

(67) 受容体結合試験による複合試料のエストロゲン活性の評価

Evaluation of the Estrogenic Activity for Mixture of Chemicals and Environmental Samples
by the Estrogen Receptor Binding Assay

劉 乃瑞*、中西啓輔*、中川直樹*、貫上佳則*

Nairui LIU*, Keisuke NAKANISHI*, Naoki NAKAGAWA*, Yoshinori KANJO*

ABSTRACT; A wide range of chemicals are reported to have a hormonal activity. These chemicals are classified with two groups; agonist and antagonist. When we measure hormonal activity in samples which contains both agonist and antagonist such as environmental water, it's difficult to obtain the total concentrations of chemicals binding to estrogen receptor. In this paper, we tried to measure the estrogenic activity by estrogen receptor binding assay. We arranged some mixtures of single/multi-component chemicals, and applied their relationships between concentrations and inhibition ratios with sigmoidal formulas. The results of estrogen receptor binding assay gave us the total concentrations of chemicals binding to estrogen receptor even if samples contained with both agonist and antagonist. The total concentrations of these chemicals were expressed with the equivalent values of 17β -estradiol.

KEYWORDS; estrogenic activity, estrogen receptor binding assay, multi-component chemicals

1. はじめに

ヒトを含めた生物の体内でホルモンバランスを乱している可能性があると言われている外因性内分泌攪乱化学物質は、下水道分野を始め多くの領域で問題視されており、特に女性ホルモン（エストロゲン）の作用をかく乱する「エストロゲン様物質」への関心が高い¹⁾。しかし、これらの作用の有無を確認すべき物質の種類は非常に多く、また、自然界における微生物などによる代謝分解で生じる中間産物もふくめると、対象となる物質の数は膨大となり、1つ1つの物質を測定し管理していくことには自ずと限界がある。個別の物質濃度を測定するのではなく、溶存酸素を消費する物質の総量で有機物量を表示したものがBODやCODであるように、エストロゲン様物質の測定も総括的な方法が望まれ^{2), 3)}、*in vitro*の方法としてその作用メカニズムに特徴をもたせたE-Screen法やYES法⁴⁾、Two-Hybrid法⁵⁾などが開発されてきている。

一方、内分泌攪乱化学物質には、図-1に示すようにエストロゲンと同様に作用するAgonistと、図-2に示すように受容体に結合するのみでDNAの転写を活性化をしないものの本来のホルモンの受容体への結合を妨害するAntagonistが存在することが知られている⁶⁾。これまでは、エストロゲンと全く同じように作用するAgonistに注目されてきたが、Antagonistも胎児や乳児のように本来のホルモンが作用すべき時期にホルモンの作用を妨害して機能しないようにするため、Agonistと同様にAntagonistについても環境中での挙動について説明されるべきである。

環境中の試料を測定する場合、通常は複数の物質が試料中に混在していて、AgonistとAntagonistを同時に含むような試料も当然存在すると考えられる。この場合、上述のYES法やTwoHybrid法では発現したタンパク合成量を定量しているため、図-3のようにAntagonistが阻害作用を示して試料中の内分泌攪乱化学物質の総量を正しく把握できない可能性がある。

*大阪市立大学大学院工学研究科(Graduate School of Eng., Osaka City Univ.)

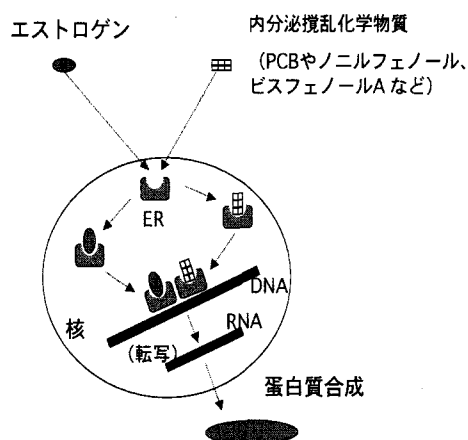


図-1 Agonistの作用機序

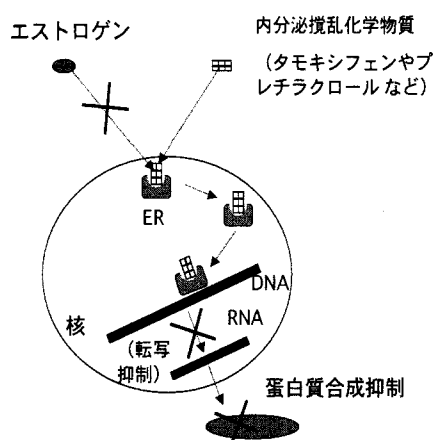


図-2 結合阻害物質 (Antagonist) の作用機序

ここで、AgonistとAntagonistに共通する作用メカニズムは、いずれも「エストロゲン受容体 (ER) に結合する」という点である。そのため、「ERに結合する物質が試料中にどの程度存在するか」という観点で試験を行えば、Agonist、Antagonist、あるいはこれらが混在する混合試料でも問題なく測定できる可能性があると考えられる。

