



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒメダカを用いた短期半止水式曝露試験によるエストロゲン様作用の評価に関する研究
Author(s)	宮谷, 伸之; 竹田, 誠; 大野, 浩一 他
Description	第11回衛生工学シンポジウム (平成15年11月6日 (木) -11月7日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 一般セッション . 3 環境保全・リスク評価 . 3-7
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 11, 159-162
Issue Date	2003-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7070
Type	departmental bulletin paper
File Information	11-3-7_p159-162.pdf



3-7

ヒメダカを用いた短期半止水式曝露試験による エストロゲン様作用の評価に関する研究

○宮谷 伸之、竹田 誠、大野 浩一、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学大学院）
田畑 彰久（国土環境株式会社）

1. 背景と目的

水環境中には様々な有害化学物質が存在し、ヒトや生態系への影響が懸念されている。

その中には内分泌攪乱作用を有する化学物質もあり、河川中においても広く存在していることが旧環境庁¹⁾や国土交通省²⁾の調査により明らかとなっている。また、それら全ての化学物質を把握し、個々の影響を評価することは難しいため、環境水そのものの毒性を総合的に評価可能なバイオアッセイによる評価手法が求められている。

これら内分泌攪乱化学物質の評価としては、細胞や酵母を用いた *in vitro* 試験や、生物個体を用いた *in vivo* 試験による評価が多数報告されている^{3),4)}。生体の一部のみを利用する *in vitro* 試験に比べて、*in vivo* 試験はより高次の毒性発現過程を反映する事が可能である。しかし、試験生物の飼育・曝露環境の整備といった面で技術、費用、労力等が必要となる。

そこで本研究では、ビテロジェニンアッセイを用いて、簡易な曝露設備（半止水式）で短期曝露により、エストロゲン様作用の評価を行うことを目的とした。

また、今回のビテロジェニンアッセイにより得られたビテロジェニン誘導量と、*in vitro* 試験である酵母 Two-Hybrid 法により得られたエストロゲン様活性との関係についても検討を行った。

2. ビテロジェニンアッセイについて

ビテロジェニン (VTG) とは鳥類や両生類、魚類などの卵生脊椎生物における卵黄タンパク質の前駆体であり、本来雌に特異的なタンパ

ク質である。しかし、雄においてもエストロゲン様物質に曝露されると肝臓で合成され血中に誘導されることから、エストロゲン様作用評価の有効な指標とされている。

ビテロジェニンアッセイとは、このビテロジェニンをエストロゲン様作用のバイオマーカーとして用いた評価方法である。

3. 実験方法

3.1 供試魚に対する予備試験

市販のヒメダカを供試魚として用いることが可能であるか検討するため、市販の雄ヒメダカの血清中ビテロジェニン濃度を測定した。ビテロジェニンの詳しい測定方法は後述する。

市販されている成魚ヒメダカを購入し、二次性徴から雄のみを選別した後、ガラス製の水槽を用いて飼育した。照明の明暗周期は12時間に設定した。市販されている配合飼料中には植物エストロゲンが含まれている可能性がある。そこで、これらの影響を考慮し、給餌はブラインシュリンプ孵化幼生を1日に2~3回適量与えた。

3.2 E2の曝露条件

3L セパラブルビーカーを用い、曝露水量を3Lとして実験を行った。曝露物質として17β-エストラジオール(E2)を用い、添加時濃度を1ng/L、10ng/L、50ng/L、250ng/L、500ng/Lとした。曝露期間は1日間と3日間とした。曝露水は脱塩素水道水にE2標準溶液を適当量添加して調整し、曝露開始1日後と2日後に全量を交換した。1濃度区当たり12匹を曝露させ、1日後、3日後にそれぞれ6匹ずつを取り上げた。

水温は 23±1℃、照明の明暗周期は 12 時間とし、餌としてブラインシュリンプ孵化幼生を適量与えた。

3.3 ビテロジェニンアッセイ

ビテロジェニン測定試料として、ヒメダカの血清及び肝臓の上清を用いた。

採取したヒメダカを氷冷麻酔し体重を測定後、尾びれ上部をメスで切断し、毛細管（パスツールピペットの管径を 1mm 以下に加工したもの）を用いて 5~10µL 程度採血した。続いて腹部を切開し肝臓を採取した。

