

魚類を用いた内分泌かく乱化学物質評価法  
に関する研究



2003年3月

長崎大学大学院生産科学研究科

石橋弘志

## 目次

### 第1章 緒言

1. 1	本研究の目的	1
1. 2	本研究に関する従来の研究	5
1. 3	本研究の概要	13
1. 4	参考文献	17

### 第2章 酵素免疫測定法によるキンギョ血中ビテロゲニン測定法の開発 と肝ミクロソーム中薬物代謝酵素活性測定法の確立

2. 1	研究目的	24
2. 2	実験方法	28
2. 2. 1	実験魚	28
2. 2. 2	使用試薬	28
2. 2. 3	魚類血漿の調製	28
2. 2. 4	HPLCによるキンギョ血中ビテロゲニンの精製	29
2. 2. 5	抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体のキンギョビテロゲニンに対するウエスタンブロットィングによる反応特異性解析	29
2. 2. 6	ELISAによるキンギョ血中ビテロゲニン測定	30
2. 2. 7	ELISAにおける血漿成分の与える影響とキンギョビテロゲニン回収率及び測定精度	31
2. 2. 8	ビスフェノール A が雄キンギョ血中ビテロゲニン合成に及ぼす	32
2. 2. 9	レゾルフィン標準溶液の作製	32
2. 2. 10	キンギョ肝ミクロソーム中における薬物代謝酵素活性誘導	33
2. 2. 11	酵素反応時間及びミクロソームタンパク量のレゾルフィン生成に及ぼす影響	33
2. 2. 12	タンパク濃度測定	34
2. 2. 13	統計解析	35
2. 3	結果	36
2. 3. 1	HPLCによる血中ビテロゲニンの分離	36

2. 3. 2	抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体に対するキンギョビテロゲニンのウエスタンブロットングによる反応特異性解析	36
2. 3. 3	ELISA におけるキンギョビテロゲニン添加回収試験	39
2. 3. 4	ビスフェノール A が雄キンギョ血中ビテロゲニン合成に及ぼす影響	43
2. 3. 5	酵素反応時間及びマイクロソームタンパク量のレゾルフィン生成に及ぼす影響	49
2. 3. 6	化学物質曝露による幼若キンギョ肝マイクロソーム中 EROD 及び MROD 活性の誘導	51
2. 4	考察	54
2. 5	参考文献	61
第3章	市販魚類用飼料による雄キンギョ血中ビテロゲニン合成と植物エストロゲン含量	67
3. 1	研究目的	67
3. 2	実験方法	70
3. 2. 1	魚類用飼料と粉ミルク	70
3. 2. 2	魚類用飼料がキンギョの血中ビテロゲニン合成に及ぼす影響	70
3. 2. 2. 1	供試魚	70
3. 2. 2. 2	異なる飼料による飼育試験	70
3. 2. 3	試料採取	73
3. 2. 4	血中ビテロゲニン測定	73
3. 2. 5	魚類飼料及び粉ミルク中の植物エストロゲン測定	74
3. 2. 5. 1	化学物質	74
3. 2. 5. 2	魚類飼料からの植物エストロゲン抽出と加水分解	74
3. 2. 5. 3	乳児用粉ミルクからの植物エストロゲン抽出と加水分解	75
3. 2. 5. 4	LC-MS/MS 分析条件	75
3. 2. 6	統計解析	76
3. 3	結果	77