そこで、本研究では、ERに対する競合結合試験 (ER結合試験) を実施し、本試験で試料中に含まれる「ER結合性物質」のその評価方法について検討した。具体的には、2種以上の化合物が含まれている試料に対する評価方法を提示し、Agonist活性およびAntagonist活性が疑われている試薬を混合した模擬混合試料や、環境試料に試薬を混合した試料に対してエストロゲン受容体試験を実施して評価方法の検証を行った。

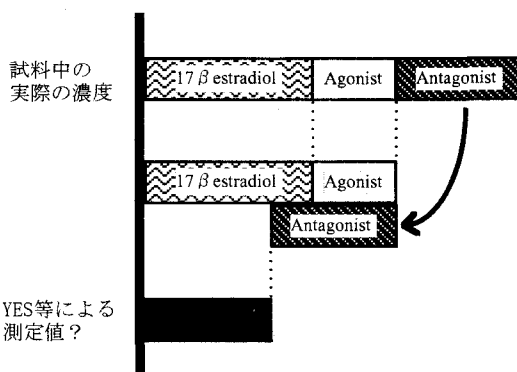


図-3 複合試料におけるYES等による測定値

2. 受容体結合試験の原理とこれによる複合試料の評価方法

2.1 蛍光偏光現象とこれを用いた受容体結合試験の原理

受容体結合試験を行うには、対象物質が受容体に結合するかどうかを判断するために、これまで放射能によるラベリングが行われており、特定の施設でしか測定することができなかったため汎用性に欠けていた。ところが、数年前に放射能の代わりに蛍光偏光現象を応用した測定方法⁶⁾が開発され、簡便に測定できるようになった。

一般に溶出中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光を当てると、蛍光物質が励起状態であつて定常状態を維持している場合、同一平面に偏光した蛍光が得られる。その蛍光の程度は、蛍光物質の溶出中での運動性、言い換えると蛍光物質の大きさに依存する。つまり溶液中では、蛍光物質が小さな分子である場合、分子の運動が活発で激しく蛍光を発して蛍光偏光が解消され、蛍光偏光度の値は小さくなる。一方、蛍光物質が大きな分子である場合は、分子の運動があまり活発でないために偏光があまり解消

されず、蛍光偏光度の値が大きくなる⁷⁾。したがって、蛍光偏光度を測定することで蛍光を発する分子の大きさに関する情報が得られ、分子の大きさの変化に基づいた反応の解析が可能となる。

この現象を応用して、蛍光をもつエストロゲン（FES1:分子量362と小さい）と試料をER（分子量が66,000と大きく、FES1と結合してさらに2量体となると分子量が約120,000となる）の存在下で図-4のように競合結合反応を起こさせてその平衡状態で蛍光偏光度を測定すれば、FES1とERとの結合状態、すなわち結合したFES1を定量することができることになる。具体的には、FES1がすべてERに結合した状態、およびFES1がERに全く結合していない状態での蛍光偏光度を測定し、試料とFES1を用いて競合結合反応を起こさせた場合の蛍光偏光度と比較すれば、試料に含まれる物質によってFES1-ER結合がどの程度阻害されかを阻害率として示すことができる。

試料中に単一の物質が含まれていてその濃度が既知の場合、試料中の物質の濃度と(1)式で算出した阻害率とをグラフ化して、結果を(2)式で示されるシグモイドカーブで回帰させることで、平衡状態に至った競合結合反応中での半数のERに対象物質が結合する場合の濃度：EC₅₀を求めることができる。ここで、(1)式中のpositive controlとは、FES1がすべてERに結合している試料であり、negative controlとは蛍光を発しないリガンド：ESIである。

そこで、標準物質として17βエストラジオール(E2)をFES1と競合結合試験を行った際のEC₅₀^{E2}を用いて、試料に含まれる物質のERへの相対的な結合親和力（RBA）が(3)式で算出できる⁶⁾。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 \cdot \frac{mP_{\text{posi}} - mP_s}{mP_{\text{posi}} - mP_{\text{nega}}} \quad \dots\dots(1)$$

mP_{posi} : positive control の蛍光偏光度

mP_{nega} : negative control の蛍光偏光度

mP_s : sample の蛍光偏光度

$$y = 100 \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + 10^k (\log C - \log EC_{50})} \right) \quad \dots\dots(2)$$

y : 阻害率 (%)

