

【ノート】

河川水中のエストロゲン様活性測定における 酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と レセプターバインディングアッセイキットの比較

北 本 寛 明* 古武家 善 成 中 野 武

Comparison of the yeast two-hybrid assay with receptor binding assay kit for the measurement of estrogenic activity in river waters

Hiroaki KITAMOTO*, Yoshinari KOBUKE and Takeshi NAKANO

Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan

The conventional yeast two-hybrid assay used as a measurement technique of estrogenic activity in river waters was reviewed in the points of sensitivity and operability. From the performance comparison with another improved yeast two-hybrid assay and two commercial kits for estrogen receptor binding assay, improved method which medium was adjusted to neutral condition was considered to be the most substitutable.

はじめに

内分泌攪乱化学物質は、ごく微量で生物に影響を及ぼす可能性があるとして、各国で問題視されている。環境省の SPEED'98¹⁾では、約70種が内分泌攪乱の疑いがある化学物質の候補に挙げられ、生物に対する環境汚染化学物質のホルモン様作用等が危惧されてきた。また、2005年には今後の対応方針である ExTEND2005²⁾が発表された。

環境中有機化学物質のモニタリングでは、GC/MS や LC/MS などの機器分析が現在の主流となっている³⁾が、環境中化学物質の評価手法の一つとして、バイオアッセイも用いられるようになってきた^{4) 8)}。

バイオアッセイの1つに、遺伝子組み換え酵母を用いてエストロゲン様活性測定を行う方法がある。この方法は、2つの遺伝子が組み込まれた酵母を用いる測定法^{9) 11)}

である(名称については必ずしも統一されていないが、本報告では、他の報告例^{7), 12)}に合わせて酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と表記する)。著者らも、1998年度より実施している河川の内分泌攪乱化学物質モニタリング調査¹³⁾の中で、2002年度よりこの方法を用いたエストロゲン様活性の測定を行ってきた。

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、in vitro でエストロゲン様活性を持つ化学物質の試験ができるだけではなく、種々の化学物質が混在している環境試料の包括的なエストロゲン様活性測定においても有効な方法である。しかし、測定操作が煩雑なことや分析に時間を要すること、また商品化が難しく一般には普及させにくいなどの問題点も挙げられる。

一方、レセプターバインディングアッセイキットはいくつか市販されているが、コアクチベーターを介した、より生体内に近い反応系により検出を行うキットも市販されるようになってきた。しかし、コアクチベーターが用いられているキットに関する報告例はまだ少ない。

そこで、感度と操作性の面から代替手法を検討するため、河川水試料を用いて、酵母ツーハイブリッド・アッ

安全科学部

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究センター

安全科学部 北 本 寛 明

セイ法の従来法とその改良法^{14), 15)}, および比較的短時間で結果が得られるコアクチベーターを用いたレセプター (hER-) バインディングアッセイ法のキット2種を比較した。

材料と方法

1. 試料

兵庫県下の主だった河川下流域 14 地点において各 12L の河川水を採取し, 検討試料として用いた。

2. 試薬および機器

17- β -エストラジオール (E2) 市販標準品およびジメチルスルホキシド (DMSO) は, 和光純薬工業の生化学用を用いた。メタノールおよび酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用以上の純度のものを用いた。

試料水のろ過にはグラスファイバーフィルター GF/C (Whatman 社) を用い, 試料水処理には Sep-Pak Plus tC18 カートリッジカラム (tC18) と CSP-800 カートリッジカラム (CSP-800) (共に Waters 社) を用いた。カートリッジカラムへの通水には, Sep-Pak Concentrator (Waters 社) を用いた。

試料の濃縮にはターボバップ (Zymark 社) を用いた。酵母ツーハイブリッド・アッセイ法用の 96 穴マイクロタイタープレートには, Nalge Nunc International 社の F96 polysorp nunc-immuno plate を用いた。マイクロプレートリーダーは, Microplate reader model 680 (BIO-RAD 社) を用い, 検量線の作成と濃度の算出には, パーソナルコンピューター用のデータ解析ソフトウェア, マイク

