

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

近年、外因性内分泌かく乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）がヒトや野生生物のホルモンバランスを攪乱し、様々な悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。これら内分泌かく乱化学物質の多くはエストロゲンやアンドロゲンなどステロイドホルモンと化学構造が類似しているため、それら受容体に誤って結合しアゴニストやアンタゴニスト作用を示すことが知られている¹⁾。これまで、殺虫剤や農薬など約 70 種類以上の化学物質が内分泌系を攪乱するとしてその作用が疑われており、魚類、両生類、爬虫類及び鳥類などその他多くの野生生物に対する繁殖機能低下や生殖行動異常などが報告されている^{2,3)}。また水環境中においても、芳香族有機塩素系化合物 DDT や合成洗剤の原料であるノニルフェノールなど、これまで工業用として広く使用され環境中に放出されてきた化学物質が生殖異常を引き起こす一つの原因と考えられている^{4,5)}。しかしながら、これら野生生物における生殖異常の主な原因や作用機構については未解明な部分が多く、早急な内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験法の確立が望まれている。

魚類において、血中のエストラジオール-17 β (E2) や 11-ケトテストステロンなどステロイドホルモンの解析は、内分泌かく乱化学物質曝露の生物学的指標として有用であることが知られている^{6,7)}。これらステロイドホルモンレベルに加え、雌特異タンパク質ビテロゲニンは、魚類におけるエストロゲン様物質

曝露のよい指標になると考えられている。ビテロゲニンは、鳥類、両生類及び魚類などの卵性脊椎動物の繁殖に重要な役割を担っているリントリパク質の前駆体である。脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモンはエストロゲンを合成し、血中のステロイド結合タンパクによって肝臓へ運ばれ、受容体を介して肝臓中でビテロゲニンを生合成することが知られている⁸⁾。合成されたビテロゲニンは血中に分泌され卵内へ取り込まれ、リポビテリン及びフォスビチンと呼ばれる卵黄タンパク質になると考えられている。卵黄タンパク前駆物質としてのビテロゲニンの一般的な性質としては、1) 卵黄形成期の雌に特異的に発現している、2) 卵濾胞により産生されるエストロゲンにより肝臓で産生される、3) 卵黄形成期の卵母細胞に特異的に取り込まれ、卵母細胞内で分子開裂し卵黄タンパク質となる、4) 卵発生から孵化仔稚魚が餌を捕り始めるまでの主要な栄養源であり、他の物質と結合して卵母細胞内への輸送を行う。5) カルシウム、鉄、亜鉛などを結合する糖、脂質、リンを含む高分子(分子量約45-60万)の複合タンパクであることが知られている。血中ビテロゲニンは一般に雌魚の成熟時に mg/ml レベルまで達することが知られているが、雄魚や未成熟魚ではほとんど検出されない。そのため魚類の生殖生理機構を解明することを目的に、ビテロゲニン遺伝子の発現機構、ビテロゲニンの卵黄タンパクへの特異的分解過程、卵成長及び生殖周期に伴うビテロゲニン量の変化などに関する研究が行われ、実用面でも雌に特異的に出現する性質を利用して早期雌雄判別法の指標タンパク、卵黄形成のモニタリングなどの分野で利用されていた。しかし近年、雄魚や未成熟魚でもエストロゲン様作用をもつ化学物質に曝露された場合、ビテロゲニンが誘導されることが事象として報告されており、イギリス

の Sumpter らのフィールド調査等から下水処理施設からの放流水で飼育された雄ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の血中にビテロゲニンが検出され、血中ビテロゲニンを調査することで水環境中に存在するエストロゲン様物質の存在及び影響をモニタリングしようとする試みが始まった⁹⁾。

一方、環境汚染物質の評価において、魚類のチトクローム P450 (CYPs) の発現変動を解析することは、生物学的影響評価手法として有用であることが知られている^{10,11)}。CYPs 依存性モノオキシゲナーゼは、薬物、抗生物質またはステロイド、脂肪酸、ビタミン及びプロスタグランジンなどの内因性物質も含めた広範囲の環境汚染物質の代謝（生体内変化）に重要な役割を果たしている。CYP 1A アイソフォームは、生体異物の活性化に最も重要なサブファミリーとして広く研究が行われており、ハロゲン化有機塩素系もしくはそれに関連した化合物の核内アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) に対する結合は肝臓中の CYP 1A 遺伝子の発現を誘導する¹²⁾。これらのことから、CYP 1A 依存性エトキシレゾルフィン O-脱エチル化 (EROD) 及びメトキシレゾルフィン O-脱エチル化 (MROD) 活性の評価は毒性学研究において重要であると考えられている。

本章では、生殖内分泌の研究に広く利用されているキンギョ *Carassius auratus* をモデル生物として用い、血中ビテロゲニン測定法の開発及び肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性の測定法確立を目的とした。キンギョは生殖内分泌に関する知見が豊富で、成熟しても比較的小型で扱いやすく室内実験において内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用を評価するのに最適な魚種であると考えられる。しかしながら、キンギョを用いたエストロゲン様物質の評価に

において、血中ビテロゲニンの検出は主にウエスタンブロッティング法などにより半定量的に行われており¹³⁾、高感度に定量可能な酵素免疫測定法 (ELISA) の確立は行われていない。そこで、ELISA によるキンギョ血中ビテロゲニンの定量法を開発し、内分泌かく乱作用が疑われているビスフェノール A のエストロゲン様作用について検討した。一方、キンギョにおいて、CYP 1A の誘導に関する知見はほとんどない。そこで、キンギョ肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性の簡便かつ高感度な測定法を確立し、3-メチルコラントレン曝露したキンギョにおける CYP 1A 誘導能を検討した。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 実験魚

成熟した2年魚の雌及び雄キンギョ（標準体長約7 cm）及び孵化後6ヶ月以内のキンギョを養魚業者から購入し実験に供した。

2. 2. 2 使用試薬

Aprotinin, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)、E2、3-メチルコラントレン (3-MC)、レゾルフィン、エトキシレゾルフィン、メトキシレゾルフィン、ペントキシレゾルフィン及びベンジルオキシレゾルフィンはシグマ、*novo heparin* は(株)ヘキスト・マリオン・ルセルより購入した。分子量マーカーは(株)第一化学、その他 acrylamide, *N,N'*-methylene-bis (acrylamide), sodium dodecylsulfate, *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine, ammonium peroxodisulfate, bromophenol blue, 2-mercaptoethanol, sodium azide, ビスフェノール A は(株)和光純薬工業より購入した。抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗コイビテロゲニンウサギポリクローナル抗体は(株)トランスジェニックより購入した。NADPH はオリエンタル酵母から購入した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた測定では市販の HPLC 用溶媒を、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

2. 2. 3 魚類血漿の調製

魚の尾部動静脈より 25 G の注射針を用いて採取した血液を直ちに 0.1 容量の aprotinin (10,000 KIU/ml)、0.1 % PMSF 及び heparin を含む生理食塩水溶液と混

合した。混合液を 4℃で 20 分間 (1,800×g) 遠心して血漿を分離した。血漿は、1.5 ml マイクロチューブに分注し、速やかに凍結し使用するまで-30℃で保存した。

2. 2. 4 HPLC によるキングヨ血中ビテロゲニンの精製

初期設定濃度 100 µg/l の E2 に 28 日間曝露した雄キングヨの血漿を aprotinin (10,000 KIU/ml) を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer で適宜希釈後フィルター (0.22 µm) をろ過したものを実験に供した。HPLC は、Yamanaka ら¹⁴⁾の方法に従い、陰イオン交換カラム TSK gel Super Q-5PW (7.5×7.5 mm, TOSOH) を用い、Solution A (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 及び Solution B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 1.5 M NaCl) を溶出液としてビテロゲニン画分を溶出させた。検出は紫外光検出器 (検出波長; 280nm) により行った。以下に測定条件の詳細を示した。

Column; TSK gel Super Q-5PW (7.5×7.5 mm, TOSOH)

Flow rate; 0.6 ml/min

Injection volume; 10 µl (4-fold dilution)

Gradient program; 0%B (0-4 min), 0%B→10%B (4-6 min), 10%B (6-8 min), 10%B→80%B (8-20 min), 80%B→100%B (20-22 min), 100%B (22-28 min), 100%B→0%B (28-35 min), 0%B (35-40 min)

Instrument; PU-1580, UV-1570, FP-920 (JASCO), Separation Module 2690, Scanning Fluorescence Detector 474, Photodiode Array Detector 996 (Waters alliance system)

