

ヒメダカビテロジェニンを用いたエストロジェン様作用の評価

○田畑彰久¹、渡辺哲理¹、宮本信一¹、大西悠太¹、伊藤光明¹、亀井翼²、眞柄泰基²

¹国土環境(株) 環境創造研究所 環境リスク研究センター、²北海道大学大学院工学研究科 環境衛生工学講座

【目的】魚類では、エストロジェン様作用を調べる指標として、卵黄の前駆体であるビテロジェニン(VTG)の有効性が OECD 等により提案されている。我々は平成 10 年からヒメダカによる VTG を指標とした化学物質のエストロジェン様作用を調べるための評価系を構築することを目的として、様々な検討を行ってきた。今回は評価系を構築するための実験の一環で、*p*-nonylphenol(*p*-NP)、bisphenol-A(BPA)、17 β -estradiol(E2)の作用濃度、同一個体での血清および肝臓 VTG 濃度の関係・被験物質によって VTG が誘導されたヒメダカを清澄な水に戻した場合の VTG 濃度の減少について検討を行い、いくつかの知見を得たので報告する。

【方法】実験はステンレス製の恒温室内に設置した流水式暴露装置を用いて行った。実験条件は水温 25°C、照明の明暗周期は 12 時間とし、餌にはアルテミアを 1 日 3 回与えた。当研究所で継代飼育した雄ヒメダカ成魚を被験物質(*p*-NP ; 10-100 μ g/L, BPA ; 100-1000 μ g/L, E2 ; 0.05-0.0005 μ g/L)に 5 週間暴露し、暴露したヒメダカを 3 日、1、3、5 週間後にそれぞれ取り上げ、血清および肝臓を採取し、これを VTG の測定試料とした。VTG 濃度の測定にはメダカビテロジェニン ELISA キット(トランスジェニック(株)・国土環境(株)製)を用いて定量した。また、5 週間の暴露で VTG の誘導が確認された場合については、化学物質を含まない脱塩素水道水でさらに 5 週間飼育し、1、3、5 週間後に上記と同様、血清および肝臓中の VTG 濃度を測定し、誘導された VTG の濃度が経時的にどのように変化するかについて検討した。

【結果】雄血清中の VTG 濃度の測定結果から、*p*-NP、BPA、E2 の最小作用濃度はそれぞれ、50 μ g/L、500 μ g/L、0.005 μ g/L であり、最大無作用濃度は 10 μ g/L、200 μ g/L、0.001 μ g/L であった。*p*-NP100 μ g/L、BPA 1000 μ g/L、E2 0.05 μ g/L にそれぞれ 5 週間暴露したヒメダカ雄の血清および肝臓中の VTG 濃度には高い相関が見られた。上記の 3 物質を同様の濃度で 5 週間暴露した後、清澄な水に戻した時の VTG 濃度は経時的に減少したが、5 週間では暴露前のレベルには戻らなかった。

The evaluation of the estrogenic activity using Medaka (*Oryzias latipes*) Vitellogenin Assay

Akihisa Tabata¹, Norimasa Watanabe¹, Nobukazu Miyamoto¹, Yuta Ohnishi¹, Mitsuaki Itoh¹, Tasuku Kamei² and Yasumoto Magara²

¹Inst. of Environ. Ecol., Metocean Environment Inc, ²Graduate School of Eng., Hokkaido Univ.

Mature male medaka were continually exposed to 3 chemicals, *p*-nonylphenol (*p*-NP), bisphenol-A (BPA) and 17 β -estradiol (E2) to evaluate their estrogenic activities by a water-flow through chemical-exposure system in the laboratory. This system was set up in a stainless-steel room at 25°C with a 12:12 hour light:dark cycle. Furthermore, in case of the vitellogenin that is a female specific protein was induced by the exposure to test waters containing above chemicals after 5 weeks, medaka was returned to uncontaminated tap water to know whether male medaka has self recovery function from the effect of estrogenic chemicals. Vitellogenin concentration in the sample (serum and liver) was analyzed by using Medaka vitellogenin ELISA Kit (METOCEAN ENVIRONMENT INC.・TRANSGENIC INC. preparation).

As a result of serum vitellogenin concentration, Lowest Observed Effect Concentration of *p*-NP, BPA, and E2 was 50 μ g/L, 500 μ g/L and 0.005 μ g/L, respectively. Also, No Observed Effect Concentration for *p*-NP, BPA, and E2 was 10 μ g/L, 200 μ g/L and 0.001 μ g/L, respectively. The vitellogenin concentration of male medaka exposed to chemicals for 5 weeks decreased gradually by returning to the uncontaminated water, however, the vitellogenin concentration did not return to the initial normal levels even after 5 weeks. A clear relationship between the serum vitellogenin concentration and the hepatic vitellogenin concentration was also found.