ロプレート マネージャー 5.2 PC ウィンドウズ用 (BIO-RAD 社) を用いた。

3. 試料水の前処理方法

試料水 12L をグラスファイバーフィルターで吸引ろ過し, 通水後のグラスファイバーフィルターを 1.5mL 程度のメタノールにより洗浄し, その洗液とろ過後の試料水を合わせてろ過試料水とした。カートリッジカラムとして, 機器分析で多用される tC18 と, 変異原性試験用の試料水前処理にも使用されている CSP-800 とを用い, ろ過試料水を, tC18, CSP-800 の順に連結したカラム 4 組 (3L/組) に Sep-Pak Concentrator を用いて上向き流速 15mL/分で通水した。カートリッジカラムを通気乾燥後, メタノール, 酢酸エチルの順に各 10mL で溶出を行い, 各画分を別々のガラス容器に回収した。ターボバップを用いた高純度窒素吹き付けにより 1mL 程度まで濃縮し, DMSO 500 μ L を添加後, さらに高純度窒素吹き付けにより, メタノールおよび酢酸エチルを完全に除去し, 最終的に DMSO で 1mL に調製 (12,000 倍濃縮) したものを試料液とした。

4. 測定

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法および改良法を用いて試料水の前処理法について検討するとともに, 選定した抽出画分を用いて前述の 2 法と, 市販レセプターバインディングアッセイキット 2 法の合計 4 方法を用いてエストロゲン様活性測定における感度と操作性に関する比較検討を行った。

各アッセイ法の概略について, Table 1 に示した。

Table 1 Outline for estrogenic activity assays

Method	Time	Assay flow
Yeast two-hybrid assay^{*1} (hER-)		Reaction with sample in medium Measurements at 600, 420, 550nm Calculation of β -galactosidase activity conversion to conc.
Conventional	3days (Containing preculture)	Using pH5.8 medium
Improved^{*2}	3days (Containing preculture)	Using pH7.1 medium containing 0.1M PIPES buffer
Estrogen receptor-binding assay (hER-)		Conversion to conc.
Kit A	4hr	Add sample and ER- into coactivator coated plate wells Binding reaction Reaction with HRP-antibody Measurement at 450nm
Kit B	24hr	Add sample and TIF2-BAP ^{*3} into ER- coated plate wells Binding reaction Reaction with BAP Measurement at 405nm

*1 : Strain from Nishihara lab., Osaka Univ.

*2 : Improved by Nakamuro et.al (2005)

*3 : Transcriptional Intermediate Factor - Bacterial Alkaline Phosphatase
PIPES is one of good buffer, piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid).

hER- is meant human estrogen receptor.

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では、ヒトエストロゲンレセプター 遺伝子と GAL4DBD をつないだコンストラクトと、GAL4AD とコアクチベーターの TIF2 をつないだコンストラクトが組み込まれた酵母株（大阪大学西原研究室より分与）を用いた。その測定原理¹¹⁾は、ヒトエストロゲンレセプターと結合する化学物質と酵母を反応させると、化学物質のエストロゲン様活性強度に応じた量の β -ガラクトシダーゼが産生される。これに発色試薬を添加し、 β -ガラクトシダーゼの触媒作用による試薬の発色強度を吸光値として測定することにより、得られた β -ガラクトシダーゼ量を元に、エストロゲン様活性強度を求める方法である。

従来法⁹⁾⁻¹¹⁾では pH5.8 の培地中で試料を反応させるが、中室らが開発した改良法^{14), 15)}では、酵母株は従来法と同一であるが、反応培地の pH が PIPES 緩衝液により pH7.1 に変更されている。改良法は、反応の妨害物質であるフミン質の影響が抑えられ検出感度が上がるとされる。

エストロゲンレセプター バインディングアッセイ法は、ヒトエストロゲンレセプター、コアクチベーターおよび試料を反応させ、エストロゲン様活性を発色強度として検出する。キット A は、検出に HRP 標識抗体が用いられており、キット B は酵素標識コアクチベーターによる検出が用いられている。酵素を介した発色強度は対象化学物質に結合した酵素複合体の酵素量に依存する。

各方法の操作は、報告書^{10) 11)}もしくは添付説明書に従って行った。

結果および考察

1. 前処理方法の検討

tC18 および CSP-800 のそれぞれのメタノール、酢酸エチル抽出画分について、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法と改良法により、エストロゲン様活性を測

定した (Table 2)。エストロゲン様活性物質の検出率には、カートリッジカラムの捕集効率、溶媒の溶出効率および測定法による違いが影響すると考えられる。カートリッジカラムの捕集効率については、従来法では 2 段目に接続した CSP-800 から溶出画分で多少検出されたが、改良法では、試料 3 の場合を除き CSP-800 から溶出画分での検出はなかった。表には示していないが、CSP-800 の捕集効率も検討するために、試料 2 についてカラムの連結順を逆転させて通水し、改良法で測定したところ、1 段目に接続した CSP-800 の溶出液からは検出されず、2 段目の tC18 では検出された。これらの結果から、今回の検討にはメタノール画分の結果を用いることとした。