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グヨビテロ

ゲニンに対するウエスタンブロットによる反応特異性解析

成熟した雌と無処理及び E2-100 $\mu\text{g/l}$ に 28 日間曝露した雄キングヨ血漿を用いて SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。Laemmli 法¹⁵⁾に準じて、7 % SDS-PAGE ゲルを用い、2-3 により調製した各血漿をゲル 1 枚あたり 30 mA の定電流で約 1 時間電気泳動した。電気泳動後、ゲルは常法に従い、CBB 染色、脱色を行った。他のゲルは、セミドライ式転写装置 (Sartrius, VANCOS 製) を用い、あらかじめ 20 % メタノールで約 15 分間親水化処理したニトロースメンブレンに、25 mM Tris-20% (v/v) メタノール存在下でタンパク質を 50 mA の定電流で約 1 時間転写した。100 % block ace でバックグラウンドの低下及び非特異反応防止のために約 1 時間ブロッキング後、0.05 % Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (以下 Tween-PBS と略す) で 4 倍希釈した block ace で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に調製した抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体を約 2 時間反応させた。Tween-PBS で約 20 分間、合計 3 回洗浄後、2500 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG と約 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で約 20 分間合計 3 回洗浄後、ECL・化学発光法 (Amersham 製) にて抗原抗体反応のバンドを検出した。

2. 2. 6 ELISA によるキングヨ血中ビテロゲニン測定

抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (以下 PBS と略す) で 5.0 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、96 穴マイクロプレートに 100 $\mu\text{l/well}$ 加え、4°C、一夜静置し固相化した。固相化後、抗体溶液を除去し Tween-PBS で計 3 回の洗浄を行った。バックグラウンドの低下及び非特異反応

防止のために、5 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA) 含有 Tween-PBS を 200 μ l/well 加え、室温で 1 時間静置しブロッキングした。ブロッキング後、Tween-PBS で計 3 回の洗浄を行った。1 mg/ml BSA 含有 Tween-PBS で希釈した各濃度 (500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 ng/ml 及びブランク) の精製キンギョビテロゲニン及び未知試料を 100 μ l/well 加え、室温で 1 時間静置し反応した。Tween-PBS で計 3 回の洗浄を行った後、1 mg/ml BSA 含有 Tween-PBS で 1 μ g/ml に希釈した HRP 標識抗コイビテロゲニンウサギポリクローナル抗体を 100 μ l/well 加え、室温で 1 時間静置し反応した。Tween-PBS で計 5 回の洗浄を行った後、基質液 6.5 ml に o-フェニレンジアミン (OPD) 1 錠を溶解した基質溶液を 100 μ l/well 加え、室温 15 分間静置し反応した。2N 硫酸を 50 μ l/well 加え反応を停止し、マイクロプレートリーダー (ELx808 Ultra Microplate Reader, BIO-TEK 社製) で 490 nm の吸光度を測定した。

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

精製キンギョビテロゲニンの ELISA 法による定量において、血漿成分の与える影響を検討するため、1 mg/ml BSA 含有 Tween-PBS で 2, 5 及び 20 倍に希釈した血漿に、50, 100 及び 200 ng/ml の精製キンギョビテロゲニンをそれぞれ添加し、2-6 に従いビテロゲニンの測定を行い、添加回収試験を行った。

ELISA 法における日内再現性および日間再現性を検討するため、3 種類の血漿についてビテロゲニン濃度を 2. 2. 6 に従い測定した (7 重測定)。さらに精製キンギョビテロゲニン、適宜希釈した成熟雌血漿、未成熟雌血漿、E2 処

理した雄血漿及び無処理雄血漿を ELISA に供し血漿成分の与える影響を検討した。

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影響

脱塩素水道水に溶解した初期設定濃度 1, 10, 100 及び 1000 $\mu\text{g/l}$ のビスフェノール A 試験液に、雄キンギョを飼育水温 21-23°C で 28 日間曝露した。対照群には、ビスフェノール A の助剤に用いた 0.1 ml/l エタノールのみを曝露した。各群 7 個体の雄キンギョを 25 l 容のガラス製水槽を用い曝露し、試験液は 72 時間毎に全量交換した。光周期は 12 時間明期、12 時間暗期で、試験期間中餌は与えなかった。曝露前 (Initial)、曝露 7 (Day 7) 及び 28 日後 (Day 28) に、各個体から経時的に 2. 2. 3 に従い採血を行い、血漿に分離後、ELISA によるビテロゲニン測定に供した。曝露終了後、生殖腺及び肝臓を摘出し、各個体の標準体重及び標準体長を測定した。生殖腺及び肝臓は、それぞれ体重に対する割合を生殖腺体指数 (GSI, %) 及び肝臓体指数 (HSI, %) として算出した。

2. 2. 9 レゾルフィン標準溶液の作製

レゾルフィンのストック溶液 (20 μM) は、メタノール 500 ml にレゾルフィン 2.35 mg を溶解して作製した。メタノールで 20 μM のストック溶液を希釈して標準直線用に 1 μM の溶液を作製した。この溶液は 4°C の遮光下で少なくとも 1 ヶ月は使用できた。標準直線は、25 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.7) でスト

ック溶液を希釈することによって測定毎に作製した。

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

E2 (1 $\mu\text{g/l}$)、3-MC (1 $\mu\text{g/l}$) 及びそれら混合溶液 (E2: 1 $\mu\text{g/l}$, 3-MC: 1 $\mu\text{g/l}$) をそれぞれ脱塩素水道水に溶解し、幼若キンギョに止水式で7日間曝露を行った (n=5/群)。対照群には化学物質の助剤として使用したジメチルスルフォキシド (DMSO) のみを7日間曝露した (0.1 ml/l)。曝露期間中、飼育水温は21-23°C、光周期は12時間明期、12時間暗期で維持し、餌は与えなかった。曝露前後に各個体の標準体重を測定し、解剖後、肝臓を摘出し重量を測定した。肝臓の標準体重に対する割合を肝臓体指数 (HSI, %) として算出した。肝臓は4倍量の0.25 M スクロース中でホモジナイズし、ミクロソーム画分は Arizono ら¹⁶⁾、Ariyoshi ら¹⁷⁾の方法に従って調製した。

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

CYP 1A の活性測定は、エトキシレゾルフィン (EROD) 及びメトキシレゾルフィン (MROD) の脱アルカリ化によるレゾルフィン生成を蛍光検出器が接続された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量することによって行った^{18,19)}。酵素反応時間の検討は次の条件で行った。62.5 mM リン酸バッファ、6.25 mM MgCl_2 、0.625 mM NADP^+ 、G-6-P DHase 及び2.5 μM の各種基質を含む反応液 320 μl を調製した。この溶液にミクロソーム懸濁液 40 μl (タンパク含量 100 μg)、5 nM G-6-P 40 μl を添加して22°Cの水浴中で0, 2, 4, 8, 10, 15,

20 及び 30 分間酵素反応を行った。一方、ミクロソームタンパク含量の検討は次の条件で行った。62.5 mM リン酸バッファー、6.25 mM MgCl₂、0.625 mM NADP⁺、G-6-P DHase 及び 2.5 μM の各種基質を含む反応液 320 μl を調製した。この溶液に、タンパク含量 6, 12, 25, 50 及び 100 μg のミクロソーム懸濁液 40 μl をそれぞれ加え、5 nM G-6-P 40 μl を添加して 22°C の水浴中で反応を 20 分間行った。

これらは反応後、90°C で反応を停止し、反応停止液に 400 μl の精製水を入れて 0.45 μM ポアサイズの PTFT フィルター（ミリポア、ベッドフォード、アメリカ）を通したものを測定用試料とした。

測定には蛍光検出器が接続された HPLC を使い、Waters SYMMETRY C 18 カラムに 0.001 M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) /メタノールを 60/40 (1 ml/min) で流し蛍光検出器 (Ex 550 nm, Em 585 nm) によって得られるレゾルフィンのピークを定量した。検量線作製には各濃度に希釈したレゾルフィンを用いた。HPLC は、PU-980 インテリジェントポンプ、冷却器付き 851-AS インテリジェントオートインジェクター、RF-535 蛍光検出器（島津、東京）、CTO-6A カラムオーブン（島津）、ERC-3522（エルマ、東京）、及びクロマトパックインテグレーター（東洋ソーダ、東京）がそれぞれ接続された日本分光 802-SC システムコントローラー（東京）を用いた。

2. 2. 1 2 タンパク濃度測定

タンパク濃度測定は Lowry²⁰⁾の方法に従い行った。0.25、0.5、0.75、1.0 および 1.5 mg/ml のスタンダードを 1.5 mg/ml BSA より調製した。標準物質及び未知試料を 96 穴マイクロプレート上に 5 μl ずつ分注し、各ウェルに 25 μl のアル

