

酵母Two-hybrid法を用いた環境試料のエストロゲン様活性 評価に関する研究

鎌田素之* 平野景子** 大野雪子*
亀井翼* 眞柄泰基*

Modified Yeast Two-hybrid Assay to Evaluate the Estrogenic Activity of Environmental Samples

Motoyuki KAMATA*, Keiko HIRANO**, Yukiko OHNO*,
Tasuku KAMEI* and Yasumoto MAGARA*

* Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita13 Nishi8, Kita-Ku, Sapporo, 060-8628, Japan

** Current affiliation: SUIDO KIKO KAISHA, LTD.

Abstract

A number of bioassays for screening the compounds for estrogenic activity have been proposed so far, however, a yeast two-hybrid system appears more simple and inexpensive assay with high repeatability. The biggest problem of this bioassay is that it cannot measure estrogenic activity in some of the environmental samples. As it was assumed that the co-existing compounds were responsible for these false negatives, two methods were tested:

1. Separation of such co-existing chemical interferences by use of liquid chromatographic method.
2. Masking the retarding effect of such co-existing chemicals interferences by the addition of S9mix.

The results indicated that both methods were effective to identify the estrogenic activity, however, the addition of S9mix was much more simple to conduct and more effective to determine the estrogenic activity in environmental samples.

Key words: endocrine disruptors, bioassay, yeast two-hybrid assay, S9mix, estrogenic activity

1. はじめに

近年、水環境中において生物の内分泌系の働きを攪乱する化学物質、いわゆる内分泌攪乱化学物質(EDCs)の存在が明らかとなり、様々な報告がなされている¹⁾。このような内分泌攪乱作用を評価する手法として様々なバイオアッセイが用いられているが、この中でも*in vitro*試験は操作が簡便かつ迅速であるといった理由から、化学物質あるいは環境試料の評価に幅広く用いられている。このうち、西川らによって開発された酵母Two-hybrid法^{2), 3)}は試験生物として酵母を用いる試験法で、細胞を用いる他の*in vitro*試験と比べても、操作が簡便で、廉価であり、高い再現性が得られることから多くの研究機関で利用されている。しかし、本法は蛋白質間の相互作用を検出する原理に基づいており、元来、化学物質のスクリーニング的な位置づけで開発された試験法である。そのため、環境試料等へ適用した際には、試料中に共存する物質の影響が考えられfalse negativeな結果を示す他、阻害

作用が認められるといった問題点がある⁴⁾。環境試料の持つエストロゲン様活性発現の阻害作用の低減には固相カートリッジ等を用いたクリーンナップ⁵⁾、有機溶媒を用いた液-液抽出⁶⁾が報告されており、これ以外にも高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)を用いた試料の分画によりエストロゲン様物質を分離する方法やMasking剤による阻害作用の低減が考えられる。本研究では環境試料の持つエストロゲン様活性の発現の阻害作用についてまず検討し、HPLCを用いた分画によりエストロゲン様活性を発現する画分とエストロゲン様活性の発現を阻害する画分についての検討を行った。さらに、Masking剤としてS9mixによる阻害作用の低減について検討を行った。S9mixは*in vitro*試験においては生体内における一連の反応を考慮できないため、Ames試験等において化学物質の代謝活性化を考慮するため用いられている哺乳類の肝ホモジネートである⁷⁾。そのため、阻害作用の低減効果だけでなく、内分泌攪乱化学物質の代謝活性化の評価についても期待できる。そこで、酵母Two-hybrid法の

* 北海道大学大学院工学研究科 〒060-8628 札幌市北区北十三条西8丁目

** (現職 水道機工株式会社)

特徴である試験法の簡便さを損なうことなく、S9mixを添加した試験系の確立と、S9mixによる阻害作用の低減効果について検討を行った。

2. 方 法

2.1 実験に供試した試料

化学物質として、17 β -Estradiol (以下E2), Estrone, Estriol, Diethylstilbestrol, Bisphenol-A (以下BPA), *p*-Nonylphenol (以下NP), Methoxychlor, Benzo(a)pyrene, Di-2-ethylhexylphthalate, 4-n-Nonylphenol, Tributyltin chloride, Pentachloro-phenol, *p*-chlorophenol, Genistein, Phenol, *p*-Nitrophenol, Paraquat, Manzeb, Coumestrol, Coumestrin, MicrosystinRRの21種について試験を行った。環境試料として、札幌市近郊3カ所の下水処理場の二次処理流出水, 生活排水の流入する2カ所の河川水, パルプ工場からの排水が認められる河川水, フミン質を多く含む泥炭地水の計7種の環境水を試料として用いた。

