



## 内分泌攪乱作用の計測手法としての水生生物

### (メダカ) を用いる *in vivo* バイオアッセイ\*

鱗 迫 典 久\*\*

**キーワード** ①内分泌攪乱物質 ②バイオアッセイ ③メダカ ④ビテロジェニン



#### 1. はじめに

近年、環境中に放出された化学物質がヒトや野生生物などの体内に取り込まれ、非常に低濃度でホルモン作用の攪乱を及ぼすと考えられ、内分泌攪乱化学物質(EDCs:Endocrine Disrupting Chemicals)として注目されている<sup>1,2)</sup>。これらの化学物質は、最終的に河川や海洋など水圏環境中に放出される可能性が高く、そこに生息している魚類などの水生生物に影響を与えることが懸念されている。EDCsはいわゆる有害化学物質のように急性毒性があるわけではなく、生物個体の初期発生段階での影響が成熟期に顕在化したり、次世代に影響が現れたりするといわれており、その因果関係を明確にするまでには時間をする。EDCs作用の影響を明らかにするうえで、上記の性質上、成熟期間が短く繁殖が容易な生物を用いる方が有利である。また魚類はヒトと同じ女性ホルモン(エストラジオール)を持っているために、魚類への影響を調べることにより、その結果をヒトへの影響に外挿することも不可能ではない。一方、バイオアッセイを用いて EDCs の影響を明らかにするためには *in vitro* 試験を用いた迅速かつ広範囲の化学物質のスクリーニングと *in vivo* 試験による影響の確定試験と組み合わせることが効率よい手法と考えられる。環境省では平成12年からのいわゆるミレニアムプロジェクトにより、メダカによる EDCs のリスク評価を行っており、そこで用いられている主な試験法は、レセプターバインディング試験と酵母ツーハイブリッドアッセイ試験の2つの *in vitro* 試験に加えてメダカによるビテロ

ジェニンアッセイ試験、パーシャルライフサイクル試験、フルライフサイクル試験の3種類の *in vivo* 試験である。3種類の *in vivo* 試験のうち、前2者はスクリーニング(EDCsの絞り込み)試験、後者は EDCs の確定試験と位置づけられている。各試験法はそれぞれ化学物質のばく露期間、エンドポイントの取り方等が異なっている。ここではメダカを用いた3種類の *in vivo* 試験方法を中心に概説する。

#### 2. メダカを利用した試験の利点

世界各国で魚類を用いた内分泌攪乱化学物質(EDCs)の影響評価が行われているが、主に用いられている淡水魚はファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)、メダカ(*Oryzias latipes*)の3種類である<sup>3)</sup>。米国環境保護局(USEPA)ではファットヘッドミノーが、国際経済協力機構(OECD)ではファットヘッドミノーとゼブラフィッシュが主に用いられているようである。日本では古くから発生や性分化の研究材料として用いられてきたメダカを EDCs の評価に応用する試みがなされている。これら試験系にメダカを適用するために、体色の違いから性判別可能な dr-R 系統<sup>4)</sup>、受精後3日胚で白色色素の有無により遺伝子型の雌雄を判別できる FLF 系統<sup>5)</sup>、さらには透明メダカ<sup>6)</sup>において、生殖細胞で特異的に発現することが知られているメダカ *vasa* 遺伝子のプロモーター領域にクラゲ緑色蛍光タンパク質(GFP)を組み込んだものを作製し、その蛍光により生殖細胞の分化から老化

\* The assessment of endocrine disruption in aquatic animals; *in vivo* bioassay in Medaka

\*\*Norihisa TATARAZAKO (独立行政法人国立環境研究所) National Institute for Environmental Studies

に至る時期や、卵母細胞が成熟する過程を同一の雌について継続的に観察できる系統などが開発されており<sup>7)</sup>、実用化が検討されている。ただし環境省では、遺伝子的な操作を加えていない一般的なヒメダカを中心に試験を行っている。