カリ性銅溶液を加えた。各ウェルに希釈した Folin 溶液を 200 μ l 加え、マイクロプレートミキサーで 5 秒間攪拌した。15 分後、630 nm の吸光度を測定し、得られた検量線よりタンパク濃度を測定した。

2. 2. 1 3 統計解析

全ての統計処理は、Stat View 5.0 for Macintosh を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。標準体長、標準体重、GSI、HSI、血中ビテロゲニン濃度及び肝ミクロソーム中薬物代謝酵素活性 (EROD 及び MROD, 活性) は等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は一元配置分散分析 (one way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定 (Dunnett's post-hoc 検定) により有意差を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjustment をもって Mann Whitney の U 検定を行った。また血中ビテロゲニン濃度において、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半数値を用いた。

2. 3 結果

2. 3. 1 HPLC による血中ビテロゲニンの分離

陰イオン交換カラム TSK gel Super Q-5PW (7.5×7.5 mm, TOSOH) を用い、キングヨ血中からビテロゲニンの分離を試みた (Fig. 1)。E2 処理を行っていない雄キングヨの血中においてビテロゲニンと推定されるピークは確認されなかった (Fig. 1-A)。一方、E2 処理を行った雄キングヨの血中においては、これまでの Yamanaka らの結果と同様に、溶出時間約 14~15 分にキングヨビテロゲニンと推定されるピークが確認された (Fig. 1-B)。

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グヨ ビテロゲニンのウエスタンブロットによる反応特異性解析

抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体のキングヨビテロゲニンに対する抗原抗体反応性を検討した (Fig. 2)。ウエスタンブロットを行った結果、本抗体は無処理雄キングヨ血漿において抗原抗体反応は示さなかった (Fig. 2-lane 1-4) が、卵黄形成期の成熟雌キングヨ血漿において明瞭な単一バンドが確認された (Fig. 2-lane 5)。さらに、E2 処理した雄キングヨ血漿においても同様に明瞭な単一バンドが確認された (Fig. 2-lane 6)。本抗体は卵黄形成期の雌キングヨ血漿及び E2 処理した雄キングヨ血漿中において、ビテロゲニンと推定されるタンパク質と特異的に抗原抗体反応を示し、他のタンパク質との抗原抗体反応は確認されなかった。

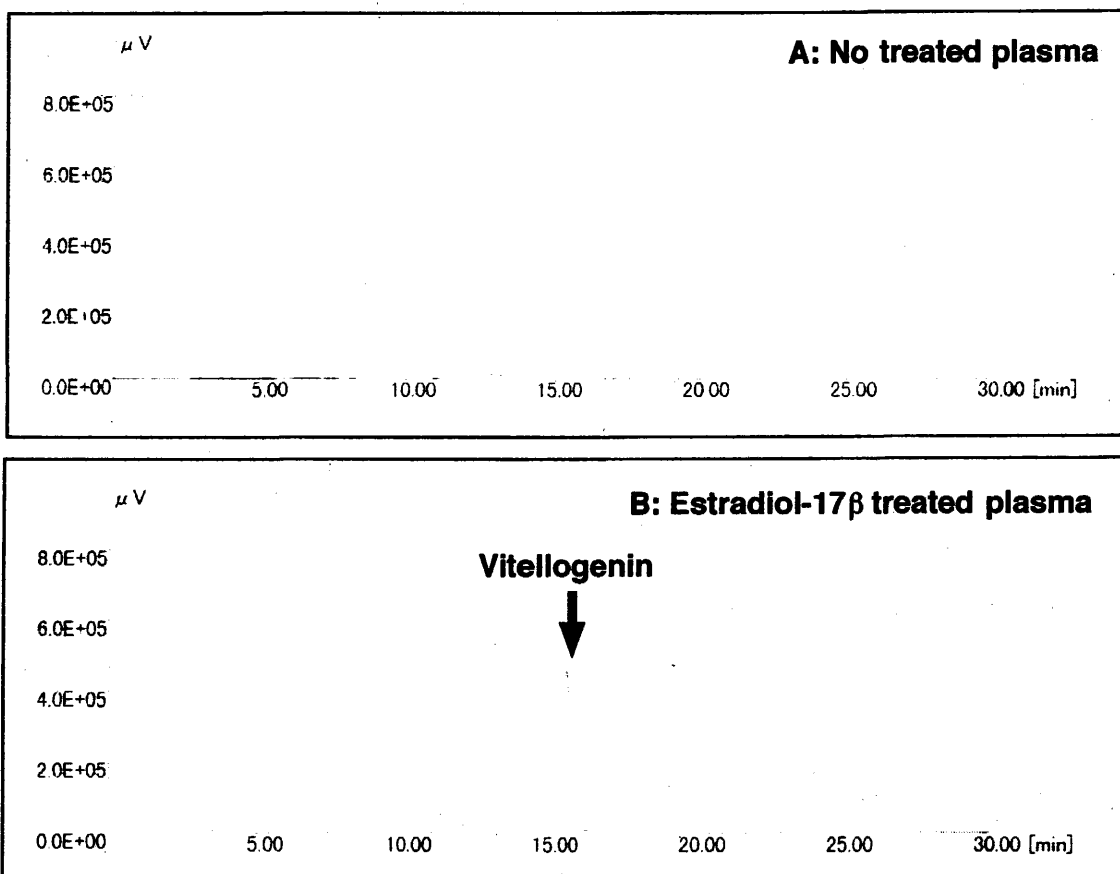


Fig. 1. Separation of plasma proteins from male goldfish no treated (A) and treated with estradiol-17 β of 100 $\mu\text{g/l}$ for 7 days (B). Column; TSK gel Super Q-5PW (7.5 \times 7.5 mm, TOSOH), Flow rate; 0.6 ml/min, Eluent; (Solution A) 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0), (Solution B) 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0)+1.5 M NaCl, Injection Volume; 10 μl (4-fold dilution), Gradient Program; 0%B (0-4 min), 0%B \rightarrow 10%B (4-6 min), 10%B (6-8 min), 10%B \rightarrow 80%B (8-20 min), 80%B \rightarrow 100%B (20-22 min), 100%B (22-28 min), 100%B \rightarrow 0%B (28-35 min), 0%B (35-40 min), Instrument; PU-1580, UV-1570, FP-920 (JASCO).

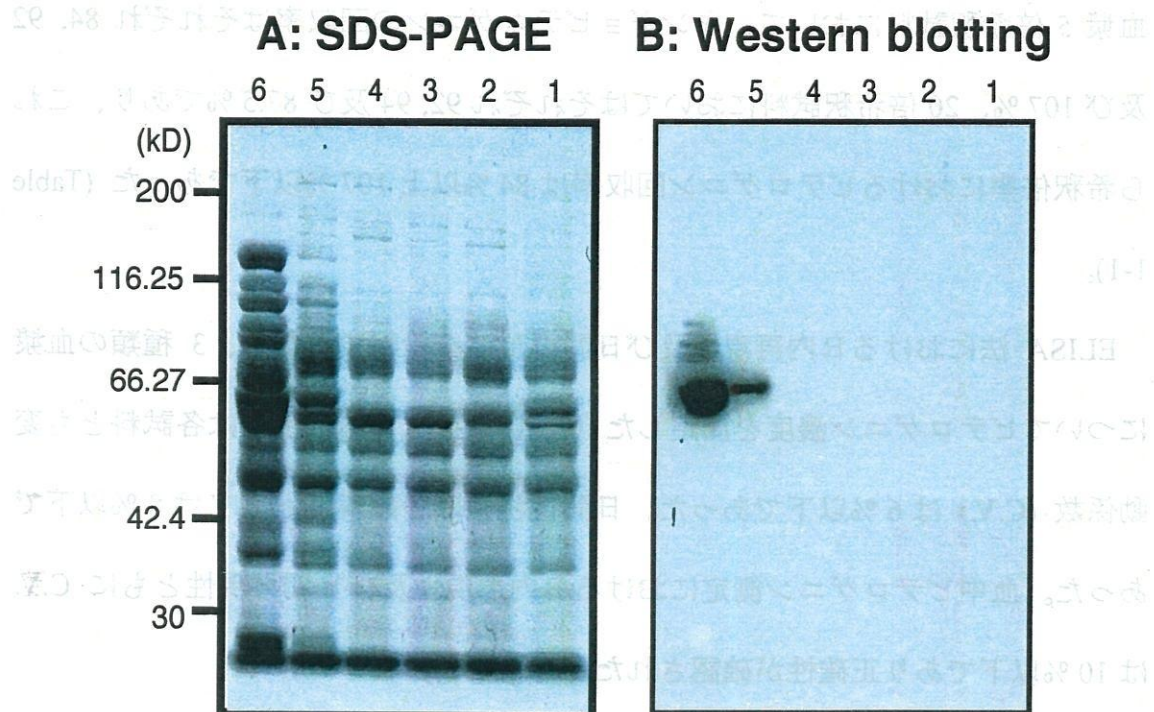


Fig. 2. Identification of goldfish vitellogenin and verification of anti-carp lipovitellin mouse antibody specificity by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (A) and Western blotting (B), respectively. 1, 2, 3 and 4: plasma from untreated male goldfish, 5: plasma from mature female goldfish, 6: plasma from estradiol-17 β -treated male goldfish.

