

## 遺伝子組換えメダカ胚を用いた環境エストロゲン様物質検出法の開発

矢田修<sup>1</sup>、川村敏之<sup>3</sup>、堀江亮太<sup>3</sup>、杉瀬健<sup>3</sup>、古川厚<sup>2</sup>、山下一郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>㈱日立空調システム・環技研、<sup>2</sup>水族飼育技術懇談会、<sup>3</sup>広島大・遺伝子実験施設

【目的】環境水中におけるエストロゲン様物質の検出法の開発を目的に、エストロゲン受容体(ER)を高発現する遺伝子組換えメダカ(Tgメダカ)を作製し、その受精卵を用いたバイオアッセイについて検討した。

【方法】メダカβ-アクチン・プロモーターの下流にメダカ ERcDNA を連結したキメラ遺伝子を作製し、これを受精卵に注入した。キメラ遺伝子をもつFOメダカと野生メダカを交配しF1メダカを得て、さらにF1メダカ同士を交配して、キメラ遺伝子をホモにもつTgメダカ系統を作製した。キメラ遺伝子の検出は、尾鰭からDNAを単離してPCR法で調べた。またキメラ遺伝子の転写は、RT-PCR法とin situ hybridizationで調べた。

エストロゲン様物質の検出は、エストロゲン(17β-estradiol, E2)を含むメダカ生理食塩水中で受精卵を発生させ、血管形成異常(血管形成障害並びに血栓形成)を実体顕微鏡で観察して評価した。

### 【結果】

- (1) ERの転写量は野生メダカでは極めて少なかったが、Tgメダカの受精卵及び稚魚ではメス成魚の肝臓における転写量と同程度に高かった。またERの発現は胚全体で認められた。
- (2) 野生メダカの受精卵は、高濃度のE2(4mg/l)で血管形成が阻害され血栓を形成したのに対して、Tgメダカの受精卵を低濃度のE2(0.5μg/l)で2日間処理するとほぼ全ての卵で血管形成が阻害され、血栓が観察された。これらの血管形成異常は、E2のアンタゴニストであるタモキシフェンで抑制された。
- (3) 神経胚期のメダカ胚がE2に感受性を示すことがわかった。
- (4) 都市下水処理場における最終沈殿池後の処理水を固相抽出し、濃縮したサンプルを用いてバイオアッセイを行った結果、30~100%の受精卵に血管形成異常が認められた。

以上総括すると、Tgメダカ胚を用いたバイオアッセイ法は、環境エストロゲン様物質の検出に有用であることがわかった。

## Development of bioassay for detecting environmental estrogenic substances by using transgenic Medaka embryos

Osamu Yada<sup>1</sup>, Toshiyuki Kawamura<sup>3</sup>, Ryohta Hori-e<sup>3</sup>, Takeshi Sugise<sup>3</sup>, Atsushi Furukawa<sup>2</sup>, and Ichiro Yamashita<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Environmental Technology Research Laboratory, Hitachi Air Conditioning Systems Co., Ltd.

<sup>2</sup> Colloquium for Aquatic Species Rearing

<sup>3</sup> Center for Gene Science, Hiroshima University

We established three transgenic Medaka (Tg medaka) lines overexpressing the Medaka estrogen receptor (ER) under the constitutive Medaka β-actin promoter. ER transcripts were expressed at high levels in the whole body of the Tg embryos whereas no significant signals were detectable in the wild type. The Tg embryos became hypersensitive to estrogens such as 17β-estradiol (E2), and failed to develop yolk veins while blood clots formed in the blood island within 2 days after exposure to E2. The embryos developed normally if exposed to estrogen after the neurula stage, suggesting that the sensitive stage is before/at neurulation. The vascular defects were recovered by incubation with an anti-estrogen, tamoxifen. These results indicate that activation of estrogen receptor caused the estrogen-induced developmental defects. Samples prepared by solid-phase extraction and concentration of municipal sewage effluents showed blood clotting activity in 30 to 100 % embryos. Our results show that the Tg Medaka embryos can be used to assay environmental estrogenic substances.