C : E2換算濃度 (nM)

EC₅₀ : 求めたい50%阻害濃度または
阻害希釈倍率

k : 係数

$$RBA = \frac{EC_{50}^{E2}}{EC_{50}} \quad \dots\dots(3)$$

EC₅₀ : 試料のEC₅₀値

EC₅₀^{E2} : E2のEC₅₀値

$$E2\text{換算濃度} = RBA \cdot C \quad \dots\dots(4)$$

C : 化合物の濃度

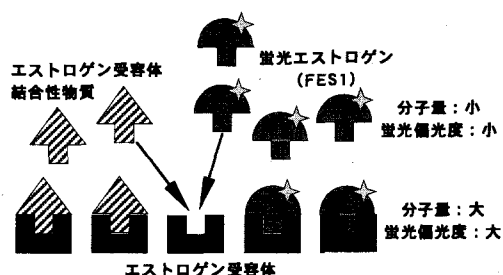


図-4 エストロゲン受容体結合試験の模式図

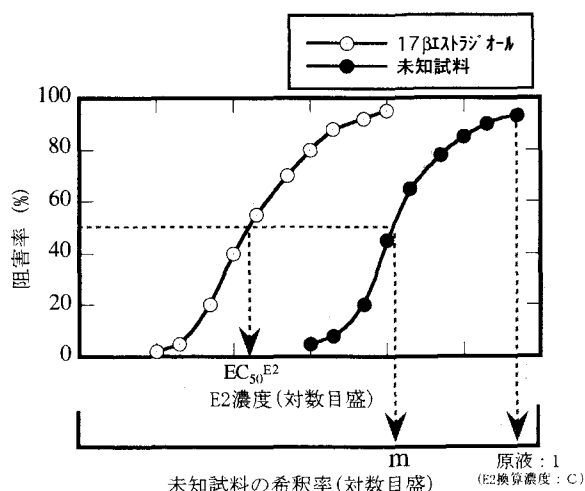


図-5 未知試料のエストロゲン活性の評価方法

2.2 未知試料のE2換算濃度の算出方法

試料に何ほどの程度含まれているかわからない未知試料の場合は、この試料を希釈することで図-5のように横軸を希釈率としたグラフを描くことができる。2.1で示したように、実験データをシグモイドカーブに回帰させることで、

横軸を希釈率とした場合の EC_{50} の値 (m) を求めることができる。ここで、 EC_{50} 値が得られる状態では、競合結合試験の結果、E2もしくは試料中のER結合性物質によって、半数のFES1がERと結合できずに存在していることを意味する。言い換えると、 EC_{50}^{E2} が得られる状態でのE2の濃度と、試料の EC_{50} が得られる状態でのER結合性物質の濃度は、ERへの結合力の点から等価であると見なせることを意味する。したがって、希釈前の試料に含まれるER結合性物質のE2換算濃度をCとすれば、試料の EC_{50} 値に相当するE2換算濃度は(5)式で表現でき、これを変形した(6)式でCの値を計算できることになる。

$$EC_{50}^{E2} = mC \dots\dots\dots(5)$$

$$\therefore C = \frac{EC_{50}^{E2}}{m} \dots\dots\dots(6)$$

C : E2換算濃度 (nM)
 EC_{50}^{E2} : E2の50%阻害濃度 (nM)
m : 試料の50%阻害希釈倍率 (-)

3. 実験方法

3.1 用いた試料とその作成方法

2.2で提案した複合試料中のER結合性物質の評価方法について検証するため、 17β -Estradiol (E2、TaKaRa Co.) と、ERに対するAgonistとしての作用を持つと疑われているBisphenol-A(以下BPAと略す、Wako Pure chemicals Co.)、4-Nonylphenol (以下NPと略す、TOKYO KASEI KOGYO Co.)、p-Nonylphenol (以下P-NPと略す、Kanto chemicals Co.)、ERに対するAntagonistとして作用することが知られているTamoxifen (以下TMと略す、Wako Pure chemicals Co.)、4-hydroxytamoxifen (以下4HTMと略す、Sigma Co.)、TetrabromobisphenolA (以下TBPAと略す、TOKYO KASEI KOGYO Co.)のうちから2種類を混合した模擬複合試料を作成した。BPA、NP、TMの中から2種類を混合する場合、各々のRBAの値を考慮して、E2換算濃度を基準として、混合比率を5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5の7段階、計21種類の模擬試料を作成した。また、BPA、NP、TM、4HTM、あるいはTBPAのうちのどれかとE2を、E2換算濃度を基準として1:1, 1:3, 3:1の3段階の比率で混合し、DMSOに溶解させて合計15種類の模擬試料を作成した。

