的 EDs 毒性検出試験法の開発
- (1)-D ホルモン感受性培養細胞を用いた Eds 作用評価法の開発
- (2) 内分泌攪乱物質動態予測モデルの作成

(1)-A 環境中内分泌攪乱物の精製・純化法の開発

研究の背景と目的

外因性内分泌攪乱物質(以後Eds : endocrine disrupters)などの実環境中の化学物質は常に複雑な混合物として存在するため、危険性評価も混合物として行われる傾向にあるが、内容不明な混合物のリスク評価自体非現実的であり、複雑系の環境分析に適した高度精製・分離測定手法の開発と、それと有機的に結びついた毒性評価試験系が必須である。本研究では、複雑系の環境分析化学的研究を可能にする、新規研究手法を開拓し、実環境試料に応用する。

研究の成果

ダイオキシン類似物質の歴史的復元を行うために、東京湾柱状底質試料抽出液および淡水湖である北浦中将底質試料抽出液を用いてPCN、PCDD/DF、PCBの分析を行った。特にPCNについては初めて、簡便迅速な溶媒抽出法とdouble column-HPLC法によるクリーンアップを適用し、60種近いPCN異性体の高精度分離・分析に成功した。試料は抽出前に凍結乾燥を行い、抽出には高温・高圧下で溶媒抽出を行う高速溶媒抽出装置(ASE200、ダイオネクス社製)を用い、抽出時間短縮・省溶媒化を行った。また、抽出セル(33mL)底に活性アルミナ5gを充填し、試料中の夾雑物質を除去する選択的抽出法を用いた。抽出液はヘキサンに置換し、多層シリカゲルカラムを用いて精製・濃縮後、2種類のHPLCシステムにより精密分画を行った。まずHypercarb-HPLCによってPCBsとPCNsの分離を行った。画分1は移動相に50%ジクロロメタン/ヘキサン(順方向)を用いてPCBsを溶出し、画分2はトルエン(逆方向)を用いてnon-ortho-PCBs, PCNs, PCDDs, PCDFsを溶出した。次にPCNs画分をヘキサンに置換して100 μ Lまで濃縮した後、PYE-HPLCを用いて4分画することでnon-ortho-PCBsとPCDDs, PCDFsを分離し、PCNsについても従来法では精密測定が困難な1,2,3,4,5,7-, 1,2,3,5,6,8-HxCNs及び1,2,4,5,7,8-, 1,2,4,5,6,8-HxCNの異性体別分析を可能とした。

その結果、東京湾柱状底質中PCNの同族体別鉛直分布では、PCN総濃度は深さ14-16cmで最大値(4.4ng/g、乾燥重量当たり)を示し、その組成は深層ほど低塩素化する傾向にあった(図1)。210Pbを用いた年代査定データを用いると、これは1980年初めの高濃度汚染を示唆し、1900年代初期からPCNが東京湾周辺環境中に放出されていたことを示唆している。また、異性体別の鉛直分布はそれぞれ特徴的な組成を示した(図2)。一例を挙げると、「PCN製剤中に多量に含まれる異性体」と「PCN製剤中には存在せず、焼却場関連の放出源寄与が大きい異性体」とは明瞭に異なった鉛直分布を示した。

同様に、北浦柱状底質中 PCNs 汚染源は深さ 10cm 付近で製剤による影響は減少し、焼却起源の PCNs 割合が高くなっていると考えられ、PCNs 供給源が推移していると思われる。

さらに、代表的な内分泌攪乱物質の一種であるノニルフェノールの各成分毎の分析法を開発した。ノニルフェノール(NP)は混合体であることから複数のピークが得られるが、一般的な定量法では m/z 135 の主要な 4t ~6本のピークから NP 量を評価している。JIS 用水・排水中のアルキルフェノール類試験方法では内標準物質にフェナントレン-d10 を使用することが推奨されているが、NP は異性体により異なるフラグメントパターンを示し、異性体ごとにレスポンスファクター(RF)が異なる。そのため分離可能なすべての異性体について精度良く定量することは困難である。また、環境試料中での NP 異性体比は NP 製剤に含まれる異性体比と異なり、 m/z 135 にフラグメントを持たない異性体の含有量が多い場合には実際の NP 量より値を少なく見積もってしまう可能性がある。そこで、選択イオン m/z 107, 121, 135, 149, 163, 177, 191, 220 の TIC から確認できる主要なピークすべてについて定量する方法として外部標準法を開発した(図3)。