メダカを試験魚として用いる利点としては、①比較的簡単に入手でき、飼育/繁殖が容易である。②生育温度領域が広く、成魚になってもサイズが非常に小さいため扱いやすく、実験に必要な設備や試薬・廃液が大型魚の試験に比べて少なくてすむ。③餌、温度、水槽の広さ、水質などによって異なるが成熟までの時間が約60日と短いため、試験期間を比較的短くできる。④外見での雌雄判別が可能で、雌における卵形成および産卵時刻は光周期性に基づいているため、飼育温度や光周期を一定に保てば産卵時刻を自由に制御でき、一年中休まず産卵させることができる。⑤雌は通常1回に30前後の直径約1.2mmの卵を産み、卵膜と卵黄が透明なため、受精に伴う変化、卵割や後期発生過程も低倍率(10.50倍)の顕微鏡下で容易に観察することができる<sup>8)</sup>。⑥最近、長濱らによつて性決定遺伝子が発見された<sup>9)</sup>ため、遺伝的な性と生理的な性の区別が可能である。⑦絶滅危惧種に指定されているが、今でも日本中の小川などに生存しているために、研究室内実験でのデータだけでなく野生種の影響も調べることが可能である、などがあげられる。さらに付け加えるならば、EDCsの影響を調べるうえでのエンドポイントの一つである生殖腺の組織学的な観察を行う場合に、生殖腺が小さく、左右に分かれていなければ連続切片の標本を作りやすいこと、メダカの卵黄前駆タンパク質(ビテロジエニン)測定のキットが市販されていることなども重要な要因である。

### 3. メダカを利用した *in vivo* 試験条件

#### 3.1 飼育条件

試験を行うためには、まず試験に適した条件でメダカを飼育しなければならない。通常のメダカを飼育する条件に加えて、EDCsは、極微量で作用するという前提のもとに、影響評価を目的とする被験物質以外の化学物質のコンタミを極力防ぐ必要がある。それらの侵入経路は壁、床、天井、カーテンなどの室内環境、飼育水、エアレーション

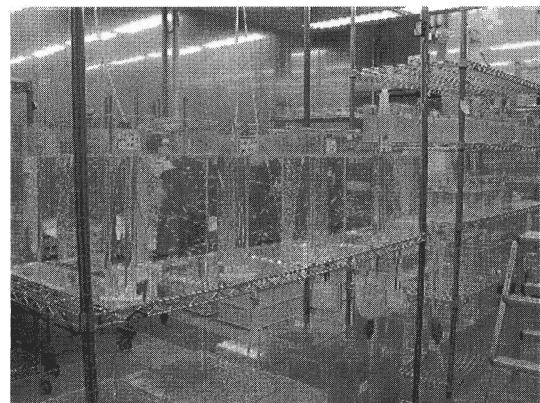


写真 1 メダカの飼育室の風景

ン用の空気、飼育装置(容器)、餌そして人が考えられる。部屋、水、空気、装置などの周辺環境からはプラスチック可塑剤、樹脂、洗剤等が、市販の餌からは動物たんぱく中の残留物質や植物由来のステロイド化合物が、人からは化粧品やハンドクリーム中に含まれるホルモン成分等が主な混入物質と考えられる。そこで当研究所では化学物質の影響を避けるため、以下の点に留意している。①試験室の天井、壁面、床面をすべてコンクリートまたはステンレスにし、壁紙等を排除した。さらに飼育・産卵室とばく露試験室を区別した。②活性炭フィルターを通してEDCsフリーであることを確認した水を飼育および試験に使用した。③給餌はメダカの孵化直後からアルテミア(*Artemia* sp.)幼生のみを与えた。市販の餌は与えなかった。④飼育・産卵用の水槽は、一体成型のオールガラス水槽とし、プラスチックおよび接着剤を一切使用していないものを用いた(写真1)。EDCsばく露用の流水試験装置の接液部はすべてガラスおよびステンレス(SUS316)を使用し、接着剤等を一切使用しなかった。また貯水タンクおよび配管の一部にSUS316とテフロンを、ポンプの接液面にはセラミックを使用した。

このような条件でメダカを飼育することにより、EDCs被ばく歴がなく、ビテロジエニン産生を始めとしたエンドポイントのバックグラウンドが低いメダカを試験に供することができた。