2. 3. 3 ELISA におけるキンギョビテロゲニン添加回収試験

50, 100 及び 200 ng/ml の精製キンギョビテロゲニンを添加した血漿 2 倍希釈試料において、キンギョビテロゲニンの回収率はそれぞれ 12, 18 及び 17 %であった。一方、50, 100 及び 200 ng/ml の精製キンギョビテロゲニンを添加した血漿 5 倍希釈試料において、キンギョビテロゲニンの回収率はそれぞれ 84, 92 及び 107 %、20 倍希釈試料においてはそれぞれ 92, 94 及び 87.5 %であり、これら希釈倍率におけるビテロゲニン回収率は 84 %以上 107 %以下であった (Table 1-1)。

ELISA 法における日内再現性及び日間再現性を検討するため、3 種類の血漿についてビテロゲニン濃度を測定した (7 重測定)。日内再現性は各試料とも変動係数 (C.V.) は 6 %以下であった。日間再現性は各試料とも C.V. は 8 %以下であった。血中ビテロゲニン測定における日内再現性及び日間再現性ともに C.V. は 10 %以下であり正確性が確認された (Table 1-2)。

精製キンギョビテロゲニンの標準曲線を Fig. 3-A に示す。7.8-500 ng/ml の範囲において良好な量—反応曲線を得ることができ、これらの範囲でビテロゲニンの定量が可能となった。適宜希釈した成熟雌血漿、未成熟雌血漿、E2 処理した雄血漿及び無処理雄血漿を ELISA に供した結果、各血漿ともに希釈倍率に応じた良好な量—反応曲線を得ることができた (Fig. 3-B)。

Table 1-1. Recovery of goldfish vitellogenin in the enzyme-linked immunosorbent assays at different degrees of plasma dilution

Plasma dilution	Amount of added vitellogenin (ng/ml)	Amount of recovered vitellogenin (ng/ml)	Recovery (%)
2	50	6	12
	100	18	18
	200	34	17
5	50	42	84
	100	92	92
	200	214	107
20	50	46	92
	100	94	94
	200	175	87.5

Table 1-2. Validation of intra- and inter-assay in the goldfish vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assays

Plasma sample	Intra-assay			Inter-assay		
	Average	S.D. ^a	C.V. ^b	Average	S.D.	C.V.
Sample 1	10.16	0.55	5.43	11.41	0.65	5.69
Sample 2	540.29	15.26	2.82	558.57	14.74	2.64
Sample 3	2175.71	71.85	3.30	2512.14	178.41	7.10

^a S.D.: standard deviation.

^b C.V.: coefficient of variation.

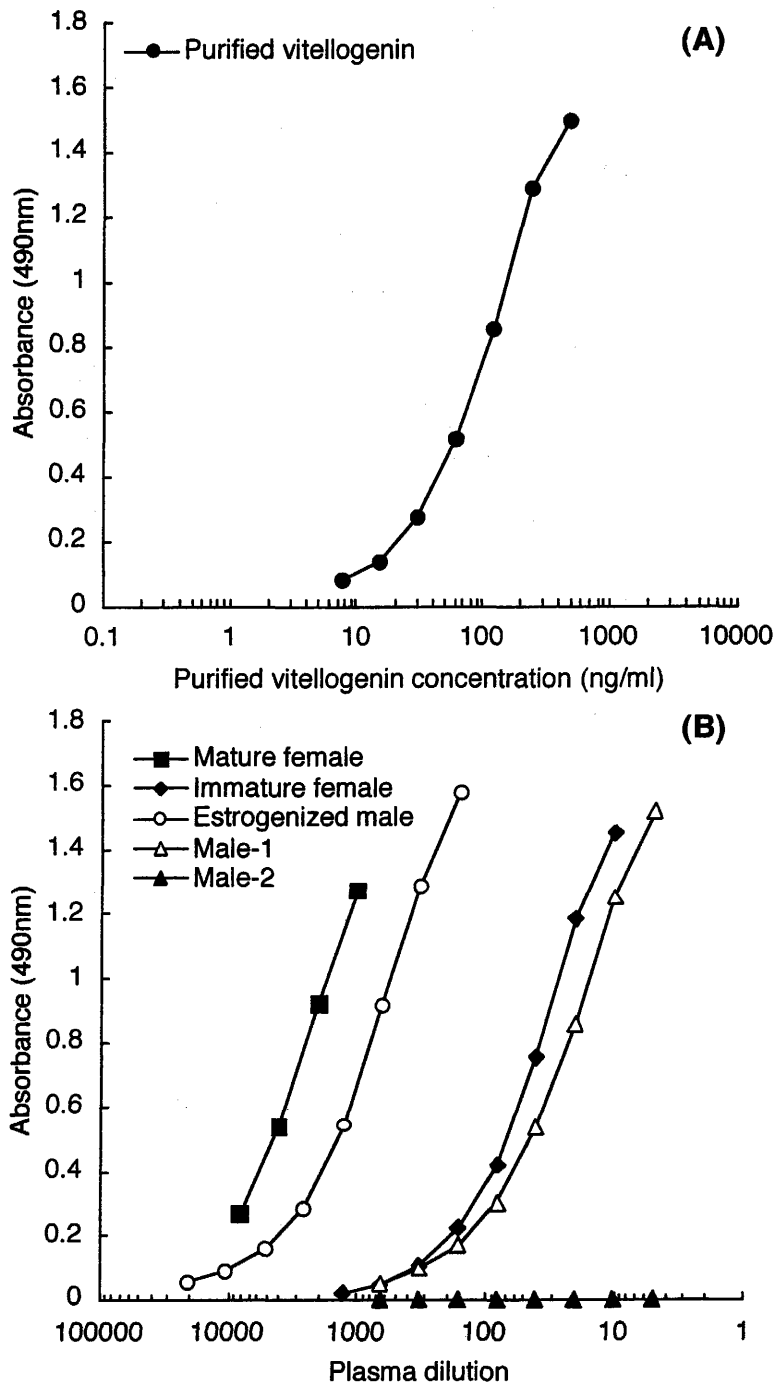


Fig. 3. Standard curve (A) of the purified goldfish vitellogenin (●) and cross-reaction (B) of plasma from mature female (■), immature female (◆), estrogenized male (○) and male goldfish (△ and ▲) in the vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay.

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

雄キンギョを初期設定濃度 1, 10, 100 及び 1000 $\mu\text{g/l}$ のビスフェノール A 試験液に 28 日間曝露した。対照群及び各ビスフェノール A 曝露群における曝露期間中の標準体長及び標準体重をそれぞれ Table 2-1 及び 2-2 に示す。標準体長は曝露期間中を通じて平均 7 cm 前後で推移し、対照群と比較して各ビスフェノール A 曝露群における有意差は認められなかった (ANOVA)。一方、標準体重は曝露期間中を通じて 10-14 g 程度で推移し、対照群と比較して各ビスフェノール A 曝露群における有意差は認められなかった (ANOVA)。

ビスフェノール A 曝露 28 日後の各曝露群における GSI 及び HSI を Fig. 4 に示す。GSI 及び HSI ともに個体差が大きくばらつきが確認された。対照群の GSI は平均 0.27 %であったのに対し、100 及び 1000 $\mu\text{g/l}$ のビスフェノール A 曝露群はそれぞれ平均 0.14 %及び 0.08 %と若干低い傾向にあった。しかしながら、対照群と比較して各ビスフェノール A 曝露群における有意差は認められなかった (ANOVA)。一方、対照群の HSI は平均 3.27 %であったのに対し、100 及び 1000 $\mu\text{g/l}$ のビスフェノール A 曝露群はそれぞれ平均 2.02 %及び 1.72 %と若干低い傾向にあった。しかしながら、対照群と比較して各ビスフェノール A 曝露群における有意差は認められなかった (ANOVA)。

ビスフェノール A 曝露 28 日後の各曝露群における血中ビテロゲニン濃度を Fig. 5 に示す。10 $\mu\text{g/l}$ 以下のビスフェノール A 曝露群における曝露 7 及び 28 日後の血中ビテロゲニン濃度は、対照群と比較して有意な増加は認められなかった。100 $\mu\text{g/l}$ のビスフェノール A 曝露群における曝露 7 日後の血中ビテロゲ