2.2 試料の調製と前処理

化学物質はDimethylsulfoxide (以下DMSO)もしくは精製水に溶解させ、これを順次希釈したものを酵母Two-hybrid法の試料とした。環境試料については、予め溶媒で洗浄したガロン瓶に採水し、ガラス繊維濾紙(GF/B Whatman社製)を用いて濾過を行った。さらに、予めDichloromethane (以下DCM) 10ml, Methanol (以下MeOH) 10ml, 精製水 20mlでコンディショニングしたSep Pak C18 Plus (Waters社製)にSep Pak Concentrator (Waters社製)を用い通水し、精製水で洗浄後、窒素気流下で5min以上乾燥させた後、DCM 20mlで溶出した。これを、減圧乾固後、DMSOに転溶したものを段階的に希釈し酵母Two-hybrid法の試料として用いた。また、1本のSep Pakへの通水量は1.5l以下となるように濃縮を行った。

2.3 エストロゲン物質の濃度測定

環境試料中のエストロゲンの濃度測定には、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (以下ELISA法)による17 β -Estradiol ELISA キット及びEstrogen ELISA キット(共に武田薬品製)を用い定量を行った。

2.4 試料の調製と前処理

エストロゲン様活性の測定には、酵母Two-hybrid法を用いた。この方法は、エストロゲンレセプター及び共役転写因子の発現遺伝子とレポーター遺伝子として β -galactosidaseを組み込んだ酵母を用い、SD培地200 μ lにあらかじめ一晩前培養した酵母懸濁液50 μ lと試料2.5 μ lを添加し、30 $^{\circ}$ C, 4hrの培養を行い、酵母内に産生された β -galactosidaseの活性を吸光度によって測定し、これをエストロゲン様活性とするものである。本論文では、すべて試験系に添加した試料の濃度及び濃縮倍率で表記した。酵母Two-hybrid法によって得られたすべてのエストロゲン様活性値は陽性対照として用いたE2の最大活性に対する比活性値で表記した。また、比活性値が10以上認められた場合にエストロゲン様活性が認められたと判断した。

2.5 エストロゲン様活性の測定

酵母Two-hybrid法にエームステスト用 S-9/コファクターAセット (オリエンタル酵母社製) (以下S9mix)を添加する試験系 (以下+S9系)の確立を試みた。確立に当たっ

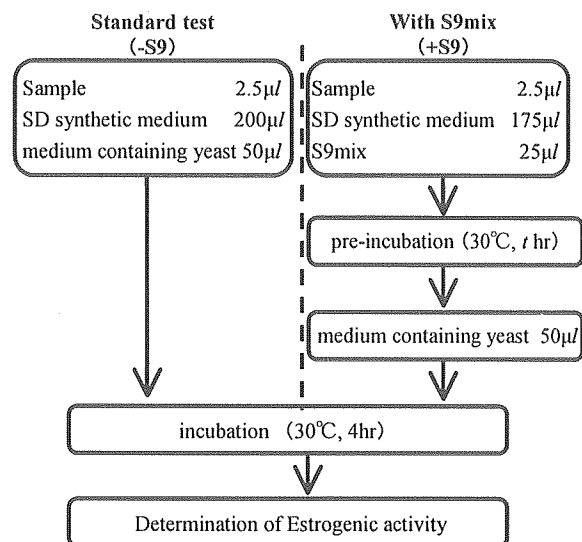


Fig. 1 Flow diagram summarizing the procedure for assessing estrogenic activity

ては、S9mixの添加量と反応時間についての検討を行った。従来の方法に大幅な変更を加えることなく最も効率的に試験を進める事を考え、酵母Two-hybrid法における培養(30 $^{\circ}$ C, 4hr)とS9mixとの反応を同時に行うこととし実験を進めた。そのために、培養溶液中のSD培地量を減少させ、代わりにS9mixを添加する方法について検討し、S9mixの反応に関与する因子として、添加量および反応時間に関して検討を行った。実験のフロー図をFig. 1に示した。検討に際し試験物質としてE2, 河川水及び下水処理水を用い、S9mixの添加量について、試験系の0%, 5%, 10%および20%(volume)の4条件で検討を行った。培地量の減少による影響を見るため、S9mixの代わりに精製水を加える実験も行った。また、反応時間に関しては、酵母Two-hybrid法における培養に先立って、プレインキュベーションを行い、S9mixによる反応時間が最大48時間となるようにし、反応時間とエストロゲン様活性の関係について検討を行った。