#### 3.2 ばく露方法

EDCsの投与試験は魚類の場合には一般的に水

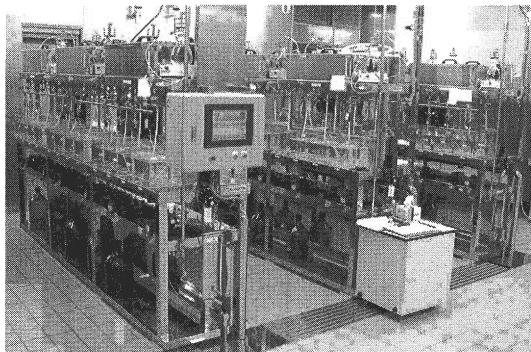


写真2 メダカ流水式ばく露装置の全景

中の濃度を投与濃度とする。低濃度でのばく露試験を行うためには、止水式または半止水式(換水式)で行うと、EDCsが容器および生物に吸着することや、光、酸化、生物による分解がおこるため濃度が減衰し、一定に保つことは難しい。流水式のばく露装置(写真2)を用いて、常に新鮮な薬剤を供給するシステムを使用する方が好ましいと言える。またEDCsのばく露量は試験区ごとに毎週1回は化学分析を行い、濃度を確認することが望まれる。当然ばく露に用いる環境も飼育環境と同様に他の化学物質の影響を受けない環境でなければならない。

### 3.3 エンドポイント

メダカを用いた *in vivo* 試験の影響評価指標(エンドポイント)として、多くの項目が提案されているが、代表的な3項目について説明する。

#### (1) 生殖腺体指数(GSI: gonadosomatic index)

生殖腺の成熟状態を表わす指標の一つであり、生殖腺重量の体重に対する百分率で表わされる。生殖腺の発達だけでなく、化学物質による肥大・萎縮などを量的に評価するうえで重要である。一般に卵巣の場合には産卵の直前に最大となるが、精巣の場合は精子形成終了時に最大となり、繁殖期に向かって減少する傾向を示す場合があるため、成熟度の評価には組織学的観察と並行して行う必要がある。

#### (2) 生殖腺の組織学的観察

生殖腺の成熟過程を質的に評価する手法の一つである。一般に卵巣においては、成熟過程は第一次成長期(染色仁期、周辺仁期)、第二次成長期(前卵黄形成期、卵黄形成期)、成熟期(核移動期、成

熟期)に大別され、精巣においては6つの発育段階(精原細胞増殖期、成熟初期、成熟中期、成熟後期、機能的成熟期、後繁殖期)に大別される。化学物質による影響評価では、精巣卵、精卵巣の出現の有無、発達段階や分布、数などの評価を行ううえで用いられる。連続切片の作成により、生殖腺の構造を立体的に捉えることも可能であり、精巣卵の立体的な分布や数の検討に応用できる。一方、精巣卵の発達段階と、周辺の精巣組織の発達段階の評価に関しては未知の部分が多く今後の課題である。

#### (3) 雄メダカのビテロジエニン(VTG: vitellogenin)生産

VTGとは、卵黄に含まれるリソタンパク質の前駆体でエストロゲンの刺激により鳥類、両生類または魚類の肝臓中で合成され、血中に分泌される雌特異的タンパク質である。血中で分子量380.500kDaの2量体として存在し、リン酸の他に糖、脂肪、カルシウムを含むタンパク質であり、成熟中の卵に取り込まれ卵内で成長する胚の栄養源となる。正常な雄ではほとんど検出されないが、EDCsばく露によって雄の肝臓または血中にVTGが検出されることから、内分泌搅乱(とくにエストロゲン様)作用のバイオマーカーとして用いられている<sup>5)</sup>。VTGの測定方法としては、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用した方法<sup>6)</sup>もあるが、“ビテロジエニンアッセイ試験”ではより高感度な酵素免疫測定法(ELISA)による測定が行われている<sup>10,11)</sup>。数種類のELISAによるメダカビテロジエニン測定キットが市販されており入手可能であるが、キット間で使われている抗体の種類や検出法が異なるため、感受性や絶対値に差がある。現段階では標準化は行われていないので使用に際しては注意を要する。

### 3.4 ビテロジエニンアッセイ試験

環境省でEDCsのスクリーニングのための *in vivo* 試験として位置付けているのが、肝臓中 VTG 產生を主な指標とした“ビテロジエニンアッセイ試験”である。ビテロジエニンアッセイ試験は SPEED'98の中の優先的に評価する20物質すべてについて行っているが、その結果のいかんに関わらず次のステップのパーシャルライフサイクル試験を行うことになっている。ビテロジエニンアッ