ニン濃度は、平均 49.6 ± 74.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/l}$ 曝露群においては平均 9.6 ± 14.7 mg/ml 検出され、対照群と比較して有意な増加を示した (Mann Whitney U 検定, $p < 0.05$)。さらに、曝露 28 日後においては、100 $\mu\text{g/l}$ 曝露群は平均 201.5 ± 220.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/l}$ 曝露群は平均 104.6 ± 61.0 mg/ml の血中ビテロゲニンが検出され、対照群と比較して有意な増加を示した (Mann Whitney U 検定, $p < 0.05$)。

Table 2-1. Change in body length in male goldfish exposed to bisphenol-A (BPA) concentrations of 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/l}$ for 7, 14, 21, and 28 days

BPA treatment ($\mu\text{g/l}$)	Body length (cm)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	7.28 \pm 0.62				
Control		6.98 \pm 0.41	6.95 \pm 0.54	7.03 \pm 0.56	6.90 \pm 0.28
1		7.20 \pm 0.41	7.23 \pm 0.36	7.37 \pm 0.35	7.09 \pm 0.29
10		7.17 \pm 0.68	7.21 \pm 0.67	7.37 \pm 0.50	7.14 \pm 0.63
100		7.56 \pm 0.54	7.21 \pm 0.67	7.70 \pm 0.64	7.63 \pm 0.51
1000		7.64 \pm 0.57	7.60 \pm 0.58	7.80 \pm 0.61	7.68 \pm 0.65

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.1 ml/l).

Table 2-2. Change in body weight in male goldfish exposed to bisphenol-A (BPA) concentrations of 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/l}$ for 7, 14, 21, and 28 days

BPA treatment ($\mu\text{g/l}$)	Body weight (g)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	11.8 \pm 3.0				
Control		10.0 \pm 2.0	10.5 \pm 2.5	9.8 \pm 2.1	9.5 \pm 1.3
1		11.9 \pm 2.4	12.3 \pm 2.3	11.8 \pm 2.2	12.7 \pm 2.2
10		11.6 \pm 3.0	12.1 \pm 3.3	11.6 \pm 3.2	12.5 \pm 3.5
100		13.6 \pm 3.0	12.1 \pm 3.3	13.4 \pm 3.0	13.8 \pm 3.1
1000		14.5 \pm 3.8	14.1 \pm 3.8	13.4 \pm 2.9	13.5 \pm 3.7

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.1 ml/l).

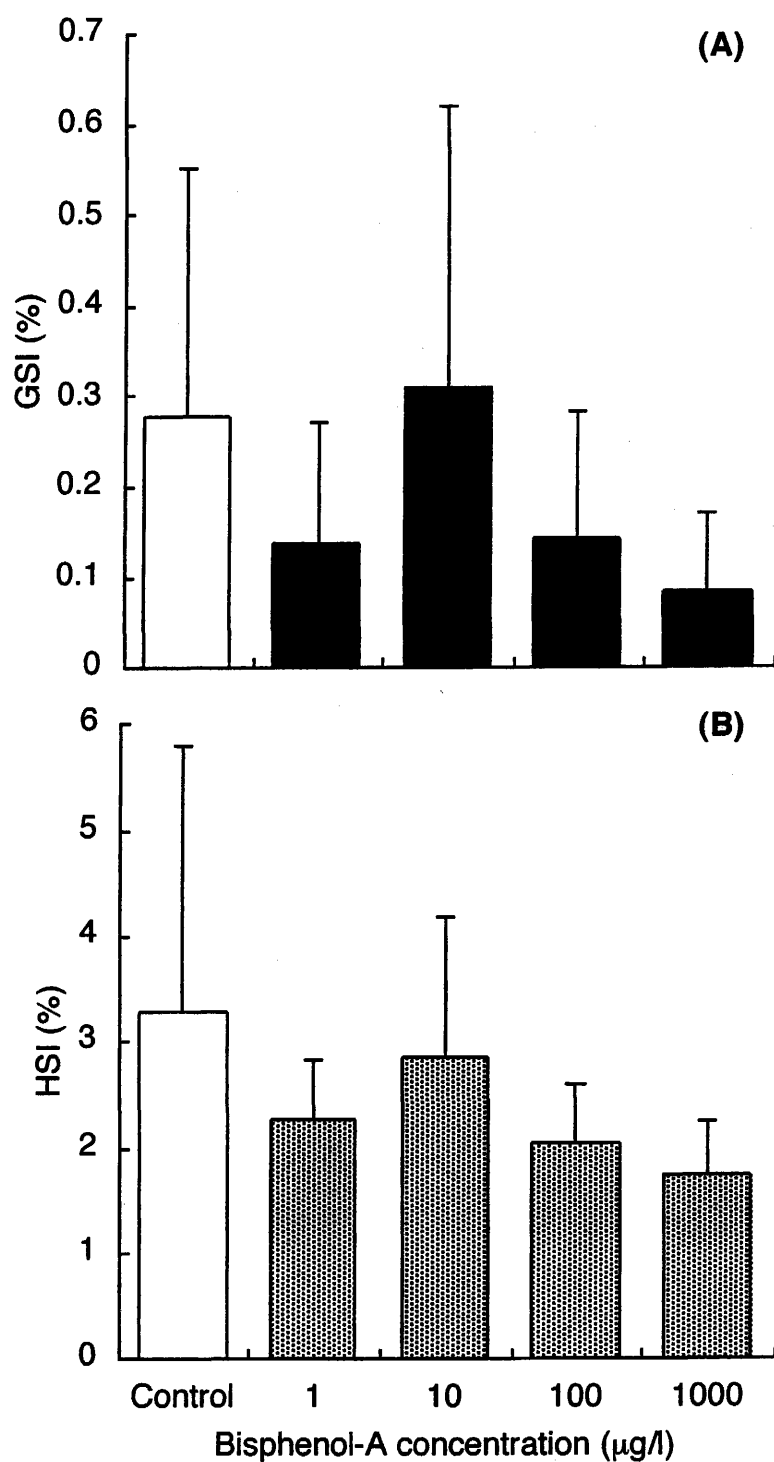


Fig. 4. GSI (A) and HSI (B) in adult male goldfish. Male goldfish were exposed to the nominal concentrations of bisphenol-A 1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/l}$ for 28 days. The control goldfish were exposed to the solvent carrier only (ethanol 0.1 ml/l). Columns and bars represent the mean and standard deviation.

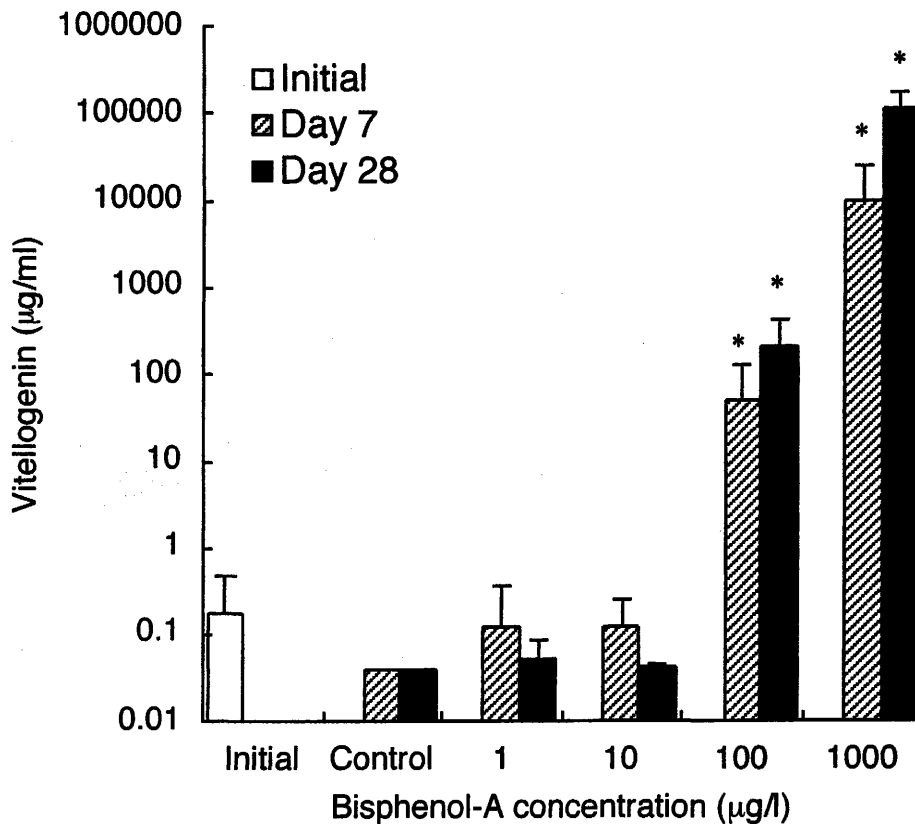


Fig. 5. Induction of vitellogenin by bisphenol-A in male goldfish. Male goldfish were exposed to the nominal concentrations of bisphenol-A 1, 10, 100, and 1000 µg/l for 28 days. The control goldfish were exposed to the solvent carrier only (ethanol 0.1 ml/l). *Significant difference from the control group (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests, $p < 0.05$). Columns and bars represent the mean and standard deviation.

