

## メダカビテロジェニンの HPA 法及び ELISA 法を用いた エストロゲン作用の評価

宮本信一<sup>1</sup>, 大西悠太<sup>1</sup>, 伊藤光明<sup>1</sup>, Emma Thomas-Jones<sup>2</sup>, Ceri Morris<sup>2</sup>, Stuart Woodhead<sup>2</sup>, 東谷 忠<sup>3</sup>, 玉本博之<sup>3</sup>,  
田中宏明<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 国土環境株式会社 環境創造研究所 環境リスク研究センター, <sup>2</sup> Molecular Light Technology Research Ltd., UK,

<sup>3</sup> 独立行政法人 土木研究所 水循環研究グループ

【目的】 魚類における卵黄タンパクの前駆物質であるビテロジェニン(VTG)は、エストロゲン作用を評価するためのバイオマーカーとして注目されている。本研究では、エストロゲン作用のより効果的な評価法の確立を目的として、エストロゲン暴露時に誘導される VTG の mRNA 及びタンパク質濃度をそれぞれ Hybridization Protection Assay(HPA)法及び ELISA 法を用いて定量し、バイオマーカーとしての有効性を比較検討した。

【方法】 メダカ(*Oryzias latipes*)の雄成魚を種々の濃度(5.00-200ng/L)の 17β エストラジオール(E2)に暴露した後、E2 を含まない清浄な水で飼育し、E2 暴露中及び暴露後の肝臓における VTG の mRNA 及びタンパク質の発現量を経日的に測定した。VTG mRNA は化学発光物質 (アクリジウムエステル) を標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いた HPA 法により、また VTG タンパク質は ELISA 法により定量した。

【結果】 E2 に暴露したメダカでは、VTG の mRNA 及びタンパク質の同調した誘導が見られ、肝臓中の濃度はいずれも E2 暴露濃度及び暴露期間に依存して経日的に上昇した。一方、暴露後に清浄な飼育水に移したメダカでは、肝臓中の VTG タンパク質濃度は経日的に緩やかに減少したのに対して、VTG mRNA 濃度は急激な減少がみられた。以上の結果より、HPA 法による VTG mRNA の定量はエストロゲン作用をリアルタイムに評価するための手法として有効である可能性が示された。

### Evaluation of Estrogenic Activity Using Hybridization Protection Assay and ELISA in Medaka (*Oryzias latipes*)

Nobukazu Miyamoto<sup>1</sup>, Yuta Ohnishi<sup>1</sup>, Mitsuaki Ito<sup>1</sup>, Emma Thomas-Jones<sup>2</sup>, Ceri Morris<sup>2</sup>, Stuart Woodhead<sup>2</sup>, Tadashi Higashitani<sup>3</sup>,  
Hiroyuki Tamamoto<sup>3</sup>, and Hiroaki Tanaka<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Environmental Risk Research Center, Institute of Environmental Ecology, METOCEAN Environment Inc., Japan. <sup>2</sup> Molecular Light Technology Research Ltd., UK. <sup>3</sup> Water Environment Research Group, Public Works Research Institute, Independent Administrative Institutions, Japan.

To evaluate the estrogenic activity effectively, induction of vitellogenine (VTG) mRNA and VTG protein by 17β -estradiol (E2) exposure was investigated in Medaka (*Oryzias latipes*). Mature male fishes were exposed to E2 at different concentrations (5.00 - 200 ng/L) for one or two weeks, then reared in uncontaminated water for additional few weeks. Hybridization protection assay (HPA), using specific oligonucleotide probes labeled with a chemiluminescent acridium ester, was adapted for quantitative measurement of VTG mRNA transcripts; and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for VTG protein. Results showed that E2 induced both dose-dependency and correlation between VTG mRNA and protein. When the fishes were returned to uncontaminated water after the E2 exposure, the liver VTG protein level gradually decreased, while rapid decrease was observed in the VTG mRNA level. These results suggested that the VTG mRNA-based assay might be useful for the real time evaluation of estrogenic activities.