溶媒の溶出効率については、従来法では酢酸エチル画分でも多少検出されたが、改良法では、試料 1 の場合を除き酢酸エチル画分での検出はなかった。これらの結果から、今回の検討には tC18 の結果を用いることとした。

一方、測定法に関しては、表に示されるように、酸性条件下で反応を行う従来法と中性条件下で反応を行う改良法とで検出率が異なる結果が得られた。1 段目に接続した tC18 のメタノール画分を比較すれば、試料 9 での検出の違いから改良法の高感度性が認識されるが、tC18 の酢酸エチル画分を比較すれば、従来法の方が検出数は多かった。同様の結果は 2 段目に接続した CSP-800 のメタノール画分に関しても得られた。

この原因は必ずしも明確でないが、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、活性の促進物質によるアゴニスト作用と抑制物質によるアンタゴニスト作用の相互作用¹⁶⁾により、最終的に活性値が得られるアッセイ法である。したがって、カラムに捕集されにくい画分や溶媒で溶出されにくい画分に関しては、反応培地の pH の違いにより、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用のバランスが変化したのではないかと推測される。両作用のバランスの問題に関しては今後の検討が必要である。

Table 2 Discussion about pretreatment method
Pretreatment cartridge column are connected in the order named on table up to bottom, and through the sample water.

Method	Solid-phase extraction	Extracting solvent	Sample No.														Detection rate
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Conventional	tC18	Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	8/14	
		Ethyl acetate	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3/14	
	CSP-800	Methanol	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	5/14	
		Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14	
Improved	tC18	Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	9/14		
		Ethyl acetate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14		
	CSP-800	Methanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14		
		Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14		