研究のまとめ

本研究で開発したdouble column-HPLC法はPCNsだけではなく、PCDD、PCDF、PCB異性体(理論上484種類、実試料では200種余)もの多成分高度分離に有効であり、特にリスク評価の必要な毒性異性体を完全に分離分析することが可能である。カナダ環境省が昨年から実施しているPCNs国際キャリブレーションに参加し、この分析法が有効であることを確認済みである。また、底質の抽出にASEを用いた選択的抽出法を適用したことで夾雑物質を低減し、低濃度試料の分析においても信頼性の高いデータが得られたと考えられる。

(1)-B 難揮発性内分泌攪乱物質の高性能分析法の開発

研究の背景と目的

従来法では高い分離能が得られない、極性フェノール類や熱分解性農薬などを対象としてキャピラリー電気泳動(CE)に基づく新規高性能計測法を開発する(図4)。分離特性の検証及び分離の最適化、濃縮法、質量分析法(MS)との接続について検討する。

研究の成果

内分泌攪乱作用の疑いのある物質のうち、難揮発性であるクロロフェノール類、熱分解性農薬、ビスフェノールAを含むアルキルフェノール類、およびビスフェノール類をそれぞれ代表的な系として選択し、検討を行った。クロロフェノール類についてはMSに適用可能な揮発性泳動溶液を用いて分離特性を検討した結果、1および2置換のクロロフェノールを異性体も含めて8分以内で一斉分離することができた。また、MSとの接続にCE-MSで最も一般的なエレクトロスプレーイオン化法(ESI)による自作インターフェースを用いたところ、異性体間のイオン化効率の違いが大きく6種のうち2種のみが検出されたので、液体クロマトグラフィーに用いられる大気圧化学イオン化法(APCI)のインターフェースを改造して流量を低減し試料の直接導入で比較した結果、異性体間のイオン化効率の違いを減少させることができた(図5)。オンライン濃縮ではスタッキング法により最大12倍程度感度が向上した。熱分解性農薬については、揮発性泳動溶液を用いて塩基性農薬の分離の最適化を行い、さらに一時的等速電気泳動法によるオンライン濃縮を検討した。その結果、8分以内で一斉分離が可能であり、感度は最大で27倍程度向上した。この濃縮法はCE-MSにおいても検証可能であった。ビスフェノールAを含むアルキルフェノール類については、前二者と異なりほとんど電荷を持たないため、分離材として加える界面活性剤種類や添加剤について検討した結果、硫酸ドデシルナトリウム(SDS)及び β -シクロデキストリン、メタノールの添加で最も良好な分離が得られた。オンライン濃縮法としてスウィーピング法を用いた結果10分以内で一斉分離が達成され、濃縮効率率は最大で69倍であった。ビスフ

エノール類については酸解離定数の値から泳動溶液のpHを高くしたが分離は改善されず、アルキルフェノール類と同様にSDSを用いて8分以内での一斉分離が可能であった。スウィーピング法によるオンライン濃縮では最大22倍の濃縮効率を得られた。後二者のフェノール類に関しては得られた検出下限が低く、環境試料中での濃度が比較的高いため、実試料として河川水を用いて検討を行った。用いた河川水からは直接検出することはできなかったが、添加実験では一部を除き妨害ピークもしくはベースラインドリフトの影響を受けずに測定することが可能であった。

研究のまとめ

代表的な難揮発性EDsとして、クロロフェノール類、熱分解性農薬、ビスフェノールAを含むアルキルフェノール類、およびビスフェノール類をそれぞれ選び、CEにおける分離の最適化、クロロフェノール類の系についてはMS検出のためのイオン化法、並びに各系にそれぞれ適合したオンライン濃縮法の検討を行った。その結果、いずれの系においても対象とする試料の高性能分離を達成した。また、オンライン濃縮により各試料の数～数十ppbレベルでの検出を可能とした。ビスフェノールを含む後者の2つの系については、さらに実環境水への適用性を検討した。

(1)-C 生化学的EDs毒性検出試験法の開発

研究の成果

有害化学物質の四大毒性は生殖毒性・神経毒性・免疫毒性・発ガン性といえる。神経毒性と免疫毒性を対象に、数種の内分泌攪乱物質の毒性試験法としての基礎検討を行った。神経毒性についてはラット脳組織を用い、細胞間Ca²⁺ bufferingの阻害試験とprotein kinase C (PKC) translocationを毒性指標(end point)とした。また、免疫毒性については人血液中のnatural killer細胞(NK細胞)を用い、ガン細胞に対する細胞毒性の増減を指標として測定した。