2.6 環境試料のエストロゲン様活性阻害作用

酵母Two-hybrid法における環境試料の阻害作用の検討として、各濃縮倍率の試料と 1.0×10^{-6} M E2 2.5 μ lを混合し、エストロゲン様活性の測定を行い、 1.0×10^{-6} M E2単独の活性と比較することで、環境試料がE2のエストロゲン様活性発現に与える阻害作用について検討を行った。

Table 1 Operational condition for HPLC

Instrument	HP1100 (HEWLETT PACKARD)
Column	Hypersil BDS-C18 (4.0 \times 250mm,5 μ m)
Mobile phase	A: Water B: Methanol B:0% (0min)-100%(10min)-100%(40min)
Flow rate	0.2ml/min
Oven temp.	40 $^{\circ}$ C
Injection vol.	60 μ l
Detector	Diode Array Detector

2.7 HPLCを用いた試料の分画

環境試料中のエストロゲン様活性を示す物質とこれを阻害する物質の特性を把握するためHPLCによる分画を行った。HPLCの分画条件をTable 1に示す。試料を注入後、0.4mlの溶出液を1フラクションとし、40分間運転を行い、20フラクションに分取した。その後、各フラクションの溶媒は窒素気流下で乾固させてDMSOに転溶し、50000倍濃縮試料として、各フラクションについてエストロゲン様活性の測定およびその阻害作用の測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 環境試料のエストロゲン様活性阻害作用

まずELISA法により測定した環境試料中に含まれるE2濃度とこれらの試料が示すエストロゲン様活性との関係をFig. 2に示した。その結果、試験に用いた環境試料中のE2濃度はすべて酵母Two-hybrid法においてエストロゲン様活性を発現するに十分なE2が存在していることが確認された。しかし、Fig. 2から分かるように、明らかにエストロゲン様活性が認められたのはA下水処理場二次処理水のみで、これ以外の試料については、エストロゲン様活性の発現に十分なE2が存在しているにもかかわらず、エストロゲン様活性が認められない、いわゆるfalse negativeな結果が得られた。そこで、これらの環境試料がエストロゲン様活性の発現に与える阻害作用について検

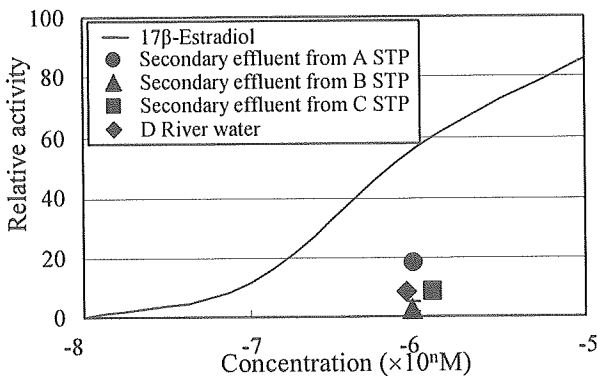


Fig. 2 Effect of E2 on estrogenic activity for environmental water samples STP: sewage treatment plant.

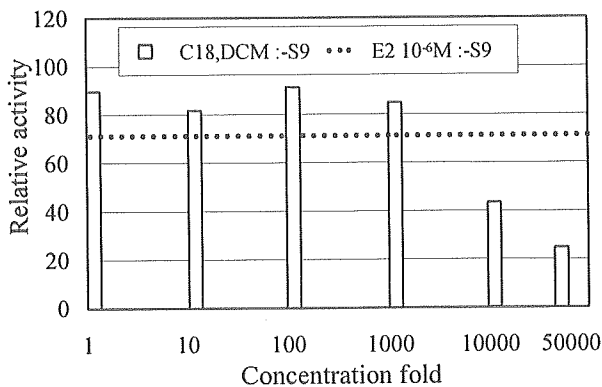


Fig. 3 Decrease in relative estrogenic activity in secondary effluent from 'B' sewage treatment plant with increase of concentration fold C18: Sep Pak C18, DCM: dichloromethane, E2: 17β-Estradiol