2. 3. 5 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

肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性測定における最適条件を明らかにするため、酵素反応時間及びミクロソームタンパク含量のレゾルフィン生成に及ぼす影響を検討した (Fig. 6)。3-MC 処理したキンギョ肝ミクロソーム (タンパク含量 100 μg) を用い、酵素反応時間 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 及び 30 分後における肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を測定した (Fig. 6-A)。酵素反応 2 分後からレゾルフィンの生成が確認され、それ以降 20 分後まで反応時間に依存してレゾルフィンが生成し直線性を示した。しかし、酵素反応 30 分後にはレゾルフィン生成は低下する傾向を示し、基質となるエトキシレゾルフィン及びメトキシレゾルフィンが反応液中に存在しないことが示唆された。

これらのことより、酵素反応時間を 20 分に設定し、肝ミクロソームタンパク含量のレゾルフィン生成に及ぼす影響を検討した。異なるタンパク含量 (6, 12, 25, 50 及び 100 μg) の肝ミクロソームを用い EROD 及び MROD 活性を測定した。肝ミクロソームタンパク含量 6, 12, 25, 50 及び 100 μg において濃度に依存したレゾルフィン生成が認められ直線性を示した (Fig. 6-B)。

以上のことより、酵素反応時間 20 分、タンパク含量 6-100 μg のキンギョ肝ミクロソームを用いて EROD 及び MROD 活性の測定が可能となった。

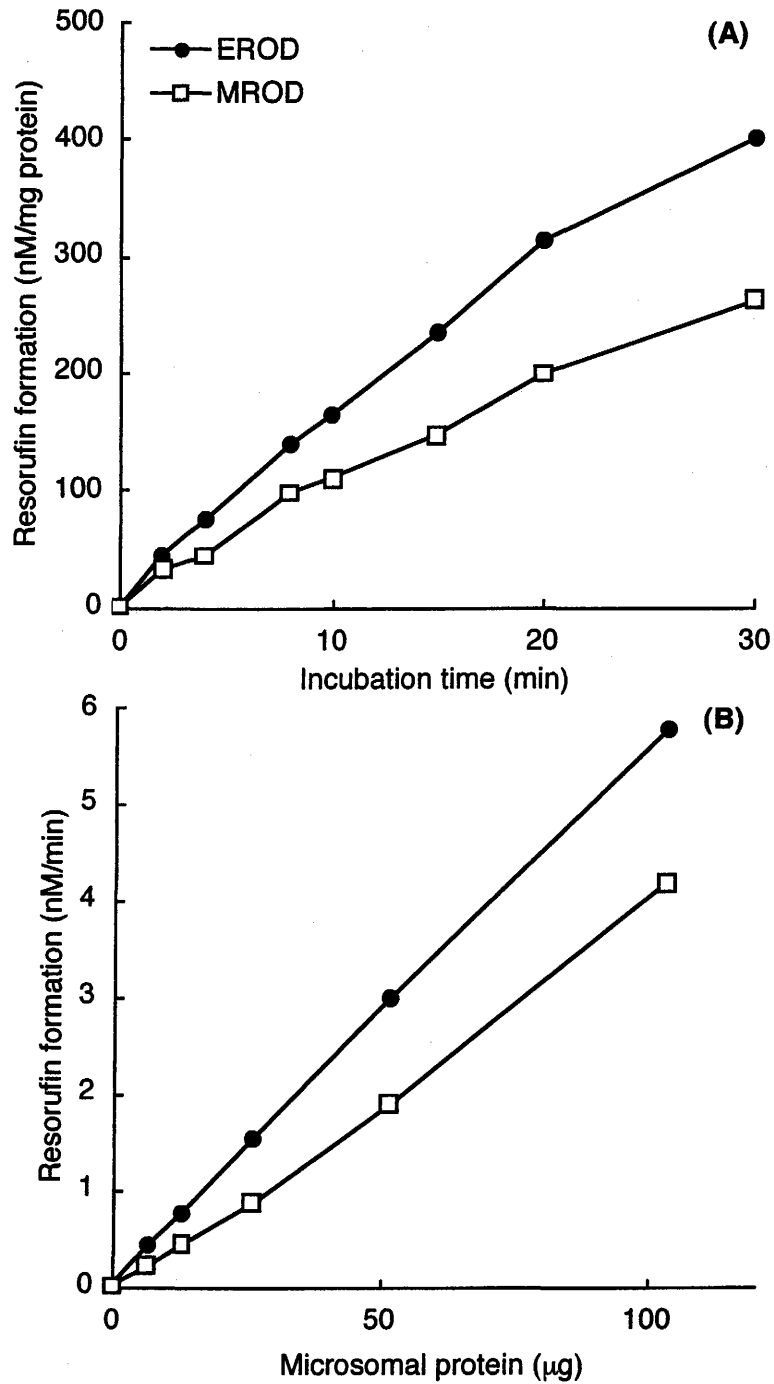


Fig. 6. Effects of incubation time (A) and protein amount (B) on EROD and MROD activities in liver microsomes from juvenile goldfish exposed to 3-MC.

2. 3. 6 化学物質曝露による幼若キンギョ肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性の誘導

幼若キンギョを初期設定濃度 1 µg/l の 3-MC、1 µg/l の E2 及びそれら混合溶液に 7 日間曝露した。曝露前後における標準体重及び HSI を Table 3 に示す。各曝露群の標準体重及び HSI に有意差は認められなかった (ANOVA)。

幼若キンギョを初期設定濃度 1 µg/l の 3-MC、1 µg/l の E2 及びそれら混合溶液に 7 日間曝露し、肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を測定した (Fig. 7)。3-MC 単独曝露群と E2 及び 3-MC 混合曝露群における肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性は、対照群と比較して有意に増加した ($p < 0.01$, Mann-Whitney's U 検定)。E2 単独曝露群における肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性は、対照群と比較して若干減少傾向を示したが有意差は認められなかった。

Table 3. Change in body weight and HSI of juvenile goldfish exposed to E2, 3-MC and a mixture of them for 7 days.

	Body weight (g)		HSI (%)	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Initial	2.54±0.51	—	0.53±0.24	—
Control	2.92±0.59	2.99±0.72	—	0.89±0.45
E2	2.34±0.32	2.36±0.29	—	0.68±0.07
3-MC	2.76±0.35	3.18±0.83	—	1.01±0.27
Mix.	2.60±0.54	2.84±0.65	—	1.08±0.45

All data represent standard deviation of the mean.

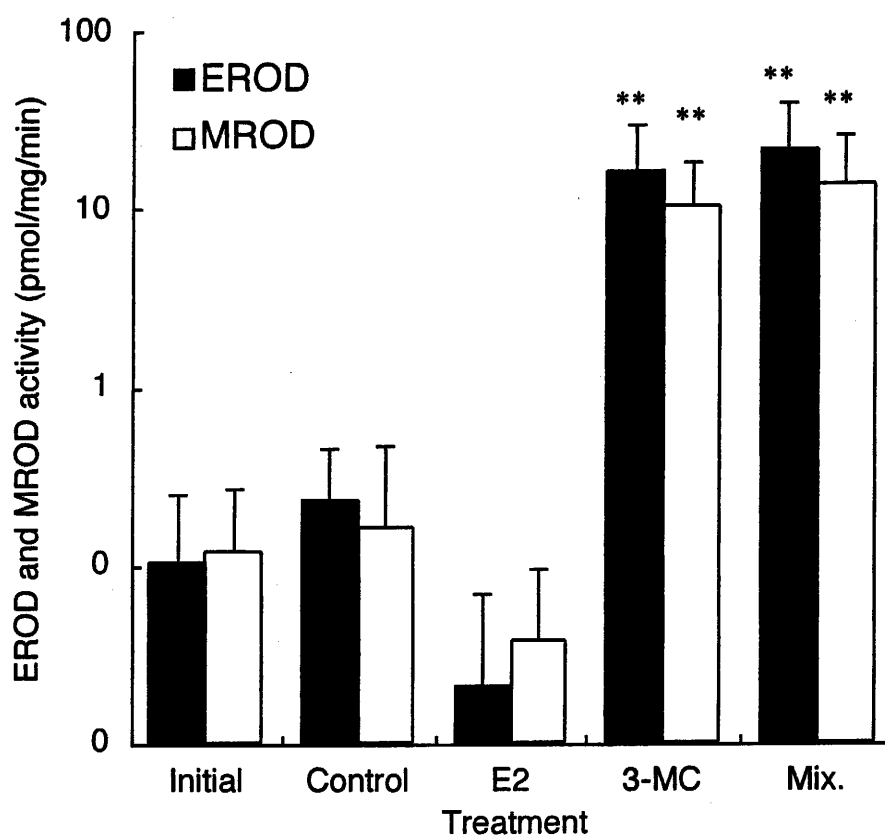


Fig. 7. EROD and MROD activities in liver microsomes from juvenile goldfish exposed to 3-MC, E2 and a mixture of them for 7 days. **Significant difference from control by Mann-Whitney's *U*-test ($p < 0.01$). Error bars indicate the standard deviation of mean.