表1に神経毒性試験の結果を示す。試験対象物質は米国製PCB製剤のAroclor 1254であるが、本試験では同一製剤で異なる二種類のロットを用いた。事前にPCDFやPCN等の製剤中微量不純物質とcoplanar PCBの含量測定を行い、同一種類の製剤でありながら2378-T4CDD換算の毒性値であるtoxicity equivalent quantity (TEQ)の異なる二種類のロットを比較した。

脳組織細胞内microsomeとmitochondriaを用いた細胞間Ca²⁺ bufferingの阻害作用はロット番号による差が認められず、この生化学的反応がTEQを反映していないことが判明した。一方、PKC translocationはTEQの差を僅かながら反映していた。これにより、TEQに代表される細胞内Ah受容体を介した毒作用とそれ以外の作用がPCBの神経毒性を評価する上で重要である事が示唆された。

また、表2はnonylphenol, octylphenol, bisphenol-Aを対象にNK細胞を用いた免疫毒性試験を行った結果である。ここで興味深い結果としてoctylphenolと bisphenol-Aは単独では免疫毒性を示さないのに対し、octylphenolと bisphenol-A、またはnonylphenolとbisphenol-Aの組み合わせで同時に試験すると有意な免疫阻害作用を示した。これが相乗作用であるかどうかはさらに研究を行う必要があるが、この種の内分泌攪乱物質の免疫毒性を評価するためには単一化合物のスクリーニングだけでは不十分であると考えられる。

さらに、免疫毒性を対象に数種の内分泌攪乱物質の毒性試験法としての基礎検討を行った。これについてはNK細胞を用いる他にも、米国では感度の高い放射性元素(RI)を用いる方法がある。しかし日本国内で一般的に使用するには制限が多いため、Europiumを用いる非RI法で新規に分析法を開発した。

対象としたのは、Ziram、Metiram、Atrazine、Fenvalerate、Mirex、Halowax 1031、Halowax 1051、Maneb、Zinebである。塩素化ナフタレン製剤であるHalowax 1031、Halowax 1051はいずれも有意な免疫被害作用を示さなかったが、有機亜鉛を含む農薬の一部は強い阻害反応を示し、有機スズと同様に潜在的な内分泌攪乱

物質としての危険性が確認された。また、非 RI 法である Europium-NK 細胞試験法の有効性が確認され、RI 規制の厳しい国内でもこの試験法を一般化するための基礎データが得られた。

研究のまとめ

以上の結果から、従来は内分泌攪乱物質の主要な毒作用とは考えられていない免疫毒性と神経毒性も総合的な危険性評価を行う上で検討するべきであり、本研究で検討した試験法の有効性が確認されたといえる。

(1)-D ホルモン感受性培養細胞を用いたEds作用評価法の開発

研究の背景と目的

我々の身近には10万種類ともいわれる化学物質が存在しており、これら化学物質の内分泌攪乱作用の有無を迅速・正確に調べる試験法の開発が強く望まれている。動物個体を用いるin vivo試験法は、莫大な数の化学物質を扱うには不相当で、また動物愛護の観点からも問題がある。一方、in vitro試験法は多検体スクリーニングに適している。そこで本研究では化学物質の内分泌攪乱性を調べるための高感度in vitro試験法の開発を行った。さらに最近問題になりつつある内分泌攪乱化学物質の新たな生体影響である免疫毒性を調べるための、より簡便で効率的で多検体分析に適した手法についても検討した。また内分泌攪乱物質の生物的分解処理を行うために、プラスチック可塑剤のフタル酸エステル類、プラスチック樹脂の原材料のビスフェノールA(BPA)や非イオン系界面活性剤の原料のアルキルフェノール(NP, 4-OP)などの酵素分解法を開発した。