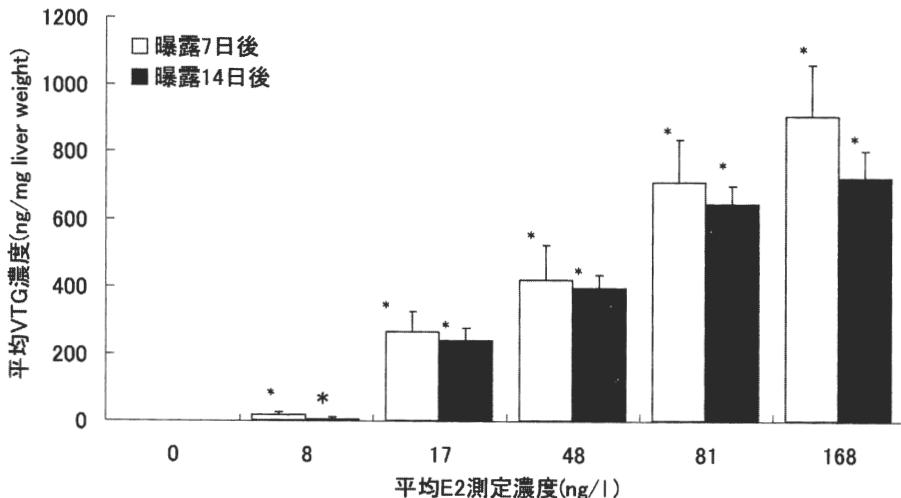


図1 各濃度の $17\beta$ -エストラジオールばく露における雄メダカの肝臓中VTG濃度データは平均±標準誤差として示した。\*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

セイ試験の条件の概要は以下のとおりである。

使 用 魚: EDCs のばく露歴のない、第2次性徵後の雄メダカ(60~90日齢)を使用  
ばく露区: コントロールを含む6濃度  
測定項目: pH, DO, 水温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 被験物質の化学分析(週1回), 明/暗: 16/8時間

給 餌: アルテミア, 3回/日, 飽食

ばく露方式: 流水式

ばく露期間: ばく露開始後1, 2, 3週目に各濃度10匹ずつのメダカを解剖

エンドポイント: 肝臓中のビテロジエニンをELISAにより測定し, 統計処理により無影響濃度(NOEC)を算出

筆者らは雄メダカを平均実測濃度8, 17, 48, 81および168ng/Lの $17\beta$ -エストラジオール(E2)に7および14日間ばく露し, 肝臓中VTG産生量を調べた。肝臓中VTG濃度はE2ばく露濃度の上昇とともに増加し, 8ng/L以上で統計学的に有意な上昇が認められた(図1)。この実験から雄メダカの肝臓中においてVTGの産生を引き起すE2のLOEC(最小影響濃度)は8ng/Lであることが明らかとなった。

### 3.5 パーシャルライフサイクル試験

環境省がEDCsの影響評価のための*in vivo*試験として位置付けているのが, 放卵後4時間以内

の受精卵から化学物質をばく露し, 第2次性徵後までの影響の有無を指標とした“パーシャルライフサイクル試験”である。パーシャルライフサイクル試験まではSPEED'98の中の優先的に評価する20物質すべてについて行っている。試験条件の概要は以下のとおりである。

使 用 卵: 環境ホルモンを疑われる物質に曝されていない親魚が産卵した, 産卵後4時間以内の受精卵(300個/試験)を使用。

ばく露区: コントロールを含む6濃度

測定項目: pH, DO, 水温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 被験物質の化学分析(週1回), 明/暗: 16/8時間

ばく露方式: 流水式

給 餌: アルテミア, 3回/日, 飽食

ばく露期間: 受精後4時間以内の卵から, 孵化後, 第2次性徵が現れるまで(約60日間)

エンドポイント: 各濃度の雌雄10個体ずつの肝臓中ビテロジエニン量をELISAにより測定。GSI, 生殖腺の組織異常観察, 第二次性徵の遅れ, 异常, 行動異常観察。統計処理により無影響濃度(NOEC)を算出

### 3.6 フルライフサイクル試験

環境省がEDCsの影響評価の確定試験として位置付けているのが, パーシャルライフサイクル試

験を2度続けて、2世代の影響を調べる“フルライフサイクル試験”である。この試験はパーシャルライフサイクル試験の結果、影響の認められた化学物質について行い、この試験で影響のあった物質について最終的なEDCsのリスク評価を行うことになる。試験条件の概要は以下のとおりである。