さらに、n種類の物質が混合された試料として、A下水処理場の流入下水(試料R)、最初沈殿池流出水(試料S)、及び流入下水を塩化鉄(III)と高分子凝集剤を用いて凝集沈殿処理した試料水(試料P)をスポット採水して用いた。この試料を公定マニュアル⁹⁾などを参考にして、図-6に示す手順に従って固相抽出法により濃縮した。まず、試料をガラス繊維濾紙(東洋濾紙、GS25)でろ過し、濾別された固形物は濾紙ごとアセトン10mLとメタノール・酢酸混合液(v/v, 1:9) 10mLで超音波処理して抽出し、ろ液と混合した。これをpH調整後、固相カートリッジ(Nexus, Varian Co.)とフロリジルカラム(Varian Co.)を用いて300~1000倍に濃縮・抽出後、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略す、Wako Pure chemicals Co.)に転溶した。加えて、試料Pに対して、E2、BPA、NP、TM、4HTM、あるいはTBPAをE2換算濃度を基準として等濃度になるように混合した5種類の模擬試料(n+1種類

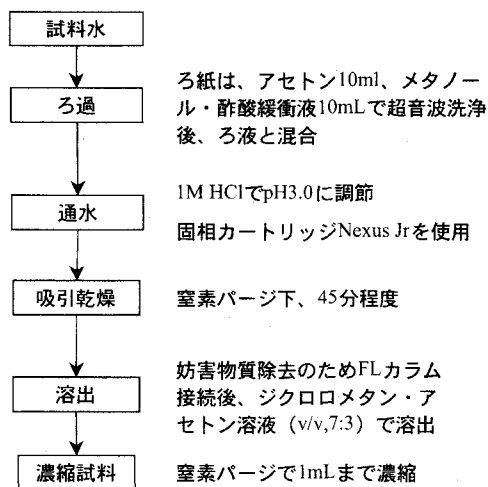


図-6 下水試料の濃縮手順

の物質の混合試料)を作成した。

3.2 受容体結合試験の実験方法とE2換算濃度の算出方法

試料中のエストロゲン様物質を測定するために、3.1で作成した試料をDMSOで数段階に希釈した希釈試料を用意して、この希釈試料1μℓに49μℓのBuffer (EDC Assay Kit, PanVera Co.)を添加し、さらに組み換え体ヒト・エストロゲン受容体 (hER-α、分子量: 66,000) とFES1との複合体を50μℓ加えて25℃で1時間静置して競合結合反応を起こさせ、蛍光偏光度計 (Full-Range Beacon 2000, PanVera Co.)を用いて励起光波長: 360nm、蛍光波長: 520nmで蛍光偏光度を測定した。また、positive control (FES1とhER-αとの複合体50μℓに50μℓのBufferを加えたもの) とnegative control (10μℓのFES1に88μℓのBufferとDMSOを2μℓを加えたもの)も蛍光偏光度を測定し、2-1および2-2で示した方法で、試料中のER結合性物質のE2換算濃度を求めた。なお、コンピュータソフトPrizmを用いて非線形最小自乗法によりEC₅₀値を求めた。

4. 結果と考察

4.1 各単独物質のEC₅₀値とRBA値

図7に、E2、BPA、NP、TMのみの受容体結合試験結果を、図8に、4HTM、P-NP、TBPA受容体結合試験の結果を示す。一部、ばらつきが大きいデータも見られたが、いずれの曲線も典型的なシングモイド曲線を描くことがわかる。ただ、本来ならば低濃度では阻害率が0%に漸近し、高濃度では100%に漸近するはずであるが、E2や4HTM等のように、0%あるいは100%に漸近していないデータも観察された。これは、後述の2種混合試料や下水試料などでも一部のデータにそのような傾向が見られた。この場合は、データを無理に(2)式に回帰させるのではなく、データの傾向からそれぞれ最小値と最大値に漸近するように回帰させた非線形最小自乗法の計算を行い、その結果に基づいてEC₅₀値を求め、(3)式に従ってRBA値を算出した。その結果を表1に示す。表-1から、hER-αへの結合親和力は、BPA < TBPA < P-NP < NP < TM < 4HTMの順に大きくなり、結合親和力の最も弱いBPAではE2の1/4000程度であり、逆に最も強い4HTMではE2の0.87倍もの強さであることがわかる。また、それぞれの曲線の立ち上がり ((2)式における係数:k)は各々の試料で異なり、特にTBPAは係数の値が大きくなった。