研究の成果

培養細胞を用いて内分泌攪乱化学物質を高感度検出するためには、無血清培養によって血清中に含まれる内・外因性エストロジェンのバックグラウンドシグナルを除く必要がある。しかし、無血清条件下では細胞死(アポトーシス)が誘導され易く、その発生抑制が不可欠である。本研究ではヒト肝ガン細胞株HepG2の高密度・無血清培養系を用いて血清中に含まれる細胞死抑制因子の探索を行った。その結果、血清セリンプロテアーゼインヒビター アンチスロンピンIII(AT-III)が細胞死抑制効果を示すことを突き止めた。AT-IIIと同様の作用は他の合成セリンプロテアーゼインヒビターAEBSF、TLCKでも認められた。これらセリンプロテアーゼインヒビターを添加した無血清培養系によって、従来よりも高感度に内分泌攪乱性を検出することが可能となった。エストロジェン感受性ヒト乳ガンMCF-7細胞にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼを導入したMVLN細胞を用い、産業起源化学物質の内分泌攪乱性を測定した。BPAにはNP, 4-OPと比較して数倍高い内分泌攪乱性を認めた。17-βエストラジオールと比較して、BPAはその約105倍の濃度10⁻⁵Mで17-βエストラジオールと同程度の内分泌攪乱性を示した。フタル酸ジエステルとその加水分解物であるフタル酸モノエステル及びフタル酸の内分泌攪乱性を調べたところ、他と比較して高い内分泌攪乱性を示したフタル酸エステルはBBPであった。MVLN細胞の化学発光強度測定による化学物質の内分泌攪乱活性評価が可能であることが示された。MVLN細胞無血清培養系へのセリンプロテアーゼインヒビター添加によって内分泌攪乱性のさらなる高感度検出が可能となる。

従来の免疫毒性試験に用いられるヒトナチュラルキラー(NK)細胞は人血から精製しなければならないため、多検体・網羅的分析には大量の新鮮血液が必要と、倫理面、安全性の面で大きな制約がある。また簡便精製ではT細胞の混入が避けられず、NK/T混合細胞によるK-562細胞融解能を評価していることになる。さらに本質的にNK細胞活性は個体差を有するため、再現性の高いデータが得にくいなどの問題点を有する。このようなNK細胞を用いることのデメリットを解決するためにヒトナチュラルキラー細胞株NK-92細胞を用いることを検討し、ヒトナチュラルキラー細胞と放射性物質⁵¹Crを用いずに、ヒトナチュラルキラー細胞株NK-92株と非放射性物質ユーロピウムを組み合わせた方法はその代替法となる可能性を明らかにした。

産業起源内分泌攪乱化学物質の分解浄化技術の開発を目指して生物的分解について検討した。フタル酸エステルの生物的分解に関する報告は少ないため、フタル酸エステル分解能を有する酵素の探索を行った。その結果、ブタ膵臓由来の粗精製リパーゼ製剤中に含まれる未知成分によって加水分解されることを見いだした(図7)。未知成分の特定を行ったところ、ブタ膵臓由来コレステロールエステラーゼ製剤にフタル酸エステル加水分解活性を見いだした。この加水分解活性はブタ膵臓由来に限定されるものでなく、哺乳動物由来のコレステロールエステラーゼであれば同様の活性を有することもわかった。次にフタル酸エステル以外の産業起源内分泌攪乱化学物質として、プラスチック樹脂の原材料のビスフェノールAや非イオン系界面活性剤のアルキルフェノールに着目し、土壌分離菌が産生するラッカーゼを用いた生物的分解について検討した。ラッカーゼによって内分泌攪乱性が疑われるBPA、NP、4-OP、2,4-ジクロロフェノールなどのフェノール性化合物、17 β -Estradiol (E2)が分解された。5mMのBPA、NPを10Uのラッカーゼと反応させたところ、BPAは約6時間、NPは約12時間でほぼ完全に分解された。さらに反応後1、24時間後の反応液中のエストロジェン活性をMVLN細胞で調べたところ、ラッカーゼによる代謝産物にはもとのBPA、NPにあるようなエストロジェン活性がないことが明らかとなり、フェノール性化合物などの内分泌攪乱物質分解にラッカーゼの酸化反応が有効であることが明らかとなった(図8)。

2) 内分泌攪乱物質の動態モデルの作成

研究の成果

粒子状有機炭素(POC: Particulate Organic Carbon)の中の一つであるデトリタス(非生物有機態粒子)を評価する方法を開発し、POC中のデトリタスの比率の実態を明らかにした。河川ではPOC中のデトリタスの比率は80%以上と高く、疎水性化学物質はデトリタスに吸着して運ばれていることが判明した。また、懸濁粒子の粒径分布の特性を把握する機器(LISST-100: Laser In - Situ Scattering Transmissometry)を導入し、生物態粒子や大型凝集態粒子(約80 μ m)が測定できることを実証した。

