

## メダカ $\beta$ -Actin 及びビテロゲニン遺伝子を指標とした *in vivo* エストロゲン・アンタゴニスト試験法の開発

○西川智浩、小塩正朗、鐘迫典久、白石寛明、森田昌敏（国立環境研究所）

魚類への内分泌攪乱作用の試験法としてメダカを用いたエストロゲン・アゴニスト活性の評価法について多く検討されてきているが、アンタゴニスト活性についてはいまだ検討が進んでいない。そこで、我々は、肝臓中の  $\beta$ -Actin 及びビテロゲニン遺伝子の発現量を測定することでアンタゴニスト活性を評価する試験系の検討を行なった。陽性標準に Hydroxytamoxifen; HTx を用い、酵母 Two-hybrid アッセイによってエストロゲンのアンタゴニストと判定される 2 種類の試験物質(Tributyltin; TBT, Triphenyltin; TPT)を雄メダカに 3 日間 17  $\beta$ -estradiol(E2、50ppt)と同時曝露した。50 ppt E2 単独の曝露では全 RNA で規格化した  $\beta$ -Actin の発現量は対象区と比較して 60%程度の減少が観察された。この結果は 50ppt E2 曝露によって肝臓の  $\beta$ -Actin mRNA 合成に影響を与えたことを示している。一方、試験物質の単独曝露では  $\beta$ -Actin 発現は、同時曝露の最高濃度である TBT; 5ppb、TPT; 5ppb、HTx; 400ppb においても影響は観察されなかった。試験物質と E2 の同時曝露では、E2 曝露によって減少した  $\beta$ -Actin mRNA の発現量が試験物質の曝露に依存して回復する傾向が観察された。この結果は試験物質の曝露によって E2 曝露による  $\beta$ -Actin の抑制効果を抑制する、すなわち E2 のアンタゴニストとして機能していることを示唆している。また、全 RNA で規格化したビテロゲニン遺伝子の発現は、試験物質の濃度に依存した発現の抑制が観察された。今回の研究から、 $\beta$ -Actin およびビテロゲニン遺伝子量を測定することによってエストロゲンアンタゴニスト物質の *in vivo* アッセイが可能であることが示された。

### ***In vivo* Estrogen-antagonist Assay by Quantitative Analysis of Medaka $\beta$ -Actin or Vitellogenin Gene Expression**

Tomohiro Nishikawa, Masaaki Koshio, Norihisa Tatarazako, Hiroaki Shiraishi, Masatoshi Morita

(National Institute of Environmental Studies)

Many estrogen agonist assays using fish have been published, but there is little study for antagonist activity. We studied whether  $\beta$ -actin and/or vitellogenin gene expression in Medaka liver could be used as an indicator for *in vivo* estrogen antagonist test. The content of  $\beta$ -actin or vitellogenin mRNA in the liver was quantified by multiplex real time RT-PCR method. Hydroxytamoxifen (HTx) was used as a positive control, and Tributyltin and Triphenyltin which are known to give positive in the yeast two hybrid estrogen antagonist assay, were used as test chemicals. Male Medaka was exposed simultaneously by test chemicals and 50ppt 17  $\beta$ -estradiol (E2) for 3 days. Exposure of 50ppt E2 alone decreased  $\beta$ -actin mRNA expressions, indicating that E2 exposure altered  $\beta$ -actin gene expression in liver. While the exposure of 5ppb test chemicals or 400ppb HTx alone had no effect in  $\beta$ -actin mRNA expression, the decrease in  $\beta$ -actin mRNA caused by the exposure of E2 was repressed by the addition of anti-estrogenic chemicals. The content of vitellogenin mRNA induced by the exposure of E2 was repressed by the addition of anti-estrogenic chemicals. These results suggest that *in vivo* estrogen-antagonist assay seems to be possible by use of  $\beta$ -Actin or vitellogenin gene expression in Medaka liver.