採取した血液を 4℃、10 分間、13000rpm で冷却遠心分離し、得られた血清をビテロジェニン測定試料とした。

採取した肝臓は、検体希釈液を加えホモジナイズして均一にし、4℃、10 分間、13000rpm で冷却遠心分離後、得られた上清を肝臓中ビテロジェニン測定試料とした。

血清中ビテロジェニン濃度及び肝臓中ビテロジェニン濃度は、メダカビテロジェニン測定用 ELISA キット（トランスジェニック株製）を用いた。この ELISA キットは、固相に固定化した一定量の抗体に測定対象抗原を捕捉させ、この結合体にさらに酵素標識抗体を結合させ、その標識抗体を検出する手法であるサンドイッチ法を利用したものである。測定原理を図 3-1 で示す。

なお、血清中ビテロジェニン濃度の定量下限値は 200ng/mL とし、肝臓中ビテロジェニン濃度の定量下限値は 1ng/mg liver とした。また、定量下限値未満のものはその半数値をとりグラフに反映させた。

3.4 E2 濃度及びエストロゲン様活性の測定

実際に用いた曝露水中の E2 濃度は、17β-エストラジオール (E2) 測定用 ELISA キット（日本エンバイロケミカルズ株製）を用いた。

また、曝露水のエストロゲン様活性は酵母 Two-Hybrid 法⁵⁾を用いて測定した。

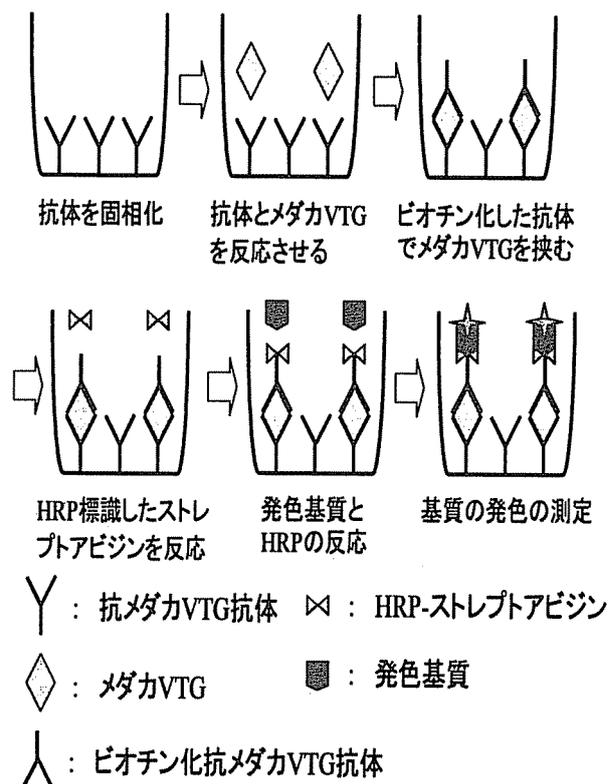


図 3-1 ビテロジェニン濃度測定原理

4. 結果及び考察

4.1 予備試験結果

市販の雄ヒメダカの、購入直後、分離飼育開始 1 週間後及び 2 週間後における血清中ビテロジェニン濃度の結果を図 4-1 に示す。購入直後では 6 個体中 3 個体で血清中にビテロジェニンが確認されたが、1 週間後、2 週間後では全ての個体において定量下限値未満であった。このことから、1 週間以上分離飼育をすれば試験に用いることができると考えられる。この結果を考慮し、今回の曝露試験では 2 週間以上分離飼育したものをを用いた。

4.2 曝露試験結果

E2 曝露後の雄ヒメダカ及び比較対照のため測定した雌ヒメダカの血清中ビテロジェニン濃度の結果を図 4-2 に、各個体の肝臓中ビテロジェニン濃度と血清中ビテロジェニン濃度の関係を図 4-3 に示す。