討を行った。その結果の一例をFig. 3 に示した。試験したすべての環境試料において濃縮倍率が高まるにつれて、E2のエストロゲン様活性の発現に対する阻害作用が強まる傾向が認められた。また、Fig. 3のように、試料によっては、最高濃縮倍率である50000倍において、比活性値が40%以上も抑制される結果となり、環境試料中には何らかの形でエストロゲン様活性の発現を妨げる作用を有していることが確認された。このことより通常の試験系において得られたエストロゲン様活性は試料に共存する物質の影響で、適正に評価できていない可能性が考えられ、何らかの改良を加える必要がある。

3.2 環境試料のHPLCを用いた分画による阻害作用の低減

環境試料にはエストロゲン様活性を阻害する作用が認められたため、各試料を、HPLCを用い分画し、それぞれのフラクションについてエストロゲン様活性の測定、および阻害作用の確認を行った。結果の一例をFig. 4に示した。HPLCを用いた分画により、エストロゲン様活性の発現に十分なE2の存在が確認されているにもかかわらず-S9系においてエストロゲン様活性が認められなかったB下水処理場二次処理水でもエストロゲン様活性が認められた。このことは、HPLCを用いた分画などによりエストロゲン様物質とそれを阻害する物質群が分離され、阻害作用の低減が可能であることを示している。さらに、分画によって活性が認められた試料のエストロゲン様活性は全てフラクションNo.12において発現してい

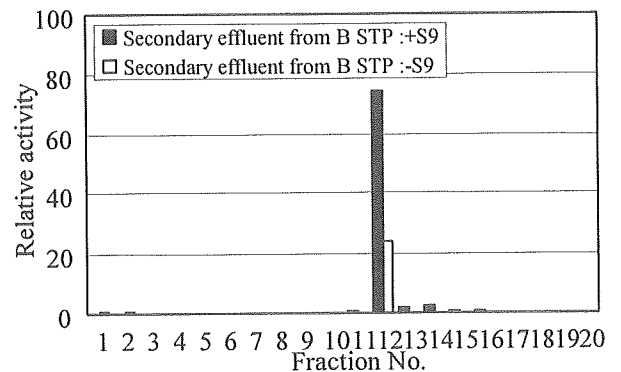


Fig. 4 Effect of S9mix on the estrogenic activity for chromatographically separated fraction STP: sewage treatment plant 1fraction: 40μl

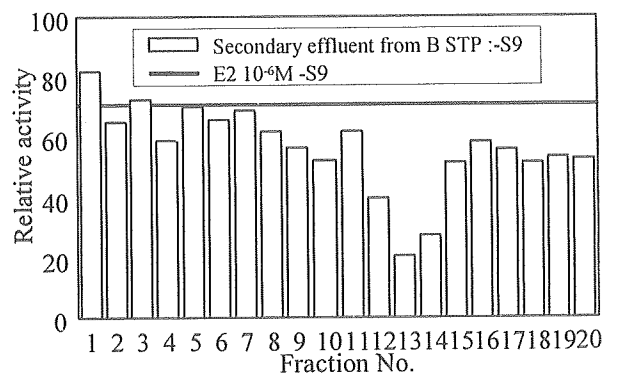


Fig. 5 Estrogenic response of chromatographically fractionated secondary effluent spiked with 10⁻⁶M E2

た。このフラクションはE2, BPA, NPを同様の条件で分画した際、E2およびBPAについてエストロゲン様活性の発現が認められたフラクションであり、Diode Array Detectorによる測定結果からもこのフラクションにこれらの物質が分離されることが明らかとなっている。このことから、HPLCを用いた分画により、フラクションNo.12でエストロゲン様活性を示す物質群はE2またはBPAに起因するもしくは、これらの物質と疎水性順位が非常に近い物質によって発現していることが示唆された。さらに、各フラクションにおける阻害作用の結果の一例をFig. 5に示した。この結果を見ると、-S9系において、Fig. 4に示したようにエストロゲン様活性が発現したフラクションNo.12付近でエストロゲン様活性が抑制され、エストロゲン様活性発現の阻害作用が認められた。この現象は他の全ての環境試料においても認められた。このことは、エストロゲン様活性の発現を抑制する物質群は、疎水性順位がエストロゲン様活性を発現する物質と非常に類似していることが考えられ、HPLC等による前処理では阻害物質の除去が不完全であることを示しており、さらに適切な阻害作用の低減が必要である。

