

キンギョにおけるビテロジェニン ELISA 系の確立とエストロゲン様作用の 検出評価法の基礎的検討

○尾形雅君、三原 茂、清水和樹、塩原麻衣子、星野 稔（静岡県大・薬）

【目的】コイ科の魚類であるキンギョは、大量生産されているため入手が容易であり、また広い温度耐性および低濃度海水耐性を有し、経時採血可能な小型魚で、飼育管理の面からも試験魚としての利点が多い。水圏環境汚染化学物質の生物影響あるいはエストロゲン様活性の検出方法として、魚類の血中ビテロジェニン(Vg)のモニタリングは有用であり、Vg の個体レベルの経時的血中動態の追跡は曝露評価に重要と考える。本研究では、キンギョ Vg の ELISA 系を確立し、さらに魚令別の血中正常値およびエストロゲン様物質投与時のキンギョ血中 Vg 動態について基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】産卵直前のワキン 4 年魚から採取した卵と血清より、リポビテリン(Lv)と Vg をそれぞれ精製し、免疫用抗原ならびに ELISA 標準品を調製した。常法によりマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を作製した後、サンドイッチ ELISA の最適条件を選択決定し、さらにバリデーションを行い、血中 Vg 測定系を確立した。確立した ELISA 系を用いて、魚齢別に雌雄の正常ワキン血中 Vg 値を測定した。また 2 年魚雄を用いて、 17β -エストラジオール(E_2)および数種のエストロゲン様物質の腹腔内単回投与および 20 日間連続経口投与による 5 日毎の血中 Vg 動態を測定した。

【結果・考察】確立した ELISA 系は Vg 0.24~1000 ng/ml の範囲で良好な用量反応性を示し、バリデーションを検討した結果、本 ELISA 系は、高感度で簡便かつ安定であり、実用的な Vg 測定系であることが示された。他魚種と同様に E_2 の単回腹腔内投与では 100 μ g と 1mg/kg b.w.群で 5 日目に血中 Vg の発現が認められた。 E_2 添加配合飼料 50 μ g E_2 /kgb.w./day 以上を投餌した群において 5 日目より血中 Vg が検出された。さらにノニルフェノールおよびビスフェノール A 投与群においても同様に Vg の発現誘導が認められた。以上、被検物質を添加した配合飼料をキンギョに投餌することにより、血中 Vg の変動を検出するエストロゲン様作用評価システムの可能性が示された。

Pilot monitoring of estrogen-like action with newly established ELISA for goldfish vitellogenin

Masaki Ogata, Shigeru Mihara, Kazuki Shimizu, Maiko Shiobara and Minoru Hoshino

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Japan

To chase continuous vitellogenin (Vg) levels in individual fish under the exposure of estrogen-like endocrine disrupting chemicals (EDCs), ELISA for goldfish (*Carassius auratus*) Vg was developed using a monoclonal antibody and a polyclonal antibody raised against goldfish lipovitellin. Vg could be assayed in the range from 0.24 to 1000 ng/ml. Serum levels of Vg were determined with two-year-old male goldfish, Wakin, after a single intraperitoneal (i.p.) injection or daily dietary administration of some EDCs. Both i.p. injection (100 μ g/kg b.w.) and daily dietary administration (50 μ g/kg b.w./day) of 17β -estradiol (E_2) have been revealed to raise serum level of Vg on the fifth day. Dietary administration of bisphenol A and nonylphenol also raised Vg level at the dose of 500 mg/kg b.w./day. Furthermore, Vg levels were chased in each fish during longer period of dietary administration of E_2 . The ELISA for goldfish Vg will be a useful tool to monitor effect of longer exposure of estrogen-like EDCs.