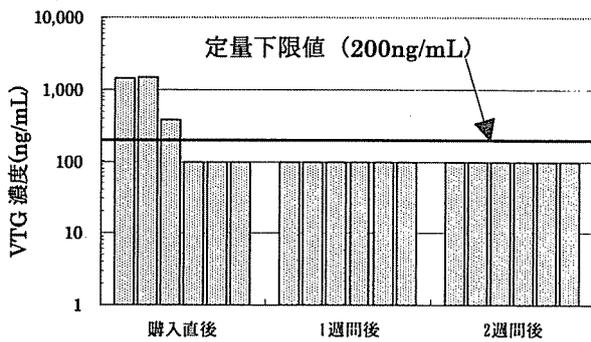


図 4-1 市販雄ヒメダカの血清中 VTG 濃度

曝露開始 1 日後では、添加時濃度 1ng/L においては全ての個体でピテロジェニンは検出されなかった。添加時濃度 10ng/L においては 1 匹のみ血清中にピテロジェニンが確認された。添加時濃度 50ng/L 以上では、全ての個体で血清中にピテロジェニンを確認することができ、コントロールに比べ有意にピテロジェニン濃度が上昇した。添加時濃度 250ng/L 以上では雌が有していたピテロジェニンの濃度と有意な差は見られなかったことから、雌ヒメダカが有するピテロジェニンの濃度範囲まで上昇したと考えられる。

曝露開始 3 日後においても、曝露開始 1 日後と同様に添加時濃度 1ng/L においては全ての個体でピテロジェニンは検出されなかった。添加時濃度 10ng/L 以上では全ての個体で血清中にピテロジェニンを確認することができ、コントロールに比べ有意にピテロジェニン濃度が上昇した。また、添加時濃度 50ng/L の場合でも雌が有していたピテロジェニンの濃度と比べ有意な差は見られず、添加時濃度 250ng/L 以上の時はさらにそれを有意に ($p < 0.01$) 上回る結果となった。

全体的に見ると、曝露開始 1 日後での血清中ピテロジェニン濃度は曝露開始 3 日後の 1 割程度であった。また、曝露濃度が高ければ個体間の血清中ピテロジェニン濃度のばらつきは小さくなり、曝露濃度が低ければそのばらつきは大きくなるという結果となった。また、曝露開始 1 日後と曝露開始 3 日後を比較すると、3 日後の方がばらつきは小さくなる結果となり、

より信頼性のあるデータが得られることが分かった。

E2 への曝露では、環境中で存在し得るような濃度である添加時濃度 10ng/L においても、3 日程度の短期間にもかかわらずピテロジェニンが誘導された。このことから、E2 が環境中へ放出された際に水生生物への影響が懸念されるため、今後さらに影響を評価する必要があると思われる。

図 4-3 より、血清中と肝臓中のピテロジェニン濃度に高い相関 ($r^2 = 0.865$) が得られた。このことから、どちらの手法を用いても化学物質の内分泌攪乱作用による影響を調べることが可能であることが分かった。