3.3 S9mix添加最適条件の検討

次にS9mixによる阻害作用の低減を試みるために、まず、試験物質としてE2を用い、S9mixの添加量のちがいでエストロゲン様活性発現パターンの違いについて検討を行った結果をFig. 6に示した。5%の添加量では、S9mixによる作用は不十分であったが、10%および20%の場合、両者の活性パターンは非常に類似しており、添加量による違いは認められなかった。S9mixの添加量を増やすことは培地量を減少させることになり、酵母の増殖ひいてはエストロゲン様活性の発現への影響が懸念される。S9mixの代わりに試験系の10%量の精製水を加えて、実験したところ、通常の試験系と違いが認められなかったため、この添加量において培地減少の影響は認められないとして、本研究では試験系の10%量のS9mixを添加して、試験を行うこととした。また、反応時間に関しては、4hrの反応時間でエストロゲン様活性の発現濃度が高濃度側に移動する現象が認められ、その後、時間の経過とともに活性は徐々に低下していく傾向が認められたが反応時間の変化によりエストロゲン様活性には大きな変化は認められなかった。このことより、S9mixとの反応時間を酵母Two-hybrid法における培養時間である4hrとすることで、S9mixの作用は十分に発現しているとし、酵母Two-hybrid法の培養と併せてS9mixによる反応を行った。これにより、従来法にほとんど変更を加えることなく、S9mixを添加した試験系を確立できた。E2に関してはS9mixの代謝によりエストロゲン様活性の発現濃度が高濃度側に移行し、Fig. 6には示されていないが、濃度レベルが 10^{-5} Mでは、S9mixを添加した際のE2の最大比活性値は、S9mixを無添加の際のE2の最大比活性値よりも、わずかに高くなる傾向を示した。また、本法を実際に21種類の化学物質に適応し、S9mixがエストロゲン様活性に与える影響について検討を試みた。その結果、S9mixの添加により、エストロゲン様活性に有意に上昇が認められたものはFig. 7に結果を示したMethoxychlorのみであった。MethoxychlorのS9mixによるエストロゲン様活性の代謝活性化はDehal SSらによって報告されており⁹⁾、本法

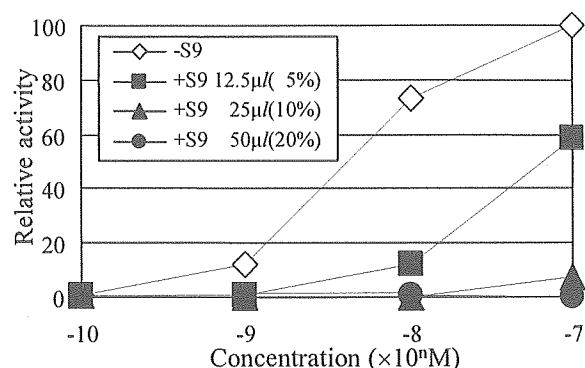


Fig. 6 The effect of volume of S9mix on the estrogenic activity induced by E2 (incubation: 30°C, 4hr)

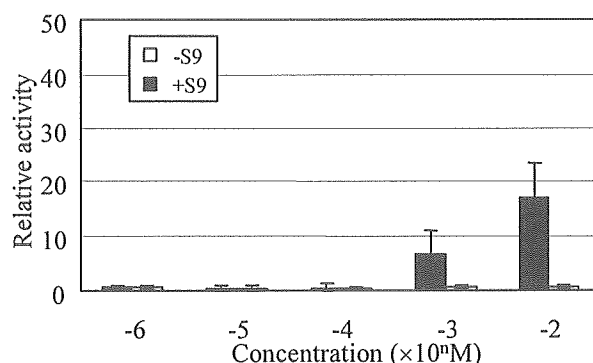


Fig. 7 The effect of addition of S9mix on the estrogenic activity induced by Methoxychlor

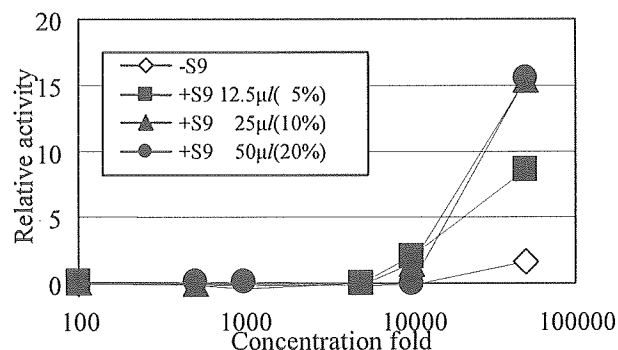


Fig. 8 The effect of volume of S9mix on the estrogenic activity induced by environmental water sample (river water) (incubation: 30°C, 4hr)