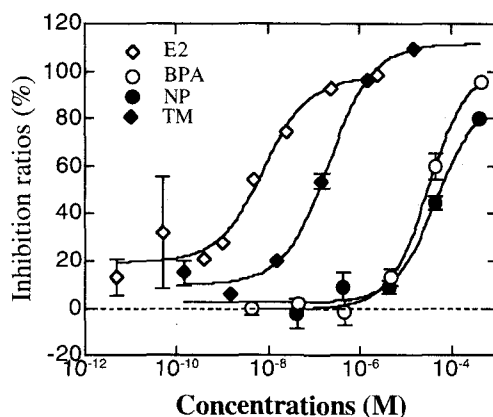


図-7 純物質のみの受容体結合試験結果1

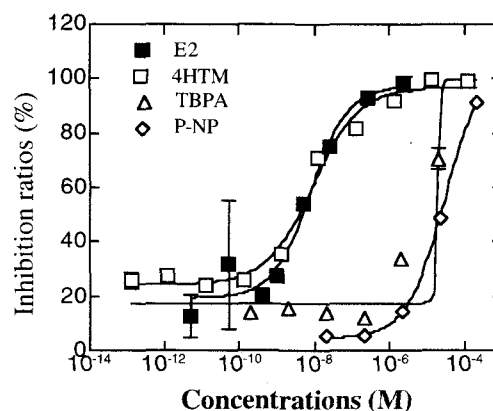


図-8 純物質のみの受容体結合試験結果2

表-1 各化合物のEC₅₀値とRBA値

Chemicals	EC ₅₀	RBA
E2	7.93nM	1
BPA	31800nM	0.000249
NP	4740nM	0.00167
P-NP	5290nM	0.00150
TM	208nM	0.0381
4HTM	9.13nM	0.869
TBPA	19300nM	0.000411

4.2 2種類の化学物質を混合した模擬試料に対する受容体結合試験結果

図-9～図-11に、BPA、NP、あるいはTMのうち2種類を混合して作成した模擬試料に対するエストロゲン受容体結合試験の結果の一部を示す。この場合、未知試料の測定を行うことを想定して、3.1で記載した混合比率で2種類の化合物を混合した原液を作成し、これを模擬の未知試料と見なして、この原液をDMSOで希釈して一連の希釈系列試料を作成し、エストロゲン受容体結合試験で得られた各々の希釈系列試料の阻害率をグラフ化したものである。そのため、各グラフの横軸は模擬試料（原液）に対する希釈率で表現している。図-11ではカーブの立ち上がりが見え、図-9や図-10では混合比率によってカーブの立ち上がりが見え、図-10では阻害率が0%あるいは100%以外の値に漸近する傾向を示すものもあった。

同様に、E2にBPA、あるいはNP、TM、4HTM、TBPAを混合して作成した模擬試料による結果を図-12に示す。この場合のいずれの模擬試料でも、希釈率に対して阻害率がシグモイド曲線を描くことがわかる。

4.3 下水試料とこれに化学物質を混合した模擬試料に対する受容体結合試験結果

図-6の手順で濃縮した下水処理場の流入下水（試料R）と最初沈殿池流出水（試料S）、および流入下水を凝集沈殿した処理水（試料P）のエストロゲン受容体結合試験の結果を図-13に示す。これらの試料で