3. 3. 1	魚類飼料中の植物エストロゲン含量	77
3. 3. 2	乳児用粉ミルク中の植物エストロゲン含量	77
3. 3. 3	雄魚の標準体重、標準体長、GSI、HSI 及び血中ビテ ロゲニン濃度	79
3. 3. 4	卵巣摘出魚の標準体重、標準体長、GSI、HSI 及び血 中ビテロゲニン濃度	83
3. 4	考察	88
3. 5	参考文献	94
第4章 酵母 two-hybrid 法による市販実験動物用飼料中のエストロゲン 活性と植物エストロゲン含量		98
4. 1	研究目的	98
4. 2	実験方法	100
4. 2. 1	酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性試験	100
4. 2. 1. 1	試薬類	100
4. 2. 1. 2	使用菌株	100
4. 2. 1. 3	エストロゲン・アゴニスト試験	100
4. 2. 2	HPLC によるゲニステイン及びダイゼイン含量の測定	102
4. 2. 2. 1	抽出及び調製	102
4. 2. 2. 2	ゲニステイン及びダイゼイン測定条件	103
4. 3	結果および考察	105
4. 3. 1	酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性測定におけ る基礎的検討	105
4. 3. 1. 1	グルコース濃度が及ぼす影響	105
4. 3. 1. 2	内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性	110
4. 3. 2	実験動物用飼育飼料中に含まれるゲニステイン及びダ イゼイン含有量	112
4. 3. 3	植物エストロゲンのエストロゲン活性	116
4. 3. 4	実験動物用飼育飼料のエストロゲン活性	122
4. 3. 5	実験動物用飼育飼料中のエストロゲン活性と植物エス トロゲン含量	126
4. 4	参考文献	129

第5章	キンギョ血中ビテロゲニン及びステロイドホルモン合成、肝チ トクローム P450 1A 及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ 活性に及ぼすノニルフェノールと植物エストロゲン高含量飼料 の影響	133
5.1	研究目的	133
5.2	材料と方法	137
5.2.1	化学物質と魚類飼育用飼料	137
5.2.2	魚類飼育用飼料の植物エストロゲン含量とエストロゲ ン活性	137
5.2.3	供試魚と曝露実験	137
5.2.3.1	各種飼料による雄キンギョの血中ビテロゲニン 産生	137
5.2.3.2	各種飼料を与えた雄キンギョへの NP 曝露	138
5.2.4	血液とマイクロソーム試料	139
5.2.5	血中ビテロゲニン測定	141
5.2.6	血中性ステロイドホルモンの測定	141
5.2.7	薬物代謝酵素及び GST 活性測定	142
5.2.8	統計解析	143
5.3	結果	145
5.3.1	飼料中に含まれる植物エストロゲン含量	145
5.3.2	飼料中のエストロゲン活性	147
5.3.3	標準体長、標準体重、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニ ン濃度	150
5.3.4	標準体長、標準体重、GSI 及び HSI	154
5.3.5	血中ビテロゲニン	160
5.3.6	血中ステロイドホルモン	162
5.3.7	肝 EROD, MROD 及び GST 活性	164
5.4	考察	167
5.5	参考文献	176
第6章	各種バイオマーカーを指標とした河川環境中の内分泌かく乱化 学物質評価	181

6. 1	研究目的	181
6. 2	実験方法	184
6. 2. 1	一般河川環境中の環境化学物質モニタリング	184
6. 2. 1. 1	供試魚及びモニタリング地点 (1)	184
6. 2. 1. 2	供試魚及びモニタリング地点 (2)	184
6. 2. 2	試料採取	185
6. 2. 3	試薬	185
6. 2. 4	標準物質	185
6. 2. 5	装置及びHPLC測定条件	186
6. 2. 6	血中ビテロゲニン測定	187
6. 2. 7	肝中メタロチオネイン量測定	187
6. 2. 8	統計解析	188
6. 3	結果及び考察	191
6. 3. 1	一般河川環境中の環境化学物質モニタリング (1)	191
6. 3. 1. 1	生存率、GSI及びHSI	191
6. 3. 1. 2	血中ビテロゲニンと肝ミクロソーム中薬物代謝 酵素活性	195
6. 3. 2	一般河川環境中の環境化学物質モニタリング (2)	201
6. 3. 2. 1	生存率、GSI及びHSI	201
6. 3. 2. 2	血中ビテロゲニン、肝ミクロソーム中薬物代謝 酵素活性及びメタロチオネイン	204
6. 4	参考文献	212
	謝辞	219