

メダカの体内リン酸化レベルを指標とする内分泌攪乱作用の評価法の開発

片岡洋行、山本 亮、磯部明子、成松鎮雄(岡山大学薬学部衛生化学講座)、竹内哲郎(岡山商科大学)

【目的】近年、様々な内分泌攪乱物質による環境汚染と生態系の異変がクローズアップされ、人体への蓄積による健康影響や子孫への影響が懸念されている。従って、これらの環境汚染問題に適切に対処して汚染防止対策を講じるためには、環境中における有害化学物質の動態を把握し、ヒトの健康や野生生物に及ぼす影響を正しく評価することが重要であり、簡便なスクリーニング法や毒性評価法の早期確立が緊急の課題となっている。そこで本研究では、雌化の指標として利用されている雌特有のビテロゲニンがリン酸化蛋白質であることに着目し、その構成ホスホアミノ酸レベルから内分泌攪乱作用を評価する方法を検討した。

【方法】影響評価生物としてメダカを用い、様々な化学物質を含む水溶液中 (水温 25°C前後) でエアープンプにより通気して一定期間飼育した後、5%トリクロロ酢酸を加えてホモジナイズし、遠心分離して蛋白質を沈殿回収した。得られた蛋白質は、酸またはアルカリ水解により構成ホスホアミノ酸に分解した後、イソプトキシカルボニルメチルエステル誘導体へ変換して、我々が既に開発した含リン化合物に選択的かつ高感度な蛍光光度検出ガスクロマトグラフィー (GC-FPD) により分析した。本法を用いて、化学物質の種類や濃度、曝露期間に対するメダカ体内リン酸化レベルの変化から、内分泌攪乱作用評価法としての有効性を解析した。

【結果・考察】 GC-FPD により、コントロールのメダカの体内から約 200 ng/mg の P-Ser が検出され、P-Thr と P-Tyr はその 1/20 以下であった。雄のメダカを β -エストラジオール溶液に曝露すると、P-ser 及び P-Thr レベルは曝露濃度及び日数に依存して増加したが、P-Thr はほとんど変動は認められなかった。また、雄のメダカをテストステロン溶液に曝露してもホスホアミノ酸レベルの上昇はほとんど認められなかった。一方、 β エストラジオールによるホスホアミノ酸レベルの上昇は、雌雄両方で認められ、エストロゲンレセプター拮抗剤であるタモキシフェンの同時曝露により抑制された。また、合成女性ホルモンであるエチニルエストラジオールやジエチルスチルベストロール曝露によっても同様の効果が観察された。以上より、体内リン酸化レベルの上昇は、エストロゲン作用に特異的であることから、新しい内分泌攪乱活性指標として有効であると考えられる。また、内分泌攪乱作用が疑われている様々な化学物質への曝露による影響についても、合わせて報告する。

【文献】 1) H. Kataoka, N. Sakiyama, Y. Ueno, K. Nakai, M. Makita, (2000) *in Methods in Molecular Biology: Amino Acid Analysis Protocols*, edited by C. Cooper, N. Packer and K. Williams, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 183-206.

Development of evaluation method for the endocrine disrupting activity based on the in vivo phosphorylation in Medaka (*Oryzias latipes*)

Hiroyuki Kataoka¹⁾, Ryo Yamamoto¹⁾, Akiko Isobe¹⁾, Shizuo Narimatsu²⁾, Tetsuro Takeuchi²⁾

¹⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University. ²⁾Okayama Shoka University

In this study, we described a new endocrine disrupting activity evaluation method based on the in vivo phosphorylation using Medaka (*Oryzias latipes*), because the vitellogenine is a phosphorylated protein in the female. When the male Medaka was exposed to the β -estradiol solution, P-Ser and P-Thr levels increased in dependent on exposure concentration and days, and was suppressed by the simultaneous exposure of the antiestrogen tamoxifen. On the other hand, the rise in these phosphoamino acid levels hardly could be recognized, even if the male Medaka was exposed to the testosterone and corticosterone solutions. In conclusion, the rise of in vivo phosphorylation level in Medaka seems to be effective as a new endocrine disrupting activity index, because it is specific for the estrogen effect.