東京湾湾奥について沿岸生態系モデルの数値シミュレーションを行い、9月期の平均的な生態系構造が再現できた。表層ではPOC中のデトリタスの比率の単純平均は29.4%であった。図9は、POC中のデトリタスの比率の観測値および計算値と塩分との関係を示す。9月25日の観測値の単純平均は28.4%になり、計算値に近かった。しかし、塩分が低くなると観測値と計算値は大きく離れていた。

東京湾湾奥について沿岸生態系モデルと疎水性化学物質の吸着モデルを結合した数値シミュレーションを行い、ノニルフェノールの分配係数の感度解析を行った結果では、Log K_{oc}は5.30であった。従来の経験式から導かれるLog K_{oc}に比べて大きい値になっていたが、植物プランクトンの寄与が大きいためと思われる。計算された沈降物中のノニルフェノール濃度分布は、汀線近くの浅い海域で高かった(図10)。負荷流入量の多い河川から離れた市川沖や木更津沖の浅い海域に溜まった結果になっていたが、観測された堆積物中のノニルフェノール濃度は反対に低かった。堆積物中に棲む底生生物によって摂食されて減少し、その後、流れや波浪によって再懸濁し沖に移動した結果だと思われる。

研究のまとめ

東京湾湾奥を対象としたノニルフェノールの動態モデルを作成した。沿岸海域の生態系構造(デトリタス/POC=0.29)とその中におけるノニルフェノールの挙動(Log K_{oc}=5.30)について一定程度の精度で再現することができた。特に、デトリタスと植物プランクトンの沿岸生態系における位置付けや疎水性化学物質の分配機構における違いを明らかにすることができた。さらなる現地調査によって両者の役割は明確になり、より精度の良い疎水性化学物質の動態モデルが開発される。