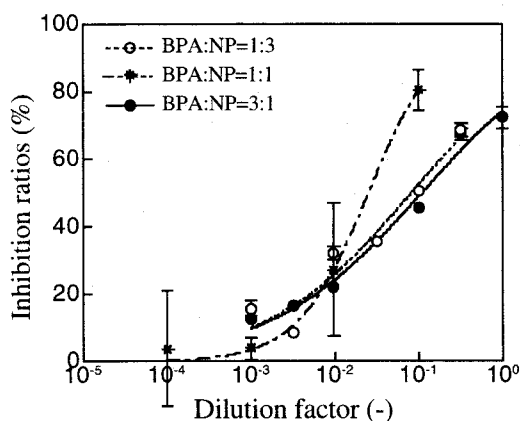


図-9 BPAとNPとを混合した模擬試料の受容体結合試験結果の例

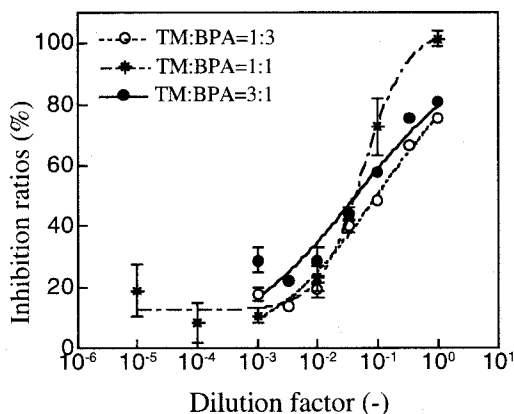


図-10 TMとBPAとを混合した模擬試料の受容体結合試験結果の例

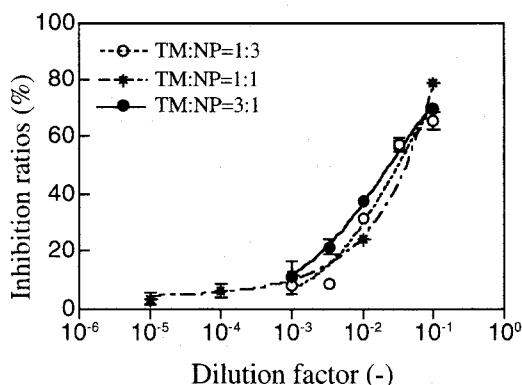


図-11 TMとNPとを混合した模擬試料の受容体結合試験結果の例

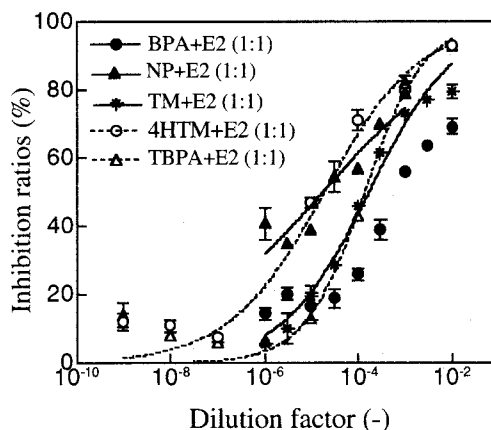


図-12 E2と各物質とを混合した模擬試料の受容体結合試験結果の例

も、4.2で示した2種の化学物質を混合して作成した模擬試料と同様に、希釈率に対してシグモイドカーブが得られた。3つの試料ともに、低濃度側で0%に漸近する結果が得られたが、試料Pでは高濃度側で100%までには至らず、やや低い濃度で飽和する傾向が見られた。

そこで、これらの実験結果に対して、2.2で示した方法によって試料中のE2換算濃度を算出した。その結果、試料R、試料Sおよび試料PのE2換算濃度は、それぞれ2300、400、および5800ng/Lであった。今回の試料は3.1で述べたようにコンポジットサンプルではなく、ある時刻に同時に採水したスポット採水で得られた試料であったため、各々の値を比較して下水処理過程に対する考察することはできない。しかし、同じ試料に対してELISA法（E2 ELISAキット、武田薬品工業(株)）で測定したE2濃度は各々11、8.1、および10ng/Lであり、このE2濃度は受容体結合試験で得られたE2換算濃度の0.17～2.0%に相当することがわかった。

次に、下水試料のうち、試料PにE2、NP、あるいは4HTMを混合して作成した模擬試料（n+1種類の物質の混合試料）に対する受容体結合試験の結果を図-14に示す。この場合もデータの一部が低濃度側で0%に漸近しない傾向を示しているが、いずれのデータもシグモイドカーブを描くことを示している。

4.4 E2換算濃度の実測値と計算値との比較

図-9～図-12で用いた試料は、複数の化学物質が含まれた模擬試料であり、これらの模擬試料中における各々の化学物質の濃度が既知であるため、この濃度に表-1にまとめたRBAの値を掛け合わせると、各々のE2換算濃度を計算で求めることができる。もし含まれている化合物によるERへの結合阻害作用が相加的であるとすれば、これらを混合した試料全体のE2換算濃度は、以下の(7)式で表現することができる。

$$E_c = \sum_{i=1}^n C_i \cdot RBA_i \quad \dots\dots\dots (7)$$

E_c : E2換算計算値, C_i : i成分の濃度

同様にして、n種類の物質が含まれている試料PにE2、NP、あるいは4HTMを混合して作成した模擬試料（n+1種類の物質の混合試料）に対しても、これらの混合比率を考慮すれば、n+1種類の物質を含む模擬試料に対してもE2換算濃度を(7)式に準じた形で算出することができる。

そこで、今回用いた模擬試料すべてに対して、(7)式からE2換算濃度の計算値を求めた。一方、受容体結合試験の結果から(6)式にしたがってE2換算濃度の実測値を求めた。各模擬試料のE2換算濃度の実測値と計算値との相関を図-15に示す。