基本的にパーシャルライフサイクル試験と全く同じ試験条件で試験を開始する。60日後(前半の試験終了後)、パーシャルライフサイクル試験のエンドポイントと同じエンドポイントの観察を行う( $F_0$ 世代のパーシャルライフサイクル試験)。生存した $F_0$ のメダカを用いて各ばく露区において雄雌をペアリングし、化学物質のばく露を継続する。

ペアリングしたメダカの産卵行動異常、産卵数、受精率、孵化率、孵化異常等について、約40日間観察を行う。

40日間観察の終了前後2日程度の間に産卵した受精卵をばく露区毎に回収し、それらの卵( $F_1$ 世代)を用いて2度目のパーシャルライフサイクル試験を行う。

$F_1$ のパーシャルライフサイクル試験の試験条件、エンドポイントも $F_0$ 世代とまったく同等で行う。すべてのエンドポイントについて統計処理により無影響濃度(NOEC)を算出する。

#### 4. メダカを利用した *in vivo* 試験の結果

環境省ではSPEED'98で取り上げられた65物質の中から20物質を優先的にリスク評価を行う物質として選び、上記3種類の *in vivo* 試験を順次行っているが、その中で現時点(2002年10月)までに、環境省はノニルフェノール(NP)および4-*t*-オクチルフェノール(4-*t*-OP)のエストロゲン様作用を明らかにしている<sup>12)</sup>。それによると、ビテロジエニンアッセイ試験においては、NP平均測定濃度7.40, 12.8, 22.5, 56.2および118 $\mu$ g/lと4-*t*-OP平均測定濃度12.7, 27.8, 64.1, 129および296 $\mu$ g/lでそれぞれ試験したところ、NPをばく露した雄個体の肝臓中VTG濃度はばく露濃度に依存して増加し、22.5 $\mu$ g/l以上で統計学的に有意な上昇を認めている。一方、4-*t*-OPばく露した雄個体の肝臓中VTG濃度も同様にばく露濃度に依存

して増加し、64.1 $\mu$ g/l以上で統計学的に有意な上昇が認められている。これらの結果から、NPおよび4-*t*-OPはいずれもそのエストロゲン様作用により雄のメダカ肝臓中においてVTGの産生を引き起こすことが明らかとなった。

さらに、パーシャルライフサイクル試験においては、NPを平均測定濃度3.30, 6.08, 11.6, 23.5および44.7 $\mu$ g/lで試験したところ、メダカ受精卵のふ化およびふ化後の死亡において、上記濃度範囲での影響は観察されなかったが、ふ化後60日齢の成長において、44.7 $\mu$ g/l区で全長および体重が、23.5 $\mu$ g/l区で体重がそれぞれ有意に減少し、NPによる成長阻害が観察された。また、生殖腺の組織学的観察結果から、11.6 $\mu$ g/l以上で精巣卵の個体が観察され、雄個体の肝臓中VTG濃度は、11.6 $\mu$ g/l以上で統計学的に有意に上昇した。これらの結果から、NPのエストロゲン様作用により雄メダカに精巣卵形成と、VTG産生を引き起こす最小作用濃度は11.6 $\mu$ g/lであることが示唆された。

一方、4-*t*-OPについてパーシャルライフサイクル試験を平均測定濃度6.94, 11.4, 23.7, 48.1および94.0 $\mu$ g/lで試験したところ、メダカ受精卵のふ化、ふ化後の死亡および成長において、上記濃度範囲での影響は観察されなかった。生殖腺の組織学的観察結果から、11.4 $\mu$ g/l以上で精巣卵の個体が観察され、雄個体の肝臓中VTG濃度も、11.4 $\mu$ g/l以上で統計学的に有意に上昇した。これらの結果から、NPのエストロゲン様作用により雄メダカに精巣卵形成と、VTG産生を引き起こす最小作用濃度は11.4 $\mu$ g/lであることが示唆された。

また、フルライフサイクル試験において、メダカの全生涯を通じたNPの内分泌搅乱作用が評価された。メダカ(60個体/濃度)を平均測定濃度4.2, 8.2, 17.7, 51.5および183 $\mu$ g/lのNP試験液に受精卵からふ化後104日齢まで流水条件下でばく露した。183 $\mu$ g/l区では $F_0$ メダカの受精卵の生存およびふ化後の遊泳開始が有意に低下し、遊泳開始からふ化後60日齢までの累積死亡率は51.5および17.7 $\mu$ g/l区で有意に増加した。生殖腺の組織学的観察結果から17.7 $\mu$ g/l以上で精巣卵の個体が観察され、17.7 $\mu$ g/l区以下についてふ化後70日