+ : Detected, - : Not detected

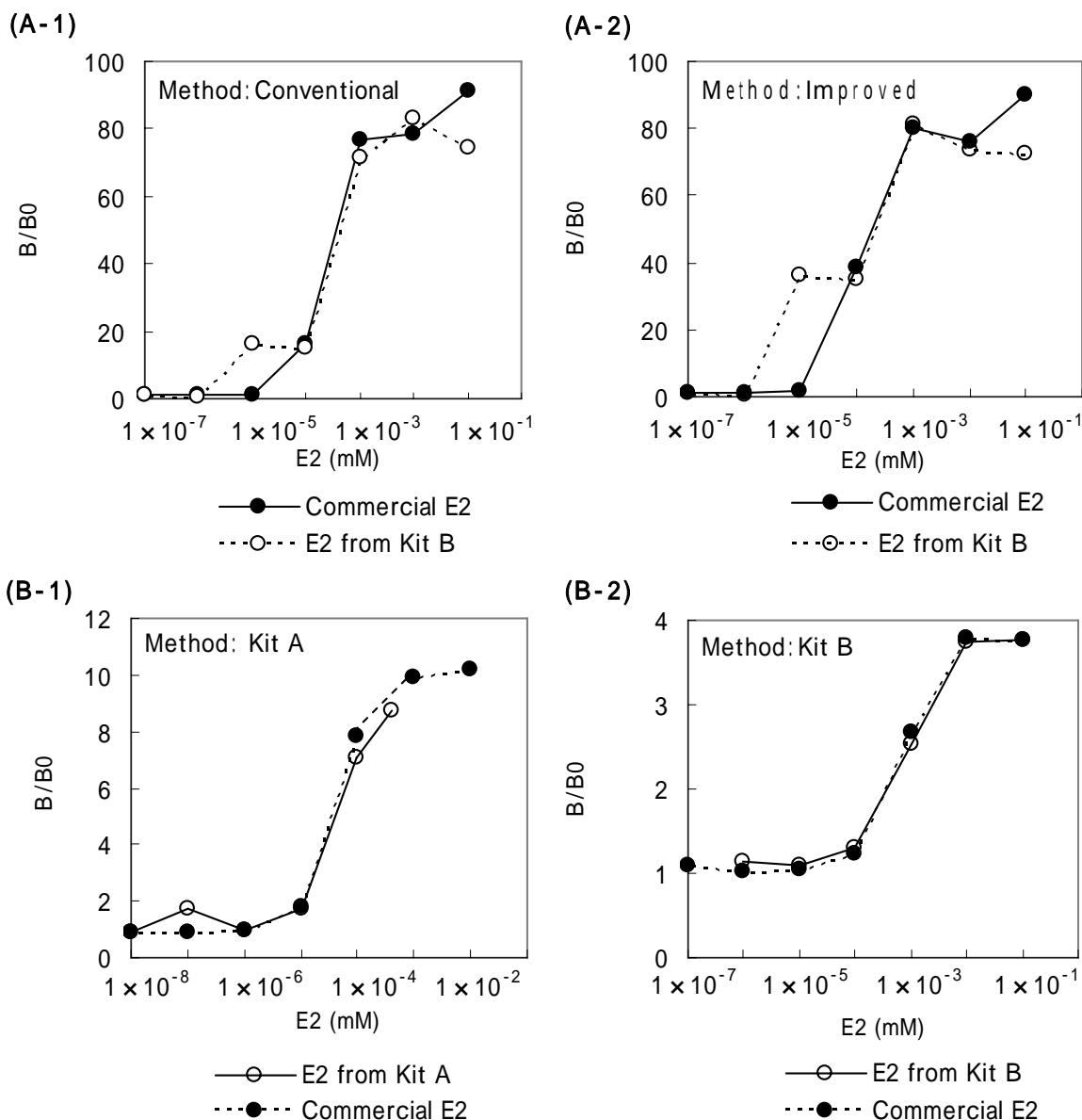


Fig.1 Comparison of standard E2 measurements

(A-1): Comparison of standard measurements by conventional Yeast two-hybrid assay using commercial E2 and Kit B contained E2.

(A-2): Comparison of standard measurements by improved Yeast two-hybrid assay using commercial E2 and Kit B contained E2.

(B-1): Comparison of standard measurements by Kit A using Kit A contained E2 and commercial E2.

(B-2): Comparison of standard measurements by Kit B using Kit B contained E2 and commercial E2.

試料水の前処理方法については検討すべき点があるが、今回のエストロゲン様活性測定法の比較では、Table 2においてエストロゲン様活性の検出率が最も高い、tC18のメタノール抽出画分を試料に用いて行うこととした。

2. 標準品の測定比較

Fig.1 に、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法による市販 E2 標準品およびキット B 添付 E2 標準品の測定結果

と、キット法によるキット添付標準品および市販 E2 標準品の測定結果を示した。

A-1, A-2 に示す酵母ツーハイブリッド・アッセイ法による結果では、 1×10^{-1} mM 濃度で活性値に多少の乱れが生じたり、キット B の添付標準品の場合に 1×10^{-5} mM の値が高くなった。

一方、B-1, B-2 に示すキット法では、各キット添付標準品と市販標準品はよく一致する結果が得られた。これ

Table 3 Comparison of coefficients of variation measured by four assays using standard E2

17 -estradiol (mM)	Yeast two-hybrid assay				Receptor binding assay kit	
	(-galactosidase activity value)				(Absorbance)	
	Conventional	Improved			Kit A	Kit B
0	4.2	9.9			9.3	9.3
1 × 10 ⁻⁸	-	-			9.7	-
1 × 10 ⁻⁷	3.8	7.0			9.5	-
1 × 10 ⁻⁶	10.4 (23.2)	7.7 (33.0)			13.2	1.5
1 × 10 ⁻⁵	17.1 (80.3)	7.6			4.4	4.7
1 × 10 ⁻⁴	3.0	1.5			2.3	2.6
4 × 10 ⁻⁴	-	-			0.9	-
1 × 10 ⁻³	3.7	1.6			-	1.4
1 × 10 ⁻²	4.1	3.3			-	1.2
1 × 10 ⁻¹	11.3	2.9			-	2.7
CV(%)	Max.	17.1 (80.3)	9.9 (33.0)		13.2	9.3
	Min.	3.0	1.5		0.9	1.2
	Ave.	7.2 (16.7)	5.2 (8.4)		7.0	3.3

Numbers in parentheses indicate CV% values calculated except deviated data

らの結果から、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では市販標準品を用い、キット法では各キット添付標準品を用いて、検量線を作成しても、特に問題はないと判断された。

3. 各アッセイ法の精度

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法と改良法、およびキット A, B について、活性測定時の精度に関して

変動係数を用いて検討した。

Table3 に、標準品の 3 重測定結果から得られた変動係数 (CV%) を示した。なお右側に括弧が付されている値については、3 重測定のうちハズレ値を除外して計算して CV% を示し、括弧内にはハズレ値を除外する前のデータから算出した CV% を参考として示した。

酵母ツーハイブリッド法の従来法および改良法については -ガラクトシダーゼ活性値を、キット法については

Table 4 Comparison of coefficients of variation measured by four assays using water samples