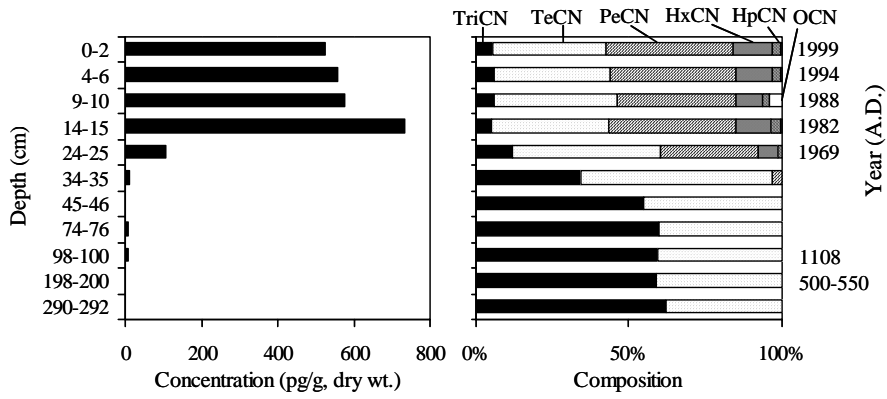


図1 塩素化ナフタレン濃度と同族体組成の鉛直分布

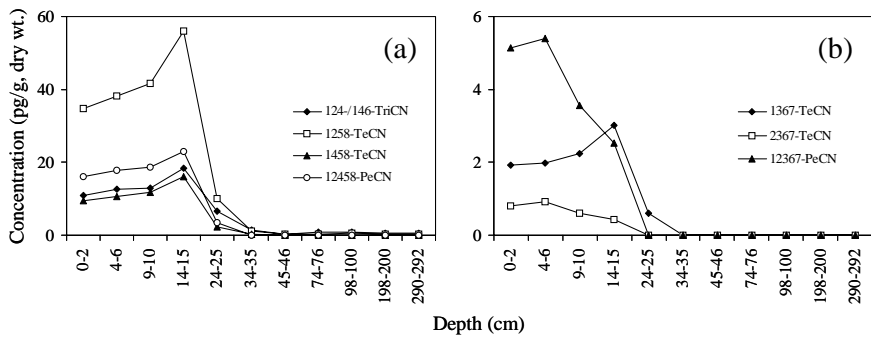


図2 塩素化ナフタレン供給源別異性体の濃度変化
(a) 製剤起源, (b) 燃焼起源

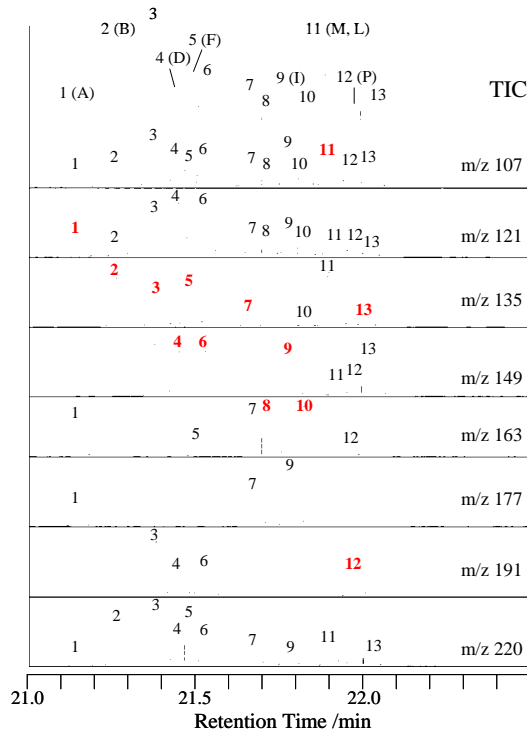


図3 NP 標準物質のマスクロマトグラム

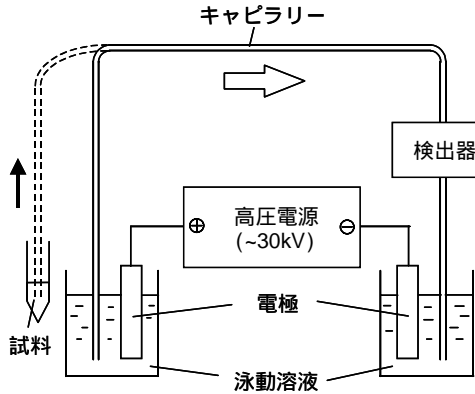


図4 キャピラリー電気泳動装置の概略

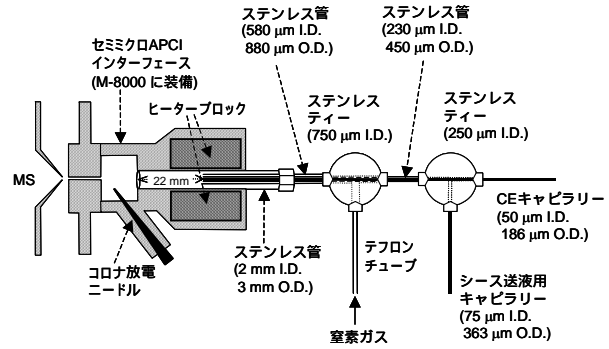


図5 改造したAPCIインターフェースの構造

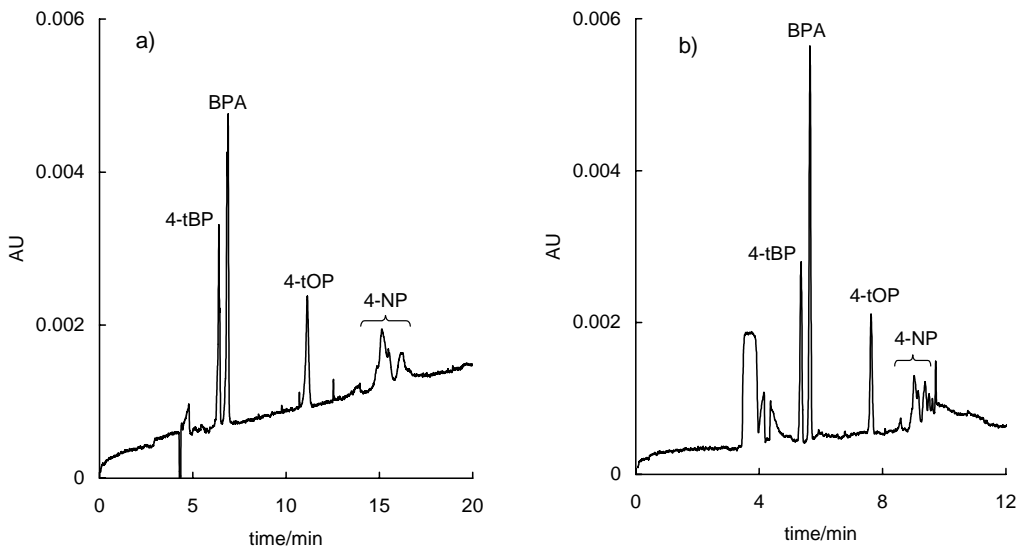


図6 ビスフェノールAを含むアルキルフェノール類のスウィーピングによるオンライン濃縮

a) 通常の試料導入(50mg/l、約 8.4nl)

b) オンライン濃縮による大量導入(1mg/l、約 340nl)