表 1 各種試験法における NP および 4-t-OP のメダカに及ぼす最小作用濃度

試験方法	エンドポイント	最小作用濃度		(LOEC) ( $\mu\text{g/l}$ )
		NP	4-t-OP	
エストロゲン受容体結合試験	受容体結合	+	+	
ビテロジエニン産生試験	VTG 誘導	22.5	64.1	
	二次性徵	22.5	—	
パーシャルライフサイクル試験	精巣卵形成	11.6	11.4	
	VTG 誘導	11.6	11.4	
	二次性徵	51.5	—	
フルライフサイクル試験	精巣卵形成	17.7	9.92	
	受精率	(17.7)*	82.3	
予測環境濃度(PEC)		0.59	0.06	

+は陽性を示し、\*は有意差がなかったことを示す。—は現在再試中であることを示す

齢でペアリングを行い、ふ化後103日齢まで毎日産卵数および受精率を調査した結果、総産卵数への影響は観察されず、平均受精率は統計学的な有意差は認められなかったものの、対照区と比較して76%に低下した。これらのことより、NPのメダカ全生涯を通した最小作用濃度、無作用濃度はそれぞれ17.7 $\mu\text{g/l}$ および8.2 $\mu\text{g/l}$ であることが示唆された。次世代(F<sub>1</sub>)のふ化、ふ化後の死亡、成長については17.7~4.2 $\mu\text{g/l}$ の濃度範囲で影響は観察されなかつたが、ふ化後60日齢個体の生殖腺における精巣卵の出現は、17.7 $\mu\text{g/l}$ だけでなく8.2 $\mu\text{g/l}$ においても観察され、NPは17.7 $\mu\text{g/l}$ より低濃度で次世代のメダカの繁殖能力に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

フルライフサイクル試験において、メダカの全生涯を通した4-t-OPの内分泌搅乱作用を評価した。メダカ(60個体/濃度)を平均測定濃度1.68, 4.27, 9.92, 30.4および82.3 $\mu\text{g/l}$ の4-t-OP試験液に受精卵からふ化後100日齢まで流水条件下でばく露した。F<sub>0</sub>メダカの受精卵の生存およびふ化後の遊泳開始、遊泳開始からふ化後60日齢までの累積死亡率に影響はなかった。生殖腺の組織学的観察結果からF<sub>0</sub>では9.92 $\mu\text{g/l}$ 以上、F<sub>1</sub>では30.4 $\mu\text{g/l}$ 以上で精巣卵の個体が観察された。17.7 $\mu\text{g/l}$ 区以下についてふ化後70日齢で各濃度区6ペアのつがいを作り、ふ化後100日齢まで毎日産卵数および受精率を調査した結果、82.3 $\mu\text{g/l}$ で産卵数、平均受精率が低下した。VTG産生を引き起こす最小作用濃度はF<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>世代ともに9.92 $\mu\text{g/l}$ であ

ることが示唆された。以上の結果から、4-t-OPのメダカ全生涯を通した最小作用濃度、無作用濃度はそれぞれ9.92 $\mu\text{g/l}$ および4.27 $\mu\text{g/l}$ であることが示唆された。よって4-t-OPは9.92 $\mu\text{g/l}$ より低濃度で次世代のメダカの繁殖能力に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

環境省は、メダカのパーシャルライフサイクル試験で精巣卵、VTG産生が有意にみられた水中NP濃度11.6 $\mu\text{g/l}$ を性分化に関する影響の最小作用濃度とし、この場合の最大無作用濃度(NOEC)は6.08 $\mu\text{g/l}$ 、また、予測無影響濃度(PNEC:影響がないと予測される水中濃度)については、NOECに安全係数1/10を乗じた0.608 $\mu\text{g/l}$ と試算している。NPが魚類等に与える影響のリスク評価では、PNEC(0.608 $\mu\text{g/l}$ )は予測環境濃度(PEC)である0.59 $\mu\text{g/l}$ に近似しており、また、環境実態調査で得られた国内の環境水中の濃度はND(<0.03~0.1)~21 $\mu\text{g/l}$ の範囲内であり、同調査を行った1,574地点中4.5%に当たる71地点がPNECの値を超過している。これらのことから、日本の水域環境でみられるNPは、魚類への内分泌搅乱作用を通じ、生態系に影響を及ぼしている可能性があると評価している。4-t-OPによるフルライフサイクル試験のF<sub>0</sub>世代の生殖腺の組織学的観察およびVTG産生結果から、影響の最小作用濃度は9.92 $\mu\text{g/l}$ 、最大無作用濃度は4.27 $\mu\text{g/l}$ 、PECは0.06 $\mu\text{g/l}$ であるが、リスク評価については検討中である。これらのことについて結果を表1にまとめた。