の試験結果はこの報告とも合致することから、S9mixの作用を十分に発現し、エストロゲン様活性の代謝活性化の評価に対して有用であることが示された。さらに、環境試料についてもS9mixの添加量の違いによるエストロゲン様活性発現パターンの違いについて検討を行った結果の一例をFig. 8に示した。その結果、-S9系ではエストロゲン様活性が認められなかったこれらの試料でも、S9mixの添加により、エストロゲン様活性の発現が認められ、共にE2で検討を行った場合と同様にS9mix添加量10%において、最大のエストロゲン様活性を示した。そのため化学物質だけでなく、環境試料についても添加量10%においてS9mixの作用が十分発現し、何らかの形で阻害作用の低減もしくは代謝活性化により、S9mixがエス

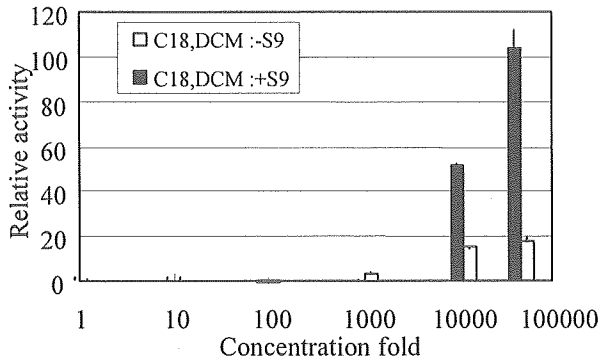


Fig. 9 Estrogenic responses of secondary effluent in the presence and absence of S9mix ('A' sewage treatment plant) C18: Sep Pak C18, DCM: dichloromethane

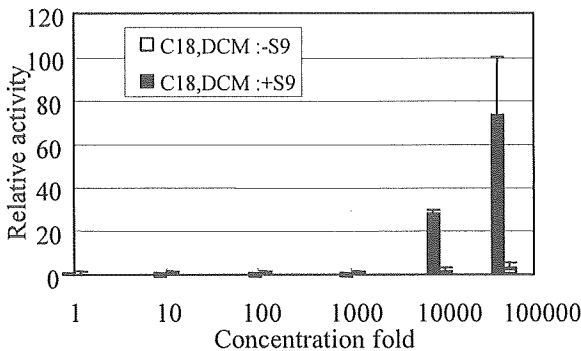


Fig. 10 Estrogenic responses of secondary effluent in the presence and absence of S9mix ('B' sewage treatment plant) C18: Sep Pak C18, DCM: dichloromethane

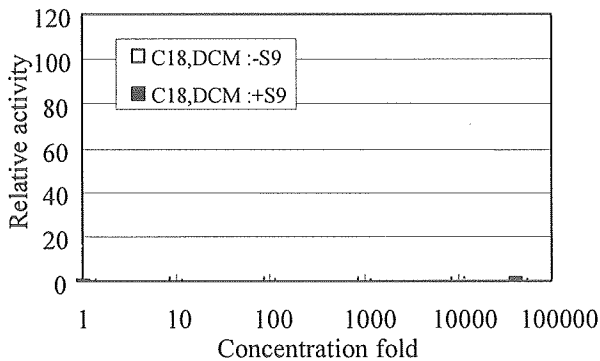


Fig. 11 Estrogenic responses of 'D' river water sample in the presence and absence of S9mix C18: Sep Pak C18, DCM: dichloromethane

トロゲン様活性の発現に作用していることが明らかとなった。

3.4 S9mixを用いた環境試料の阻害作用の低減化

この結果を受けて様々な環境試料について本法を適応し、環境試料のエストロゲン様活性の評価を行った。数例をFig. 9~Fig. 11に示す。-S9系においてA下水処理場二次処理水でのみ活性が認められたが、+S9系においては、-S9系で活性が認められなかった試料でも、非常に高いエストロゲン様活性を示し、最も高かったものはFig. 9に示したように陽性対照であるE2と同程度のもので存在した。また、活性が認められた場合はすべて、-S9系に比

