

コイビテロジェニンの免疫測定系の確立とキンギョを用いた 暴露試験への応用

平井 政彦¹、尾田 典久¹、藤野 博良¹、深田 陽久²、原 彰彦²

¹片山化学工業㈱、²北大院水

【目的】魚類血中のビテロジェニン(Vg)は、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)のバイオマーカーとして注目されている。そこで我々は、コイ科魚類 Vg を対象とした ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)と SRID 法(寒天ゲル内一元放射免疫拡散法: single radial immunodiffusion)の 2 種の測定系の構築を行った。また、本測定系の応用としてキンギョに estradiol-17 β (E₂)を短期間暴露し、血中に誘導されてくる Vg を測定し、暴露試験モデルへの適用についても検討した。

【方法】ELISA 法/モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いる ELISA 法を構築した。コイ卵から精製した Vg 構成タンパク質である lipovitellin(Lv)を免疫抗原として、常法によりマウスモノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体を作製した。ELISA 反応条件の設定をした後、基礎性能試験を実施した。SRID 法/Lv を免疫抗原として作製したウサギポリクローナル抗体をアガロースと混合し、抗体添加寒天プレート(SRID プレート)を作製した。また、ELISA 法と SRID 法との相関性試験及び連続性試験を実施した。Vg スタンダード/コイ及びキンギョ成熟雌血清から精製した Vg を BCA 法によりタンパク定量し、既知濃度 Vg を用いた SRID 法により Vg 標準血清をそれぞれ作製した。キンギョ暴露試験/未成熟キンギョを E₂(1,10,100ppb)溶液中で 4 時間暴露後に、精製水中に移し 24 時間後に採血し、キンギョ血清中の Vg を確立した測定法により定量した。

【結果・考察】ELISA 法の測定範囲は、コイ及びキンギョとも 2.00~2,000ng/ml であった。ELISA 法のアッセイ内再現性は、3.3~5.4%、アッセイ間再現性は、2.7~6.4%であった。コイ血清を用いた添加回収試験は、95~105%であり、希釈直線性試験についても良好な結果が得られた。SRID 法の測定範囲は、コイ、キンギョとも 25~400 μ g/ml であった。ELISA 法と SRID 法の相関性試験を実施した結果、回帰直線は、 $y=1.001x+0.6$ 、相関係数=0.999、 $n=5$ であり、SRID 法と ELISA 法の連続性試験についても良好な結果を示した。ELISA 法においては、Vg 高濃度検体において、試料の希釈が煩雑となる。一方、SRID 法は、煩雑な希釈を必要としない。従って、一次スクリーニング簡易定量として、SRID 法を選択し測定範囲以下の検体については、ELISA 法により測定する事により、Vg の低濃度域から高濃度域までの測定が容易になる。また、本測定系を用いて、E₂ 溶液中でのキンギョを用いた暴露試験を実施した結果、対照群と比較して有意な血中 Vg 濃度の上昇が認められた。このことから、本測定系は、環境エストロジェンのスクリーニング等の暴露試験モデルへの適用が可能であると考えられた。

Development of ELISA and SRID for carp vitellogenin and application to the exposure examination using goldfish

¹Masahiko Hirai,¹Norihisa Oda,¹Hiroyoshi Fujino,²Haruhisa Fukada,²Akihiko Hara

¹Katayama Chemical Industries Co., LTD. Japan

²Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University. Japan

Vitellogenin (Vg) has been used as a biomarker for the survey of endocrine disrupters (environmental hormones). The object of the study was to develop enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the single radial immunodiffusion (SRID) for the carp (*Cyprinus carpio*) Vg. A short-term exposure experiment of estradiol-17 β (E₂) using goldfish (*C. auratus*) was also conducted to test the suitability of the developed assays. ELISA was developed using monoclonal and polyclonal antibodies raised against lipovitellin (anti-Lv) purified from carp eggs. The polyclonal anti-Lv was also used for SRID assay. The measurable ranges of ELISA and SRID were 2.00-2.000 ng/ml and 25-400 μ g/ml, respectively. Intra- and inter-assay variability tests in ELISA were 2.7 - 6.4% and 3.3- 5.4%, respectively. The addition-recovery test was 100 \pm 5 %. Parallelism between serially diluted serum and the standard curve confirmed no significant difference in their slopes in ELISA. The correlation line and correlation coefficient between ELISA and SRID were $y=1.001x+0.6$ and $r=0.999$, respectively. The continuity test between SRID and ELISA was observed to be consecutive. The E₂ short-term exposure experiment using immature goldfish showed that serum Vg significantly increased compared to the control group. These results established the usefulness of the assay for screening of environmental disrupters.