## 5. おわりに

メダカを利用した *in vivo* バイオアッセイ試験について概説した。EDCs の評価においてメダカでは、VTG 以外にエストロゲンで誘導される卵膜タンパク質前駆物質(コリオゲニン:Chg)などもバイオマーカーとして有用であることが報告されており<sup>14)</sup>、エストロゲン受容体、VTG および Chg 遺伝子発現を指標としたエストロゲン様物質の評価も行われている<sup>15)</sup>。さらに近年、ほ乳類以外の脊椎動物では初めて、メダカの性決定遺伝子が発見された<sup>9)</sup>。今後、メダカの性決定遺伝子が内分泌搅乱物質など化学物質ばく露によって、どのような役割を果たしているのか、非常に興味深いところである。またメダカを用いたエストロゲンアンタゴニストの評価系の開発も行われている<sup>13)</sup>。一方、魚類における内分泌搅乱物質のアンドロゲン様作用についての知見は乏しいが、近年、淡水性硬骨魚類のイトヨ three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) のバイオマーカーを用いたアンドロゲン様物質の評価法が確立されつつある。イトヨ類の雄は産卵期に営巣行動を示し、その際にアンドロゲン支配により腎臓で営巣関連タンパク(spiggin)を合成する<sup>16)</sup>。そこで、この腎臓中 spiggin の合成を利用して VTG 同様、内分泌搅乱物質のアンドロゲン様作用を評価しようというものであるが、メダカにおいてこのようなバイオマーカーが存在するかどうかは不明である。今後、他のバイオマーカーの検索を行うとともに、さらに遺伝子に関する研究を行うことで、内分泌搅乱作用を有する化学物質や環境試料による生態影響の評価や作用機序がより詳細に解明されると考えられる。

## 参考文献

- 1) Colborn, T. et al., Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996)
- 2) Colborn, T. et al., Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378–384 (1993)
- 3) U. S. Environmental Protection Agency, Draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption (2002)
- 4) 萩野哲也, d-rR 系メダカの性転換を利用した内分泌搅乱物質のスクリーニング手法, 日本内分泌搅乱化学物質学会第一回研究発表会要旨集, 11 (1998)
- 5) Sumpf, J. P. et al., Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment *Environ. Health Perspect.*, **103**, 173–178 (1995)
- 6) Yamanaka, S. et al., Development and Application of an Effective Detection Method for Fish Plasma Vitellogenin Induced by Environmental Estrogens *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1196–1200 (1998)
- 7) Wakamatsu, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, The see-through medaka: a fish model that is transparent throughout life. **98**, 10046–10050 (2001)
- 8) 岩松鷹司, メダカ学全書 (1997)
- 9) Matsuda, M. et al., DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish, *Nature*, **417**, 559–563 (2002)
- 10) Tyler, C. R. et al., Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 47–54 (2002)
- 11) 原彰彦他, 魚類ビテロジエンの迅速検出法の開発, 日本内分泌搅乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集, 77 (1999)
- 12) 環境省, ノニルフェノールが魚類に与える内分泌搅乱作用の試験結果に関する報告 (2001)
- 13) 鍾迫典久他, メダカを用いた *in vivo* 系エストロゲンアンタゴニスト活性測定法の開発, 日本内分泌搅乱化学物質学会第四回研究発表会要旨集, 115 (2001)
- 14) 原彰彦, 内分泌搅乱物質の生態影響—魚類への影響—, 廃棄物学会誌, **10**, 278–287 (1999)
- 15) 滝上英孝他, PCR カイネティクス分析によるメダカエストロゲン応答遺伝子の発現解析第六回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 25 (2000)
- 16) Jones, I. et al., Molecular cloning and characterization of spiggin. An androgen-regulated extraorganismal adhesive with structural similarities to von willebrand factor-related proteins. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17857–17863 (2001)