表1 Differential effects of two lots of Aroclor 1254 on intracellular Ca²⁺ buffering and PKC translocation in brain. Values represent IC₅₀s for Ca²⁺ buffering and E₅₀s for PKC translocation.

Neurochemical endpoint	Concentration (μg/ml)		TEQ (ng/ml)	
	Lot# 124-191	Lot# 6024	Lot# 124-191	Lot# 6024
Intracellular Ca²⁺ buffering (IC₅₀):				
Microsomes	1.65 ± 0.05	1.23 ± 0.05 *	0.058 ± 0.002	0.489 ± 0.019 *
Mitochondria	1.78 ± 0.07	1.47 ± 0.08	0.062 ± 0.002	0.585 ± 0.032 *
PKC translocation (E₅₀):				
	11.03 ± 1.29	28.01 ± 6.01 *	0.386 ± 0.045	11.14 ± 2.39 *

* : Significantly different from Lot 124-191 at p < 0.05. Values are mean ± SE of 4-6 experiments.

表2 Effect of individual and mixtures of nonylphenol, octylphenol and bisphenol A on human NK cells in vitro.

Compound	Treatment Concentration	Exposure period	Result
Nonylphenol (NP)	1μM	24 h	No Inhibition
NP	10μM	24 h	32 % Inhibition
Bisphenol A (BPA) *	10μM	24 h	No Inhibition
NP + BPA	10μM + 1mM	24 h	100 % Inhibition
NP + BPA	1μM + 1mM	24 h	88 % Inhibition
Octylphenol (OP)	10μM	24 h	No Inhibition
OP + BPA	50μM + 1mM	24 h	90 % Inhibition
NP	1μM	4 days	No Inhibition
NP	10μM	4 days	42 % Inhibition
OP *	10μM	4 days	No Inhibition
NP + OP	1μM + 1μM	4 days	No Inhibition
NP + BPA	1μM + 10μM	4 days	No Inhibition

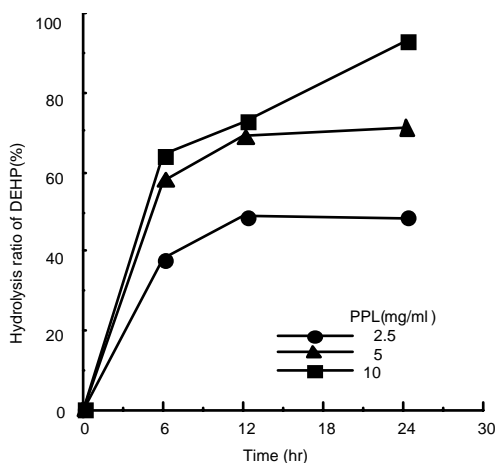


図7 ブタ膀胱由来粗精製リパーゼ製剤によるフタル酸エステルDEHPの分解 (37)