2. 4 考察

ビテロゲニンの最も簡便な検出方法としてオクタロニー法（寒天ゲル内二重拡散法）が知られており、検出感度は 10 $\mu\text{g/ml}$ 程度である。また、定量法としてはオクタロニー法とほぼ同様な感度であるマンシーニ法（寒天ゲル内一元放射免疫拡散法）が用いられている²¹⁾。卵黄形成期ピークの血中ビテロゲニン量は mg/ml のオーダー、サケマス類では 30-40 mg/ml まで上昇するので通常はこれらの検出法・定量法で十分である。しかし、環境中に存在するような低濃度の内分泌かく乱化学物質によって誘導された微量の血中ビテロゲニンを測定するためには、より高感度の定量法である ELISA 法が有用と考えられる。これらは反応終了時に用いたトレーサーを検出し、その感度は寒天ゲル内沈降反応の約 10,000 倍、数 ng/ml の濃度が検出できる。本研究では、キンギョ血中ビテロゲニンを高感度に測定可能な ELISA 法の開発を試みた。

陰イオン交換カラムを用いキンギョ血中からビテロゲニンの分離、精製を行った。E2 処理を行っていない雄キンギョ血中からはビテロゲニンと推定されるピークは確認されなかったが、E2 処理を行った雄キンギョ血中においてキンギョビテロゲニンと推定されるピークが確認された。Yamanaka ら¹⁴⁾は陰イオン交換カラムを用いマミチヨグ *Fundulus heteroclitus* 及びマダイ *Pagrus major* のビテロゲニン精製を行っている。分離、溶出したビテロゲニンを含むと予想されたピークは、SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングによる解析においてビテロゲニンのみを含む画分であったと報告している。これらのことから、Yamanaka らと同様の手法を用いた本研究においても、HPLC によって分離されたピークはビテロゲニンのみを含む画分であることが示唆された。

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血中ビテロゲニンに対する抗原抗体反応性を検討した。ウエスタンブロッティングによる解析の結果、本抗体は無処理雄キンギョ血漿に対して抗原抗体反応は示さず、卵黄形成期の成熟雌キンギョ血漿及び E2 処理した雄キンギョ血漿において明瞭な単一バンドが確認され抗原抗体反応を示した。Hara ら²²⁾はビテロゲニンの特性として、卵黄形成期の雌血清特異性、E2 による産生誘導、卵黄タンパク質との共通抗原性を有しているものと報告している。本研究において、抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体は雄キンギョ血漿成分とは全く反応せず、成熟雌血漿、E2 処理雄血漿にのみ抗原性を示すタンパク質と反応したことから、血漿中においてキンギョビテロゲニンと共通抗原性を示したことが示唆された。

精製キンギョビテロゲニン、抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体及び HRP 標識抗コイビテロゲニンウサギポリクローナル抗体を用いサンドイッチ ELISA を構築し、ビテロゲニン添加回収試験を行った。50, 100 及び 200 ng/ml の精製キンギョビテロゲニンを添加した血漿 5 倍及び 20 倍希釈試料において、キンギョビテロゲニンの回収率は 84 %以上 107 %以下であった。一方、50, 100 及び 200 ng/ml の精製キンギョビテロゲニンを添加した血漿 2 倍希釈試料において、キンギョビテロゲニンの回収率はそれぞれ約 20 %以下であった。少なくとも血漿 2 倍希釈以下においては血漿中の妨害成分が本 ELISA 系においてビテロゲニンの定量を困難にすることが考えられた。これらのことより、今回構築した ELISA において、血漿を 5 倍以上希釈した試料中の精製キンギョビテロゲニンは良好に回収されることが示され、Yamanaka らの報告と同様

にキンギョビテロゲニンの精製が行われていることを再確認した。日内再現性及び日間再現性は、各濃度区のビテロゲニンの測定において C.V.は 10 %以下であり本 ELISA 系の正確性が確認された。また、精製キンギョビテロゲニン、適宜希釈した成熟雌血漿、未成熟雌血漿、E2 処理した雄血漿及び無処理雄血漿を ELISA に供した結果、各血漿成分ともに希釈倍率に応じた良好な量—反応曲線を得ることができた。これらのことより、本 ELISA において、少なくとも血漿試料を 5 倍以上希釈することで血中ビテロゲニンの定量が可能となり、39-2,500 ng/ml の定量範囲で再現性よく高感度に測定可能であることが示された。

Lomax ら²³⁾は、ELISA 法を用い 10-450 ng/ml の定量範囲でイングリッシュ・ソール *Pleuronectes vetulus* のビテロゲニンを測定している。Sherry ら²⁴⁾は、25-500 ng/ml の定量範囲でブラントラウト *Salmo trutta* のビテロゲニンを測定し、検出下限値は 10.5 ng/ml であったと報告している。これらの報告と比較して、本研究で確立した ELISA は、キンギョの血中ビテロゲニンを非常に高感度に測定できると考えられた。また、Tyler ら²⁵⁾は抗コイビテロゲニン抗体を用い、ファットヘッドミノー *Pimephales promelas* のビテロゲニンを ELISA で定量し、ビテロゲニン抗体の同科魚類への応用を試みている。本研究においても、コイ目コイ科の硬骨魚キンギョのビテロゲニンに交差反応を示すと考えられた抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体を用い ELISA の構築を行いビテロゲニンの定量を可能とした。これらのことより、本抗体は他のコイ科硬骨魚類のビテロゲニン測定に応用できる可能性が示唆された。また近年、アミノ酸配列が明らかとなっているビテロゲニンのペプチド断片を抗原とし、魚類以外の

両生類、爬虫類及び鳥類のビテロゲニンに反応するユニバーサル抗体の作製も試みられており²⁶⁾、今後、様々な魚種のビテロゲニンを認識するユニバーサル抗体の作製も必要かもしれない。

ビスフェノール A は耐熱食器などに使用されているポリカーボネート樹脂の原料で食品中や河川環境中において微量ながら検出される。ヒトやニジマス血中においてラットアルファフェトタンパクや性ステロイド結合タンパクに結合することが知られ²⁷⁾、酵母 two-hybrid 試験において *in vitro* でエストロゲン様作用を示すことが報告されている²⁸⁾。また、ラットに対する高濃度のビスフェノール A 曝露は繁殖毒性や細胞発達に影響を及ぼし²⁹⁾、幼若大西洋サケ *Salmo salar* においては卵膜 zona radiata タンパク質やビテロゲニン合成を引き起こすと報告されている³⁰⁾。そこで本研究において確立した ELISA を用い、初期設定濃度 1, 10, 100 及び 1000 µg/l のビスフェノール A 試験液に 28 日間曝露した雄キンギョにおける血中ビテロゲニン濃度を調べ、*in vivo* におけるビスフェノール A のエストロゲン様作用を評価した。ビスフェノール A 曝露 28 日後の各曝露群における標準体長、標準体重、GSI 及び HSI は対照群と比較して有意差は認められなかった。血中ビテロゲニン濃度は、10 µg/l 以下の曝露群において、対照群と比較して曝露 7 及び 28 日後に顕著な誘導は認められなかった。しかしながら曝露 7 日後において、100 及び 1000 µg/l 曝露群は血中ビテロゲニンの産生が確認され、対照群と比較して有意な増加を示した。さらに、曝露 28 日後においても、両曝露群の血中ビテロゲニン濃度は対照群と比較して有意な増加を示した。Tabata ら³¹⁾は、雄メダカ *Oryzias latipes* において、100 µg/l のビスフェノール A を 14 日間曝露し、血中に female-specific protein が誘導されると