Sample No.	Yeast Two-hybrid assay		Receptor binding assay kit		
	Conventional	Improved	Kit A	Kit B	
1	0.9	-	20.7	13.8	
2	2.1	4.0	66.1	4.0	
3	2.4	1.1	4.0	19.8	
4	7.3	2.3	-	2.1 (31.9)	
5	8.4	2.9	-	14.2	
6	4.3	3.2	-	16.4 (35.3)	
7	9.1	2.0	-	16.1	
8	7.7	2.0	-	35.9 (174.4)	
9	-	2.9	-	2.0	
10	-	-	-	44.0 (62.6)	
11	-	-	8.7	30.3 (163.3)	
12	-	-	-	9.9	
13	-	-	-	18.2	
14	-	-	-	6.5 (24.6)	
CV (%)	Max.	9.1	4.0	66.1	44.0 (174.4)
	Min.	0.9	1.1	4.0	2.0
	Ave.	5.3	2.6	24.9	16.6 (24.2)

Numbers in parentheses indicate CV% values calculated except deviated data

各吸光値を、それぞれ用いて算出した 3 重測定の CV%を示した。

ハズレ値を除外しない前は、従来法では 1×10^{-5} nM および 1×10^{-6} nM の E2 濃度で変動係数が比較的大きく、改良法では 1×10^{-6} nM で変動係数が比較的大きくなった。しかし、3 重測定のうち、明らかに他の吸光値と異なるハズレ値を除外して補正することにより、従来法、改良法共に、CV%値は低く抑えられた。すなわち、測定を 3 重測定で行い異常値を除去すれば、精度の良い結果が得られると判断される。

Table 4 には、同様の検討を試料水について行った結果を示した（括弧の表示についても同様である）。

Table 4 の場合と異なり、キット法による測定値で変動係数が大きくなる結果が得られた。キット A については、試料 1, 2 で比較的大きな CV%値が示されているが、これは、3 重測定値がいずれも変動係数、1 測定値のみ明らかにハズレ値と判断できないために、補正ができなかったことによる。キット B については補正が可能であったが、補正後も CV%値が 44%となる場合も見られた。

測定対象と手法は異なるが、厚生労働省通知¹⁷⁾によれば、食品中アレルゲンの ELISA 検査における変動係数に対し、3 重測定の CV%値が 20%以上の場合には再測定することとされている。ここで対象とされている測定値は吸光値であると解釈されていることから、吸光値から換算した濃度ベースでは、CV 値は 20%を超えると考えられる。しかし、この点を考慮しても、試料水に対するキット法の変動係数は多少大きいと言える。

Table 4 に示されたように、標準品を用いた場合にはキット法の変動係数は小さかったことから、キット法を実試料に適用する場合には、それに適した試料の前処理法の改良を行う必要があると考えられる。

4. 実測値の比較

4 種類の測定法による河川水中のエストロゲン様活性値測定結果を Fig.2 に示した。

図では、試料 1 から 8 までは従来法で値の高かったものの順に、試料 9 以降は従来法で測定値が得られなかった試料が集まるように配列した。試料 1 の改良法の値は検出上限値以上であった。

活性値の大きさについて比較すると、従来法では 0.001 ~ 0.01 nM 程度、キット A では 0.0001 ~ 0.001 nM 程度、改良法では 0.001 ~ 0.1 nM 程度、キット B では 0.001 ~ 0.1 nM 程度と、測定方法による違いが見られた。

また、前述したように、検出率についても、従来法で 8/14、改良法で 9/14、キット A で 4/14、キット B で 14/14 と、それぞれ異なる結果が得られた。

本試料については同時に機器分析を行い、内分泌攪乱作用が疑われる PCB、ビスフェノール A、ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノールなどの化合物、および E2 を測定したが、今回は、これらの濃度とそれぞれのエストロゲン様活性値との間に有意な相関関係は認められなかった。

Fig.3 に各測定法間で有意な相関が得られた結果を示した。図中に破線で囲んで示した試料は、従来法では測定値が得られなかったが、定量下限値のおよそ 1/10 である 0.0001 nM を当てはめて、相関係数を求めた。図に示されるように、従来法と改良法、従来法とキット B、改良法とキット B の間には、危険率 1%で有意(**)な正の相関が得られた。図中の相関係数は原データによる結果(図中の両軸は、見やすいように対数目盛りにしてある)であるが、両データを対数変換した場合でも、(A)および(B)に関しては、相関係数は、それぞれ危険率 1%および 5%で有意であった。したがって、従来法と改良法および従来法とキット B の間の正の相関は明瞭と考えられる。