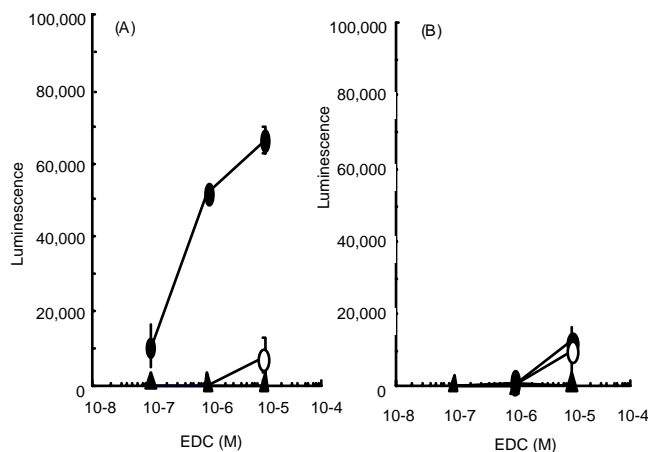


図8 1-4株由来ラッカーゼ分解産物中の内分泌攪乱活性

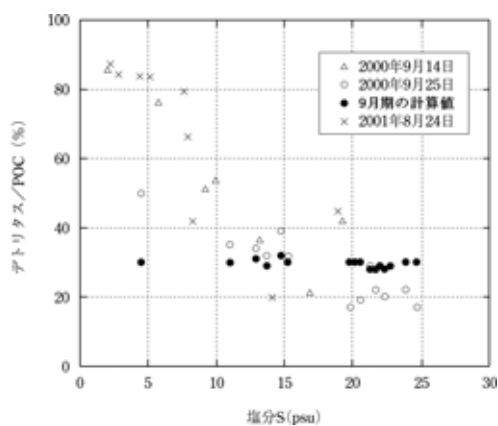


図9 POC中のデトリタスの比率と塩分の関係

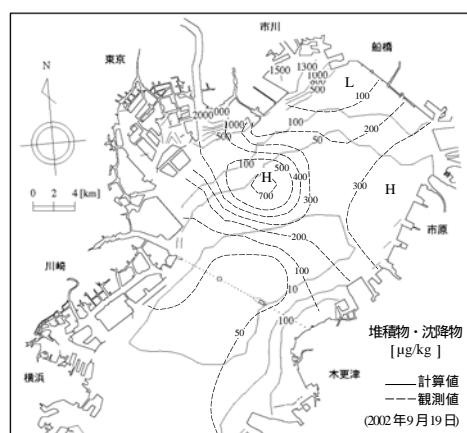


図10 東京湾湾奥における観測された堆積物中と計算された沈降物中のノニルフェノール濃度

研究発表

発表題目	掲載法 / 学会等	発表年月	発表者
(誌上発表)			
Differential effects of two lots of Aroclor 1254R: Congener analysis and neurochemical endpoints	<i>ORGANOHALOGEN E COMPOUNDS</i> , 49 , 303-306	2000.8	Kodavanti, Kannan, 山下、Yellin、Ward、Burgin、Tilson、Bimbaum
Separation of polychlorinated naphthalene isomers and dioxin-like compounds by two dimensional HPLC-system with porous graphitic carbon and pyrenyl silica column	<i>ORGANOHALOGEN COMPOUNDS</i> , 50 , 75-78	2001.9	堀井、上中、小野、岡田、今川、山下
塩素化ナフタレンによる環境汚染	環境と測定技術, 29, 68-72	2002	山下、羽成、堀井、谷保
茨城県北浦における柱状底質試料中の塩素化ナフタレン・ダイオキシン類異性体別分析	分析化学, 51, 11, 1009-1017	2002	堀井、岡田、天野、羽成、谷保、山下
Denitrification in a seashore sandy deposit influenced by groundwater discharge	<i>Biogeochemistry</i> , Vol . 63, pp.187-205,	2003	上田、Go、鈴木、鷲見
東京湾における堆積物 海水間のリンの挙動	海の研究, 第12巻、pp.501-516	2003	鈴木、國分、伊藤
キャピラリー電気泳動による環境分析	ぶんせき, No.9, 497	2003	竹田
Separation and on-line concentration of bisphenol A and alkylphenols by micellar electrokinetic chromatography with cationic surfactant	<i>J. Chromatogr. A</i> , 979, 425-429	2002	竹田、尾村、茶山、辻、福士、山根、脇だ、坪田、寺部
Separation and on-line concentration of bisphenol A and alkylphenols by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant	<i>J. Chromatogr. A</i> , 1014, 103-107	2003	竹田、尾村、茶山、辻、福士、山根、脇田、坪田、寺部
In vitro evaluation of differentiation and mineralization of osteoblasts cultured on inorganic biomaterials	<i>Archives of BioCeramics Research</i> , vol.3, pp.106-109	2003	斉藤、岡田、服部、加藤、横川

工業所有権

特許等の名称	年月日	番号
ヒト・動物細胞培養液	H12.8.11	3096737
初代肝細胞の単層シート構造体とその形成方法	H15	3435458
酵素を用いたフタル酸エステルの分解処理方法及びその処理システム	H14.3.12	2002-66492
新規な酵素ラッカーゼ, その製造方法及び該酵素を産生する微生物	H14.7.15	2002-204951