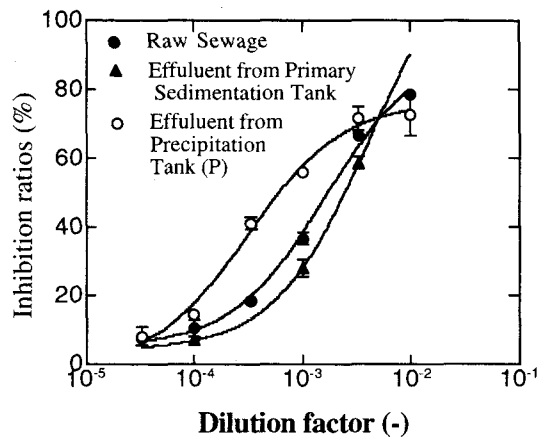


図-13 下水試料の受容体結合試験結果

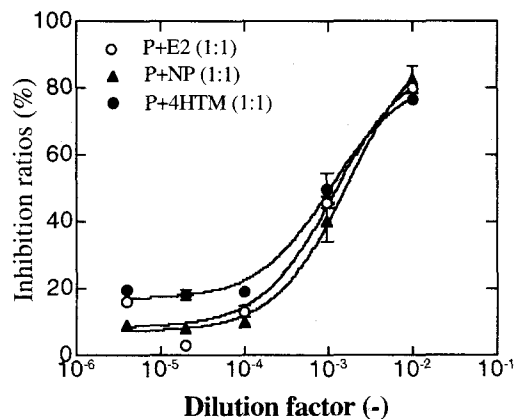


図-14 下水試料と純物質を混合した模擬試料の受容体結合試験結果

グラフから、模擬試料のE2換算濃度が 10^3 nMから 3×10^4 nMまでの間では、実測値と計算値との差が0.5 log程度の範囲内に収まっていることがわかる。実測値を求める場合、図-7～図-14に示したような横軸を対数軸としたグラフ上のデータの傾向から回帰させて求めることを考慮すると、実測値と計算値とがオーダーとしてはおよそ一致していると判断できる。上述したように、(6)式による計算値は試料に含まれている物質が相加的に影響を及ぼすと仮定した場合の値である。したがって、この結果は試料に含まれる「ER結合性物質」によるERへの結合が相加的な形で表現できることを示している。これらのデータの中には、Antagonistとして知られている4HTMやTBPAが含まれており、これらのAntagonistとE2やAgonistとを混合した試料でも相加的な結果が得られている。したがって、AgonistとAntagonistが混在する試料でも、図-3のように得られる値が低減することなく、両方の性質を含む化合物を含めた総量を受容体結合試験で把握することができることを示している。

また、この範囲には、n種類の化合物が含まれる下水試料から作成した(n+1)種類の化合物を含む模擬試料のデータも含まれていて、実測値と計算値とがほぼ一致した。実験データは限られているものの、帰納的な考え方に基づくと、化学物質が複数含まれている試料であっても、(6)式に基づいて試料に含まれる「ER結合性物質」の量をE2換算濃度として求めることができることになる。

一方、E2換算濃度が 10^3 nM以下の場合、あるいは 3×10^4 nM以上の場合では、実測値よりも計算値の方がやや大きくなる傾向がみられ、その違いは最大1 log程度、すなわち10倍程度になることがわかる。 3×10^4 nM以上の場合、互いの濃度が高くなりすぎて、相減的な影響が現れているものと見なすことができる。 10^3 nM以下の場合も実測値の方が小さな値が得られたが、図-7に示したように、E2のみの受容体結合試験の結果から、 10^3 nMでほぼ阻害率が100%が得られており、 10^3 nM以下になると、濃度に応じて阻害率が低下することがわかる。すなわち、受容体結合試験で測定する際のE2換算濃度が 10^3 nM以下になると、原液自身（すなわち希釈率:1）の阻害率が100%以下となり、原液を希釈して受容体結合試験を行っても阻害率の高いデータを得ることができず、シグモイドカーブに回帰させた場合に得られるEC₅₀の値の測定誤差が大きくなることが推測される。したがって、図-15の 10^3 nM以下の場合に実測値が小さくなった一つの原因として、本試験方法による測定上の限界が現れているのではないかと考えられる。