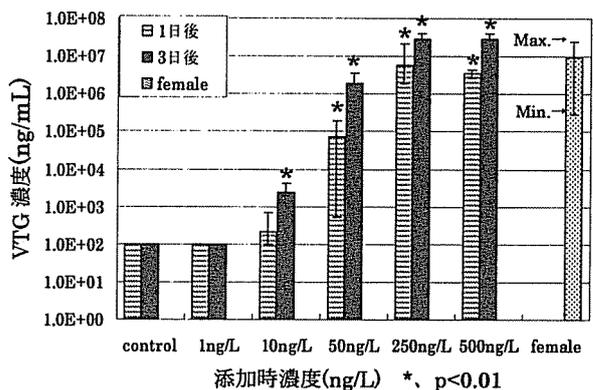


図 4-2 E2 曝露後の雄ヒメダカ及び雌ヒメダカの血清中 VTG 濃度

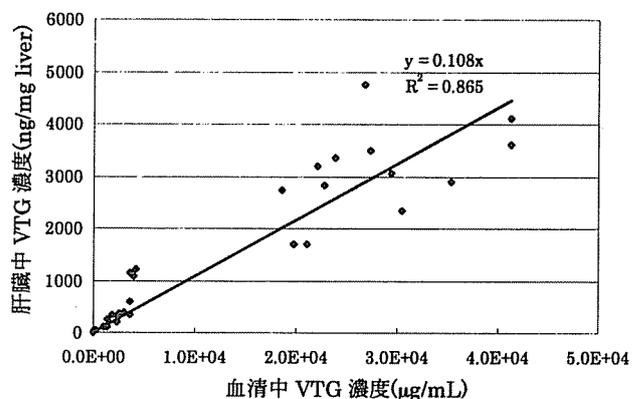


図 4-3 肝臓中 VTG 濃度と血清中 VTG 濃度の関係

4.3 曝露水のエストロゲン様活性

酵母 Two-Hybrid 法を用いて得られた調製直後の曝露水のエストロゲン様活性と曝露 3 日後の雄ヒメダカ血清中ピテロジェニン濃度の関係を図 4-4 に示す。

これより、エストロゲン様活性と曝露 3 日後の雄ヒメダカ血清中ピテロジェニン濃度との間に対数関数的に高い相関($r^2=0.985$)が得られた。

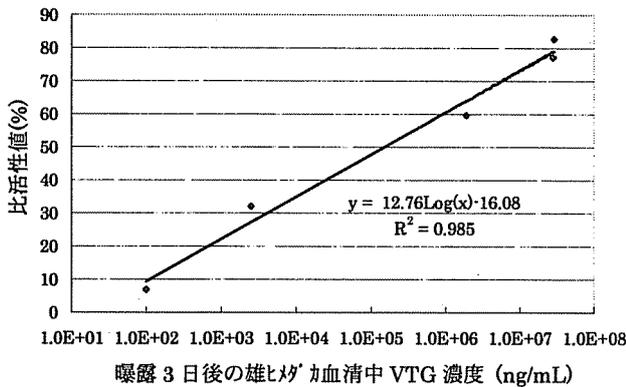


図 4-4 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様活性と雄ヒメダカ血清中 VTG 濃度の関係 (酵母 Two-Hybrid 法は 5 万倍濃縮試料により測定)

5. まとめ

本研究では、ピテロジェニンアッセイを用いて、簡易な曝露設備 (半止水式) で短期曝露により、エストロゲン様作用の評価を行うことを目的として、E2 をモデル物質として曝露試験を行った。

その結果、曝露開始後 1 日後では、E2 添加時濃度 10ng/L で 1 個体にピテロジェニンの誘導がみられ、50ng/L 以上では、全ての個体でピテロジェニンが誘導された。また、曝露開始 3 日後では、E2 添加時濃度 10ng/L 以上において、全ての個体でピテロジェニンが誘導された。

以上より、曝露期間 1 日あるいは 3 日間という短期半止水式曝露であっても、エストロゲン様作用の評価が可能であることが明らかとなった。

今後は、このピテロジェニンアッセイを用いた、E2 以外の化学物質の評価、複数の化学物質による複合作用の評価、さらにピテロジェニンアッセイの環境水への適用を検討し、エストロゲン様作用の評価法として確立していくことが必要である。

参考文献

- 1) 環境庁：水環境中の内分泌攪乱化学物質実態調査 (平成 11 年度)
- 2) 国土交通省：水環境中における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果 (平成 13 年度)
- 3) P.J.Patyna *et al.* : A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors, *The Science of the Total Environment* Vol.233 pp.211-220 (1999)
- 4) Ik Joon Kang *et al.* : Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) , *Chemosphere*, Vol.47 pp.71-80 (2002)
- 5) Jun-ichi Nishikawa *et al.* : New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator, *Toxicology and Applied Pharmacology* 154 pp.76-83(1999)