報告している。また、Christiansen ら³²⁾は、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* にビスフェノール A を腹腔内投与 (50 mg/kg) し、血中ビテロゲニンに及ぼす影響を調べ、投与 6 日後における血中ビテロゲニン濃度は対照群と比較して約 700 倍増加し、さらに投与 18 日後において対照群と有意差が認められ、ビスフェノール A のエストロゲン様作用を示唆している。これらの報告と比較して魚種やビスフェノール A 曝露期間及び方法の違いを憂慮する必要があるが、本研究においても、100 及び 1000 µg/l のビスフェノール A は雄キンギョの血中ビテロゲニン産生を誘導しエストロゲン様作用を示すことが強く示唆された。

水環境中に生息する魚類において、CYP 1A 依存性酵素活性の解析は環境汚染物質曝露の指標として有用であると考えられている。本研究では、キンギョ肝ミクロソーム中における EROD 及び MROD 活性の高感度かつ簡便な測定法の確立を行った。まず、肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性測定における最適条件を明らかにするため、酵素反応時間及びミクロソームタンパク含量のレゾルフィン生成に及ぼす影響を検討し、酵素反応時間 20 分、タンパク含量 6-100 µg のキンギョ肝ミクロソームを用いて EROD 及び MROD 活性の測定が可能であることを確認した。次に、CYP 1A 誘導剤として知られている 3-MC を幼若キンギョに曝露し、肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を測定し、CYP 1A 誘導能を検討した。幼若キンギョを初期設定濃度 1 µg/l の 3-MC、1 µg/l の E2 及びそれら混合溶液に 7 日間曝露し、肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を測定した。3-MC 単独曝露群と E2 及び 3-MC 混合曝露群における肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性は、対照群と比較して有意に増加した。E2 単独曝露群においては顕著な増加は認められなかった。これらのことより、3-

MC は幼若キンギョ肝ミクロソーム中 CYP 1A1 及び 1A2 依存性の EROD 及び MROD 活性を誘導したことから、キンギョにおいても 3-MC による CYP 1A 誘導能が示唆され、これまでのニジマス *Oncorhynchus mykiss* やゼブラフィッシュ *Danio rerio* の報告と同様の結果を得ることができた^{33,34)}。しかしながら、魚類において CYP 1A の発現誘導は E2 など性ステロイドホルモンによって調節されることが示唆されている。Navas と Segner は、ニジマスにおいて、細胞毒性を示さない濃度域の E2 は、基礎レベルの肝 EROD 活性を時間及び濃度依存的に減少させ、さらにエストロゲン受容体に対してアンタゴニストを示すタモキシフェンを添加することによって E2 の抑制作用は認められなかったと報告している³⁵⁾。今回、3-MC 及び E2 混合溶液に曝露した幼若キンギョ肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性は、対照群と比較して顕著な誘導が認められたが、抑制等は本実験条件下において認められなかった。また、E2 単独曝露群におけるそれらの活性は、対照群と比較して若干減少傾向を示した。今後、E2 や 3-MC の様々な濃度域における曝露実験において、より詳細に CYP 1A の発現及び調節機構を検討する必要がある。

本研究において、キンギョ血中ビテロゲニンの ELISA による定量法の開発を行った。また、ビスフェノール A のエストロゲン様作用について雄キンギョ血中ビテロゲニン産生を指標として明らかにした。一方、キンギョ肝ミクロソーム中における EROD 及び MROD 活性の簡便かつ高感度な測定法の確立を行い、キンギョの CYP 1A 誘導能を確認した。以上のことより、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用や環境化学物質の評価においてキンギョ及び各種バイオマーカーの有用性が示され、今後、様々な化学物質のスクリーニング試

験やフィールド試験に応用できると考えられる。

2. 5 参考文献

- 1) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, Vol. 46, 282-298 (2000).
- 2) T. Colborn, F.S. vom Saal, A.M. Soto: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 101, 378-384 (1993).
- 3) T. Colborn, D. Dumanoshi, J.P. Myers: Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996).
- 4) L.J. Guillette Jr, T.S. Gross, G.R. Masson, J.M. Matter, H.F. Percival, A.R. Woodward: Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 102, 680-688 (1994).
- 5) R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, Vol. 135, 175-182 (1994).
- 6) L.C. Folmar, N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, L.J. Guillette Jr: Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 104, 1096-1101 (1996).
- 7) S.L. Goodbred, R.J. Gillion, T.S. Gross, N.P. Denslow, W.L. Bryant, T.R. Schoeb: Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad

- histopathology in common carp of United State streams: Potential for contaminant-induced endocrine disruption. U. S. Geological Survey, Open File Report 96-627, Sacramento, California, 1-47 (1997).
- 8) C. Vaillant, C. Le Guellec, F. Pakdel, Y. Valotaire: Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 70, 284-290 (1988).
- 9) J.P. Sumpter, S. Jobling: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103, 173-178 (1995).
- 10) T.D. Bucheli, K. Fent: Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, Vol. 25, 201-268 (1995).
- 11) J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt, D.E. Tillitt: Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol. 30, 347-570 (2000).
- 12) M.E. Hahn, J.J. Stegeman: Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 127, 187-198 (1994).
- 13) S. Kitamura, M. Yoshida, K. Sugihara, S. Ohta, A. Hara: Effect of fenthion on the level of vitellogenin in goldfish, *Carassius auratus*. *J. Health Sci.*, Vol. 45, 262-265 (1999).

- 14) S. Yamanaka, K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi, R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 62, 1196-1200 (1998).
- 15) U.K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, 680-685 (1970).
- 16) K. Arizono, T. Ito, M. Yamaguchi, T. Ariyoshi: Induction of zinc metallothionein in the liver of rats by lead. *Eisei Kagaku* Vo. 28, 94-98 (1982).
- 17) T. Ariyoshi, E. Takabatake, H. Remmer: Drug metabolism in ethanol induced fatty liver. *Life sci.* Vol. 9, 361-369 (1970).
- 18) N. Hanioka, N. Tatarazako, H. Jinno, K. Arizono, M. Ando: Determination of cytochrome P450 1A activities in mammalian liver microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Vol. 744, 399-406 (2000).
- 19) N. Hanioka, H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, T. Nishimura, M. Ando: *In vitro* metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 156, 195-205 (1999).
- 20) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, 265-275 (1951).
- 21) 西岡久壽彌監修, 眞崎知生編: 役に立つ免疫実験法第2版. 講談社 (1994).

- 22) 原 彰彦, 松原孝博, 実吉峯朗, 高野和則: アメマスのビテロゲニンと卵黄蛋白. 北大水産彙報, Vol. 31, 101-110 (1984).
- 23) D.P. Lomax, W.T. Roubal, J.D. Moore, L.L. Johnson: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 121, 425-36 (1998).
- 24) J. Sherry, A. Gamble, M. Fielden, P. Hodson, B. Burnison, K. Solomon: An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Sci. Total Environ.*, Vol. 225, 13-31 (1999).
- 25) C.R. Tyler, R. van Aerle, T.M. Hutchinson, S. Maddix, H. Trip: An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 18, 337-347 (1999).
- 26) S.A. Heppell, N.D. Denslow, L.C. Folmar, C.V. Sullivan: Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103 (Suppl. 7), 9-15 (1995).
- 27) S.R. Milligan, O. Khan, M. Nash: Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 112, 89-95 (1998).
- 28) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, Vol. 46, 282-298 (2000).

- 29) F.S. vom Saal, P.S. Cooke, D.L. Buchanan, P. Palanza, K.A. Thayer, S.C. Nagel, S. Parmigiani, W.V. Welshons: A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health*, Vol. 14, 239-260 (1998).
- 30) A. Arukwe, T. Celius, B.T. Walther, A. Goksoyr: Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicol.*, Vol. 49, 159-170 (2000).
- 31) A. Tabata, S. Kashiwada, N. Miyamoto, H. Ishikawa, Y. Ohnishi, M. Itoh, Y. Magara: Polyclonal antibody against egg yolk extracts of medaka, *Oryzias latipes* (teleostei), for investigating the influences of xeno-estrogens. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, Vol. 3, 15-21 (2000).
- 32) L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard: *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 1867-1874 (2000).
- 33) T. R. Henry, D. J. Nesbit, W. Heideman, R. E. Peterson: Relative potencies of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners to induce cytochrome P4501A mRNA in a zebrafish liver cell line. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 20, 1053-1058 (2001).
- 34) A. Behrens, K. Schirmer, N.C. Bols, H. Segner: Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 20, 632-643 (2001).

35) J.M. Navas, H. Segner: Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chem. Biol. Interact*, Vol. 138, 285-298 (2001).