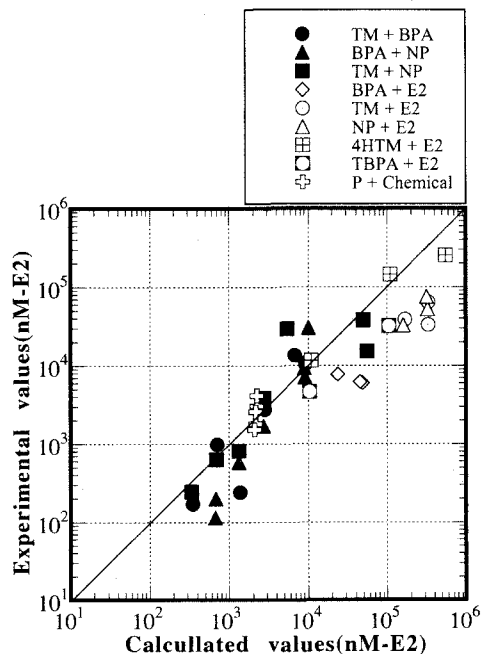


図-15 E2換算濃度の計算値と実測値との関係

5. まとめ

種々の物質が混在している環境水に対して、これらに含まれているエストロゲン様物質の総量を把握するために、蛍光偏光度の測定によるエストロゲン受容体結合試験を実施し、本試験による評価方法とその適用性を検討した。得られた結果を以下に示す。

- (1) 環境中の各種の試料のように、複数の「エストロゲン受容体 (ER) 結合性物質」が含まれている試料に対して、「ERに結合する」という観点から、これらの物質の総量をE2換算濃度として求める方法について提案した。

- (2) 代表的な化学物質を2種類混合した模擬試料と、複数の化学物質が含まれる下水試料を用いた実験から、いずれの試料でも、希釈率と阻害率（FES1のERへの阻害率）とがシグモイド曲線を描くことがわかった。
- (3) 都市下水処理場の流入下水や最初沈殿池流出水などに対して受容体結合試験を行ったところ、数百 ng/LのE2換算濃度が得られた。
- (4) 模擬試料のE2換算濃度が 10^3 nMから 3×10^4 nMまでの間では、実測値と計算値との差が0.5 log程度の範囲内であり、オーダーとしておおそ一致していると判断することができた。また、帰納的な考え方に基くと、化学物質が複数含まれている試料であっても、(6)式に基づいて試料に含まれる「ER結合性物質」の量をE2換算濃度として求められることが示せた。
- (5) AgonistとAntagonistが混在する試料でも、両方の性質を含む化合物を含めた総量を受容体結合試験で把握することができることがわかった。
- (6) 模擬試料のE2換算濃度が 3×10^4 nM以上の場合、E2換算濃度の実測値よりも計算値の方がやや大きくなる傾向がみられ、その違いは最大1 log程度であった。この理由として、試料中に含まれている化合物の濃度が高くなりすぎて、相減的な影響が現れているものと見なせた。
- (7) 模擬試料のE2換算濃度が 10^3 nM以下の場合も、E2換算濃度の実測値よりも計算値の方がやや大きくなる傾向がみられた。E2換算濃度が 10^3 nM以下になると、E2自身の阻害率が低下するため、本試験方法による測定上の限界が現れていると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、試料の濃縮方法について大阪市立環境科学研究所の芳倉太郎氏の協力を得た。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 井口泰泉：水環境と水生動物への内分泌攪乱物質の影響、水環境学会誌、Vol. 22, No. 8, pp. 636-642, 1999.
- 2) Joachim Payne, Nissanka Rajapakse, Megan Wilkins, and Andreas Kortenkamp: Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens, Environmental Health Perspectives, Vol. 108, No. 10, pp. 983-987, 2000.
- 3) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み替え酵母を用いた下水中エストロゲンの測定、環境工学研究論文集、Vol. 36, pp. 199-208, 1999.
- 4) E. J. Routledge and J. P. Sumpter: Estrogenic Activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., Vol. 15, pp. 241-248 1996.
- 5) 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、西原力、森田昌敏：酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発、環境化学、Vol. 10, No. 1, pp. 57-64, 2000.
- 6) Randall Bolger, Thomas E. Wise, Kerry Ervin, Scott Nestich and William Checovich: Rapid Screening of Environmental Chemicals for Estrogen Receptor Binding Capacity, Environmental Health Perspectives, Vol. 106, No. 9, pp. 551-557, 1998.
- 7) 例えば、阿南功一、紺野邦夫、田村善蔵、松橋通生、松本重一郎：基礎生化学実験法4、物理化学的測定（Ⅱ）、丸善、1975.
- 8) 建設省都市局下水道部：下水道における内分泌攪乱化学物質調査マニュアル、2000.
- 9) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査マニュアル、1998.