べ+S9系の方が高いエストロゲン様活性を示した。このことはS9mixが環境試料のエストロゲン様活性の発現に有用であることを示している。また、先にHPLCを用いて分画した試料にも+S9系の試験を適応したところ、活性の発現が認められたフラクションにおいては、すべて-S9系に比べ+S9系の方が高い活性を示した。これは環境試料をHPLCによる分画を行わず、段階希釈をした試料の場合と同じ傾向であり、HPLCによる分画だけでは阻害作用を示す物質群の分離は十分ではなく、S9mixの作用によりさらに阻害作用が低減されたためと考えられる。このようにS9mixの添加によりエストロゲン様活性が増加した原因として：1. Methoxychlorの場合に認められたようなS9mixによる化学物質の代謝活性化、2. S9mix中の成分が環境試料に認められた阻害作用を低減したことなどが考えられる。

3.5 S9mixの阻害作用低減のメカニズム

そこで、環境試料においてS9mix添加によりエストロゲン様活性が上昇した原因を明らかにすべく、Table 2に示したようにS9mixの組成を変化させて添加し、エストロゲン様活性の測定を行ったところ、-S9系以外のすべての試験系ではエストロゲン様活性の発現が認められ、これらの活性には有意な違いは認められなかった。加熱変成させたS9mixを添加した+inactivated S9や補酵素を添加しないS9mixを添加した+S9-cofactorにおいても-S9系に比べ活性が上昇したことから、S9mix添加による環境試料のエストロゲン様活性の上昇はS9mixによる代謝活性化によるものではないと考える。そのため、環境試料に

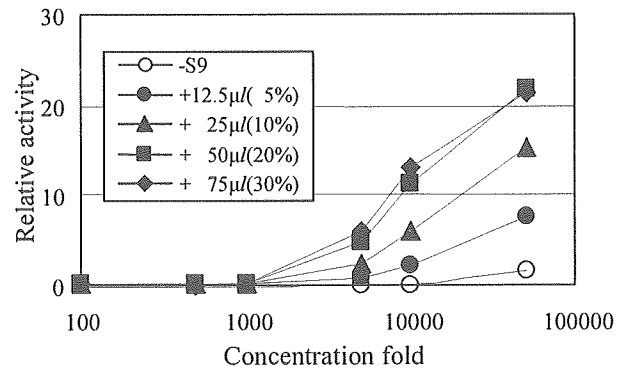


Fig. 12 The effect of volume of co-factor (-coenzyme) on the estrogenic activity induced by environmental water sample (river water) (incubation: 30°C, 4hr)

Table 2 The effect of composition of S9mix on induction of estrogenic activity (river water) All relative activity are induced at concentration fold 50000. buffer: phosphate buffer

	Composition	Relative activity
-S9	without S9mix	1
+S9	S9 + cofactor (coenzyme+buffer+KCl+MgCl ₂)	13
+inactivated S9	inactivated S9 + cofactor (Thermally) (coenzyme+buffer+KCl+MgCl ₂)	11
+S9-coenzyme	S9 + buffer+KCl+MgCl ₂	10
+cofactor	cofactor (coenzyme+buffer+KCl+MgCl ₂)	14
+buffer	buffer+KCl+MgCl ₂	10