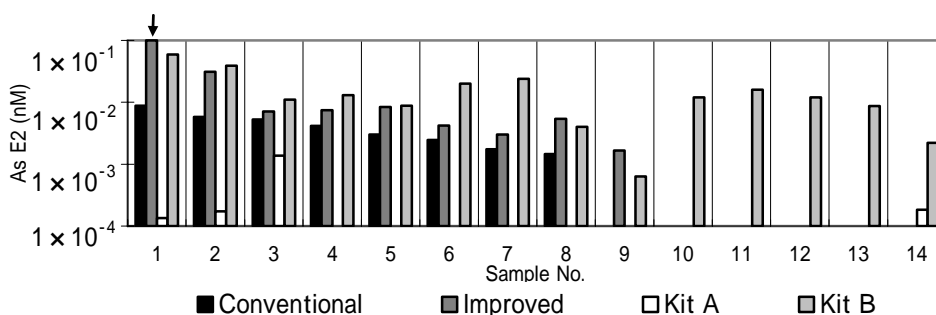


Fig.2 Comparison of estrogenic activity values of water samples measured by four assays

The estrogenic activity in the river waters was measured by 4 methods. Yeast two-hybrid assay are Conventional and Improved, Receptor binding assay are Kit A and Kit B. Arrowhead graph was over the maximum limit 0.1 nM.

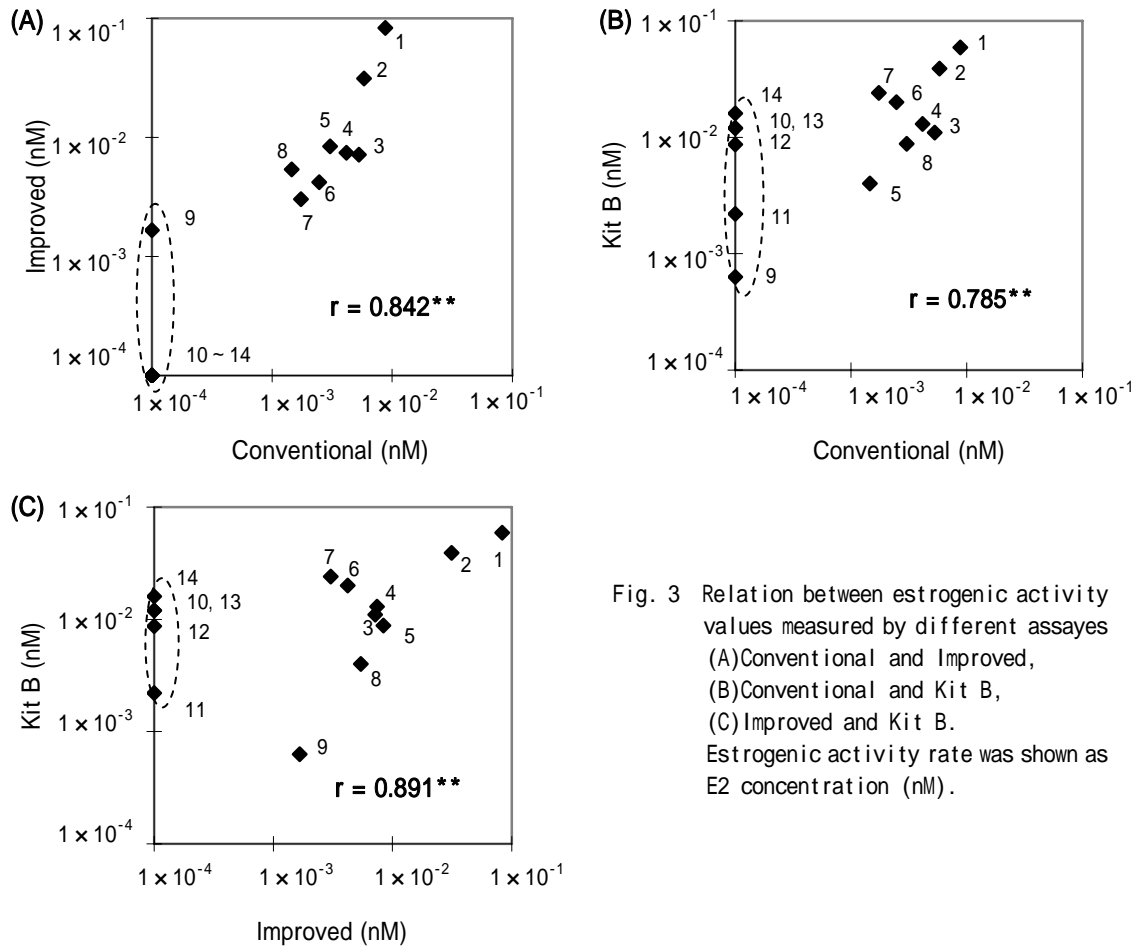


Fig. 3 Relation between estrogenic activity values measured by different assays (A)Conventional and Improved, (B)Conventional and Kit B, (C)Improved and Kit B. Estrogenic activity rate was shown as E2 concentration (nM).

