

## ワカサギビテロゲニン ELISA 測定法の開発と湖沼調査への応用

高木博夫<sup>\*</sup>、丸尾直子<sup>\*\*</sup>、春日清一<sup>\*</sup>、西川智浩<sup>\*</sup>、白石寛明<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>国立環境研究所、<sup>\*\*</sup>東ソー(株)

【目的】近年、内分泌攪乱作用を評価する手法として雄魚におけるビテロゲニン誘導をバイオマーカーとして用いる方法が検討され、メダカ、鯉をはじめとする種々の魚についてビテロゲニンの測定が行われている。今回我々は、全国的に生息し全国調査が可能であること、また湖沼内を回遊し湖沼の平均的な内分泌攪乱作用を評価できることからワカサギを対象にし、本種による内分泌攪乱作用評価の可能性を追求するため、ワカサギビテロゲニンを特異的に測定する全自動酵素免疫測定システムを開発し、いくつかの湖沼におけるワカサギ肝臓中ビテロゲニン量の予備的な調査を実施したので報告する。

【方法】ワカサギの卵から、イオン交換カラムを用いビテロゲニン画分を分取した。精製品の分子量は、SDS-PAGE による測定では 120kDa であり、リポビテリンが主成分と思われた。本精製品を免疫原として家兎に免疫してポリクローナル抗体を取得した。ウェスタンブロットティングの結果から、本抗体は E2 曝露した雄ワカサギの血漿中に特異的に誘導される免疫原と同一分子量のたんぱく質、および雌に発現するビテロゲニンと等しく反応していることを確認した。ビテロゲニン測定は、昨年度報告したメダカビテロゲニン全自動 EIA 測定法(測定装置 AIA-600 II (東ソー製)と同様の方法で、11 倍希釈した肝臓ホモゲネートをサンプルとして行った。また、3 湖沼において産卵時のワカサギを採取し、肝臓ホモゲネート中のビテロゲニン濃度を測定した。

【結果及び考察】ビテロゲニン濃度の測定範囲を 0.3-60.0ng/mL に設定して検討を行ったところ、再現性は測定内 2.7-9.0%、測定間 3.5-5.3%と良好であり、また希釈直線性試験結果は 93.9-103.4%であった。本法におけるビテロゲニン最小検出濃度 (2SD 法) は 0.08ng/mL となった。湖沼より採取したワカサギについて測定したところ、A 湖では雄肝臓中ビテロゲニンは、27 個体中 24 個体が定量下限値以下であり、3 個体で検出された量は肝たんぱく質量あたり 2.5-13.1ng/mg protein であった。同様に B 湖 (11 匹) および C 湖 (20 匹) では全ての個体で検出され、そのレベルは B 湖で 1.8-307ng/mg (中央値 5.8mg/mg)、C 湖で 7.0-1590 ng/mg (中央値 32.2mg/mg)であった。同時に捕獲した雌(10 匹)の濃度は、2730-24400ng/mg であった。C 湖において高値を示した雄肝臓ホモゲネートには、E2 曝露した雄ワカサギ血漿中に誘導されるたんぱく質 (129kDa) と同一分子量のものが特異的に発現していた。今回湖沼により雄肝臓ビテロゲニン量に違いが観察されたが、この結果が内分泌攪乱化学物質によると直ちに結論づけることはできず、今後雄ビテロゲニン量のベースラインやその季節変動に関するデータの収集と解析が必要であると考えられる。

### Development of Wakuagi vitellogenin enzyme immunoassay and its application to the evaluation of endocrine disrupting effects in lakes

Hiroo Thkagi<sup>\*</sup>, Naoko Maruo<sup>\*\*</sup>, Seiichi Kasuga<sup>\*</sup>, Tomohiro Nishikawa<sup>\*</sup> and Hiroaki Shiraishi<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>National Institute for Environmental Studies, Japan, <sup>\*\*</sup>TOSOH Corporation, Japan

We developed an enzyme immunoassay system using AIA-600II (TOSOH Corp.) for Wakasagi (*Hypomesus transpacificus*) vitellogenin using liver homogenate in order to evaluate endocrine disrupting effects in lakes and marshes. The assay range was from 0.3 ng/mL up to 60.0 ng/mL with a minimum detectable concentration estimated to be 0.08 ng/mL. Precision studies gave intra- and inter-assay CV's of less than or equal to 9.0% and 5.3%, respectively. Vitellogenin was detected as 2.5-13.1 ng/mg protein for only 3 males out of 27 males derived from Lake A, 1.8-307ng/mg protein for 11 males derived from Lake B, and 7.0-1590ng/mg protein for 20 males derived from Lake C. Vitellogenin of females derived from Lake B and C was 2730-24400ng/mg protein. From Western blot analysis, the protein specifically expressed in liver of the male derived from Lake C had the same molecular weight as that induced in plasma of E2-exposed male. Further studies are required to clear whether the difference in the male vitellogenin level among the lakes is due to endocrine disruption or physiological phenomenon.