においてエストロゲン様活性が上昇した原因はS9mix中のNADPH, NADH, G6Pを除くco-factor溶液(以下co-factor(-coenzyme))による影響が大きいと考え、その添加量を変化させて、環境試料のエストロゲン様活性を測定した結果をFig. 12に示した。この結果、環境試料にco-factor(-coenzyme)を添加しただけでも-S9系に比べエストロゲン様活性の上昇が認められた。また、先に示したFig. 6においてS9mixの添加量を変化させた場合の環境試料のエストロゲン様活性と比較すると、co-factor(-coenzyme)を添加した試験系の方が+S9系に比べ高い比活性を示した。さらに、+S9系では最大濃縮倍率である50000倍濃縮時にのみで活性を示したが、co-factor(-coenzyme)を添加した系では、さらに低い濃縮倍率でもエストロゲン様活性が認められた。このことは、環境試料のエストロゲン様活性におけるE2の寄与が大きいこと、およびE2にS9mixを添加した実験結果から考え併せると、S9mixを環境試料に添加することは、co-factor(-coenzyme)による環境試料の阻害作用の低減による活性の上昇とS9mixの代謝作用によるE2の活性低減との複合効果によるものと考えられる。co-factor(-coenzyme)を添加することにより阻害作用を低減する原因物質としては、酵母Two-hybrid法においてエストロゲン様活性の発現を阻害すると報告がある⁹⁾環境試料中に存在する一部のフミン質が考えられる。試験系の10~20%のco-factor(-coenzyme)を添加することで、環境試料に認められた阻害作用は低減され、false negativeな結果が得られることはなくなった。これは、フミン質が酵母あるいはエストロゲン様物質に凝集もしくは吸着するのをco-factor(-coenzyme)中の成分が阻止することにより、結果として環境試料に認められた阻害作用が低減したものと考えられる。また、co-factor(-coenzyme)を添加した試験系と+S9系で得られたエストロゲン様活性値を比較することで、環境試料の代謝活性化についても検討できる可能性が示された。本法は先に示したHPLCによる分画や有機溶媒を用いた液-液抽出、固相カートリッジを用いたクリーンナップに比べ非常に簡便な方法であり、酵母Two-hybrid法の特徴の一つである簡便さを失うことなく環境試料のエストロゲン様活性の評価を行う有用な手法であると考えられる。

4. ま と め

酵母Two-hybrid法を用いた、環境試料の内分泌攪乱作用の評価において、

1)酵母Two-hybrid法において環境試料を評価する際、十分にE2が含まれる試料においてもエストロゲン様活性が認められない試料が存在し、エストロゲン様活性発現の阻害作用が認められ、試料中のエストロゲン様活性を適正に評価できていない事が明らかとなった。

2)HPLCを用いて環境試料を分画した結果、エストロゲン様活性を発現する画分の特定が行えた。一方、近接する画分では阻害作用が認められ、阻害作用を示す物質はHPLCによる分画では分離が不十分であることが示され

た。

3)酵母Two-hybrid法にS9mixを添加する際、その添加量を試験系の10%(volume)、S9mixの反応時間を4hrとすることで、従来の試験法にほとんど変更を加えることなく、S9mixの作用を発現させることが可能となった。

4)環境試料の測定に際し、S9mix添加した試験系では、多くの試料で、-S9系に比べエストロゲン様活性の大幅な上昇が認められた。

5)環境試料中に存在する阻害成分による阻害作用がS9mix中のphosphate buffer, KCl, MgCl₂により抑制されたことでエストロゲン様活性の大幅な増加につながったものと考えられる。

これらのことから、酵母Two-hybrid法にS9mixを組み込むことで、より簡便に環境中のエストロゲン様活性評価を行え、環境試料の持つエストロゲン様活性ポテンシャルを評価できるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり酵母を供与いただき、ご指導頂きました大阪大学大学院薬学研究所・西原先生、西川先生に深く感謝致します。

(原稿受付 2001年 7月26日)

(原稿受理 2001年10月22日)

参 考 文 献

- 1) 宮本純之(1999) エンドクリン白書, pp.233-261, 化学工業日報社, 東京.
- 2) Nishihara, T., Nisikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, H. (2000) Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay, *Journal of Health Science*, 46, 282-298.
- 3) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Mastuo, M. and Nishihara, T. (1999) New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154, 76-83.
- 4) 鎌田素之, 赤塚靖, 平野景子, 亀井翼, 眞柄泰基 (2000) 第9回環境化学討論会 講演要旨集, 454-455.
- 5) 細川将洋, 近貞幸治, 亀屋隆志, 浦野紘平 (2001) 河川水の女性ホルモン活性試験のための濃縮・精製方法と評価法, 第35回日本水環境学会年会講演集, 110.
- 6) Nakada, N., Takada, H., Nyunoya, H., Nakamura, M. and Iguchi, T. (2000) Identification of the organic compounds contributing to the total estrogenic activities in municipal sewage treatment plant effluent, 第三回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 94.
- 7) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research*, 113, 173-215.
- 8) Delha SS and Kupfer D. (1994) Metabolism of the proestrogenic pesticide methoxychlor by hepatic P450 monooxygenases in rat and humans. Dual pathway involving novel ortho ring-hydroxylation by CYP2. *Drug Metab. Dispos.*, 22, 937-946.
- 9) 永洞真一郎, 阿賀裕英, 芥川智子, 沼辺明博, 村田清康, 坂田康一, 白石不二雄 (2001) 第10回環境化学討論会 講演要旨集, 324-325.