Fig.3 を用いて、改良法およびキット B の測定値の特徴について検討した。

Fig.3(A)において、改良法では活性値が得られたが、従来法では活性値が得られなかった試料 9 と、従来法、改良法双方で活性値が得られた試料 1~8 に関する改良法の活性値を比較すると、前者は後者より全て小さい。従来法と改良法とは正の相関を示していることから、試料 9 に関しては、エストロゲン様活性物質の濃度が低いために従来法では測定できなかったが、改良法では感度が高いために測定可能となったと解釈される。

改良法は、試料水中の主要な妨害物質であるフミン酸の影響を従来法より低減できることから、活性が全体的に増加したものと考えられた。また、反応を pH5.8 の培地で行う従来法に比べ pH7.1 で反応を行う改良法では、化学物質の構造も安定しているのではないかと考えられる。

次に、Fig.3 (B) においてキット B に着目すると、従来法、改良法共に酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では活性が得られなかった試料 10~14 に対するキット B の測定値は、全て定量下限以上の値であった。すなわち、キット B では、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によ

り活性値が得られるかどうかに関わりなく、全ての試料で測定値が得られたことになる。このことは、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法とキット法との反応機序の違いにより生じたものと考えられる。すなわち、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、酵母の細胞壁（および細胞膜）を通過した化学物質群がエストロゲン 受容体にリガンドとして結合し、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用を発現するのに対して、酵母を反応に用いないキット B では、細胞壁通過による化学物質群の選別が起こらず、試料水中の化学物質が直接エストロゲン 受容体にリガンドとして結合し、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用を発現するために、このような違いが出たと考えられる。

5. 従来法との代替性

各測定法の特徴について Table 5 にまとめた。測定時間については、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では、活性測定反応に先立って行う前培養と活性の高い単クローンの選定を含めて 3 日間程度を要するのに対し、キット B では 24 時間、キット A では 4 時間で測定が完了することから、キット法を評価できる。

Table 5 Characteristics of different methods

Items	Estrogenic activity assay		Yeast two-hybrid assay		Receptor binding assay kit	
		Conventional	Improved	Kit A	Kit B	
Assay time		I	I	G	F	
Variation		G	G	I	I	
Detection rate / Sensitivity		F	G	I	G	
Measurement of highly concentrated water sample		F	G	I	G	
Cost performance		G	G	I	F	
Substitutability for conventional method			F	I	I	

G:good F:fair I:insufficient

変動については、試料測定において変動係数が少なかった酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を評価できる。

検出感度については、改良法とキット B で高い結果が得られたが、感度は共に従来法の数倍～10 倍程度であり、従来法と比較して十分な検出率と感度が得られたと考えられる。

コストパフォーマンスについては、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は安価に測定可能なことから、市販品であるキット法（特にキット A）は劣ると言える。

これらの点を総合的に検討すれば、キット B および改良法による代替の可能性について、以下のように判断された。

キット B は検出率・感度や高濃縮試料への対応が良好であり、コストもキット法では比較的良かった。しかし、反応機序の面で従来法と異なることから、従来法と単純に置き換えることは難しいと考えられる。キット B を代替法として用いる場合には、河川水中のエストロゲン様活性の新たな総合評価法として、モニタリングによる経年データを蓄積していく必要がある。

改良法については、簡便性の面では、反応培地の pH 調整の手間が増えること、当面は従来法との併用が必要であることなどから、問題点は残るが、高感度であり高濃縮試料への対応面でも優位であることから、従来法と代替可能な方法であると考えられる。改良法を代替法として用いる場合には、同一試料の測定でも従来法と活性値が異なったことから、当初は 2 つの方法で同時に試料の分析を行い、データの蓄積を行う必要がある。また、プレート法¹⁸⁾など他の改良法との組み合わせることにより、測定の煩雑性を低減し測定時間を短縮する試みが必要であると考えられる。

要 旨

兵庫県下の河川水のエストロゲン様活性測定に用いている酵母ツーハイブリッド・アッセイ従来法に関し、高感度かつ簡便な代替法を見出すために、同改良法および

エストロゲンレセプターバインディングアッセイキットを対象に、その性能を比較検討した。

1. 前処理法の検討結果より、カートリッジカラムとして Sep-Pak Plus tC18、溶出溶媒としてメタノールを用いた画分が今回のアッセイ法の比較には妥当と判断された。
2. 標準品を用いた変動係数の検討の結果、3 重測定のうち明らかに逸脱した値があればそれを削除することにより、改良法、キット法共に有効であることがわかった。
3. 実試料を用いた変動係数の検討の結果、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法に比べキット法で変動係数が大きくなる傾向が認められた。酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の改良法では、変動係数は小さく良好な結果が得られた。
4. 試料の実測値比較により、従来法と改良法、従来法とキット B、改良法とキット B の間に有意な正の相関が得られた。このことから、各測定値について、従来法と改良法およびキット B を比較した結果、改良法とキット B は、従来法の数倍から 10 倍程度感度が高いことがわかった。また、酵母の細胞壁を介する酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と、細胞壁を介さないキット B では、測定されている化学物質が異なる可能性が示唆された。
5. 各アッセイ法の特徴を検討した結果、いくつかの課題は残るが、改良法は、従来法の代替法として最も適していると結論された。

謝 辞

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の酵母株の分与および測定法をご指導いただきました、大阪大学西川淳一助教授に深謝いたします。また、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の改良法についてアドバイスいただきました、摂南大学中室克彦教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 環境庁: 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'98- 2000年11月版. pp.124 (2000)
- 2) 環境省: 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-EXTENS2005-, pp.33 (2005)
- 3) 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暫定マニュアル(水質, 底質, 水生生物). pp.160 (1998)
- 4) 田中宏明, 小森行也, 玉本博之, 斉藤正義, 高橋明宏: 下水中の環境ホルモンの分析方法とエストロゲン様活性の総括指標化. 用水と廃水, **44**(1), 15-20 (2002)
- 5) 鎌田素之, 眞柄泰基: 浄水処理における内分泌攪乱化学物質の挙動. 用水と廃水, **44**(1), 28-33 (2002)
- 6) 川越保徳: 廃棄物処分場浸出水で検出される環境ホルモン物質とエストロゲン様活性. 用水と排水, **44**(1), 61-67 (2002)
- 7) 白石不二雄: 内分泌攪乱化学物質の環境計測手法としてのバイオアッセイ. 全環研会誌, **27**(4), 214-319 (2002)
- 8) 深澤均: 酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定の実用. 全環研会誌, **27**(4), 233-239 (2002)
- 9) Tsutomu Nishihara, Jun-ichi Nishikawa, Tomohiro Kanayama, Fumi Dakeyama, Koichi Saito, Masayoshi Imagawa, Satoshi Takatori, Yoko Kitagawa, Shinjiro Hori, and Hideo Utsumi: Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *Journal of Health Science*, **46**(4), 282-298 (2000)
- 10) 西川淳一, 西原力: 酵母を用いたツーハイブリッド試験. 井上達監, 今井清, 長村義之, 加藤正信, 菅野純編, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, p.20-27, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 (2000)
- 11) 西原力, 西川淳一: 酵母 Two-Hybrid System を用いたエストロゲン作用活性の検出法. 日薬理誌, **118**, 203-210 (2001)
- 12) 渡邊雅之, 深澤均, 白石不二雄, 白石寛明, 塩澤竜志, 寺尾良保: 解離処理により発生するビスフェノール A 等の化学物質の分析とエストロゲン活性. 環境化学, **14**(1), 65-71 (2004)
- 13) 古武家善成, 松村千里, 鶴川正寛, 藤原英隆, 北本寛明: 兵庫県内河川における内分泌攪乱化学物質の分布特性および PRTR データから得られた環境排出量との関係. 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要, **1**, 60-66 (2004)
- 14) 中室克彦, 坂崎文俊, 竹内勉, 上野仁, 奥野智史: 環境水中のエストロゲン様物質の高感度検出のための酵母 two-hybrid 法の改良. 第 55 回全国水道研究発表会要旨集, 602-603 (2004)
- 15) 中室克彦, 竹内勉, 坂崎文俊, 奥野智史, 上野仁: 改良酵母 two-hybrid 法とヒメダカピテロジェニンアッセイを用いた環境水中のエストロゲン様物質の評価. 日本薬学会年会講演要旨集, **125**(3), p.177 (2005)
- 16) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 曾家義博, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原力, 森田昌敏: 酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用. 環境化学, **11**(1), 65-73 (2001)
- 17) 厚生労働省: アレルギー物質を含む食品の検査方法について. 厚生労働省医薬局食品保健部長通知, 食発第 1106001 号(平成 14 年 11 月 6 日)
- 18) 川越保徳, 福永勲, 西川淳一, 西原力: 酵母 Two-hybrid システムによるエストロゲン様活性測定法の簡便化に関する検討. 環境化学, **10**(1), 65-72 (2000)