

性的二色性メダカを用いる内分泌攪乱化学物質の バイオアッセイ法の開発と環境分析への応用

岡山大学薬学部 助教授 片岡洋行

1. はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）との関連を疑わせる生態系における野生生物の生殖異変、ヒトの健康影響が数多く報告され、いわゆる“環境ホルモン問題”として注目されている。これまでに、野生生物の生殖異変として、オスのメス化、生殖能の低下、孵化率の低下、子の生存率の低下、性ホルモン分泌及び活性低下、生殖行動の異常などが報告されている。また、ヒトへの健康影響については、精子数の低下、精巣癌・前立腺癌の増加、子宮内膜症、不妊症、子宮癌、アレルギーなどとの関連が示唆されている。しかし、野生生物への影響が科学的に証明されている例は多いが、ヒトへの影響については内分泌攪乱化学物質曝露量の評価が不十分であるため、内分泌攪乱化学物質汚染と健康影響との因果関係はほとんど明らかにされていない。従って、内分泌攪乱化学物質の影響を予測し、ヒトの健康に及ぼすリスクを正しく評価するためには、環境中におけるそれらの化合物の動態や曝露量を明らかにすることが重要であり、環境中からの簡便なスクリーニング法や毒性評価法などの早期確立が望まれている。

これまで、*in vivo* での毒性評価法として哺乳類、鳥類、両生類、魚類などを用いた様々なバイオアッセイ法が検討されており、特に魚類ではリン酸化蛋白質であるビテロゲニンがオスでは生成せずメスにのみ生成することから、内分泌攪乱化学物質の曝露マーカーとしてフィールド調査に利用され、メス化の指標となっている。しかし、ビテロゲニンの酵素免疫測定法では特異的な抗体を必要とし、様々な生物種に対する抗体を作成するためには手間やコストがかかる。

本研究では、遺伝的に雌雄で体色が異なる性的二色性メダカを用いて、体色変化をマーカーとした内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法とメス特有の体内リン酸化蛋白質（ビテロゲニン）中の構成ホスホアミノ酸をバイオマーカーとする内分泌攪乱作用（エストロゲン様活性）の定量評価法を開発し、環境中の有害化学物質の毒性評価に応用することを目的とした。すなわち、緋色メダカがオス、白メダカがメスとなる性的二色性メダカを用いて内分泌攪乱化学物質が性分化にどのように影響するかを明らかにし、体色で識別できる簡易スクリーニング法を検討した。また、メダカを化学物質を含む水溶液中で飼育し、体内リン酸化レベルからビテロゲニン生成に基づくオスのメス化を解析した。

2. 研究方法

2.1 メダカの体色マーカーに基づく内分泌攪乱作用評価法の検討

メダカは、鱗の形で機能的メス（背鱗と臀鱗が丸みを帯びている）とオス（背鱗と臀鱗がメス

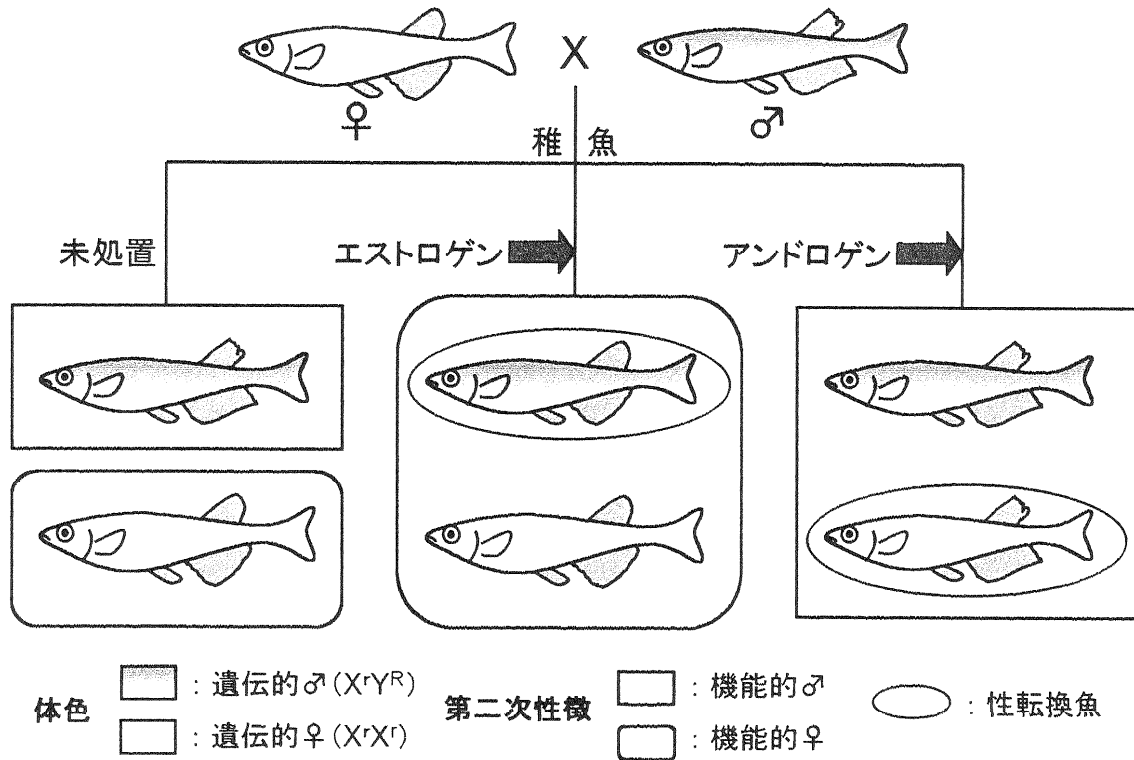


Fig. 1 d-rR系メダカを用いたホルモン投与による性転換

よりも大きく角張っている)を判別できるが、Fig. 1に示すように緋色メダカ(遺伝子型 X^rY^R)がオス、白色メダカ(遺伝子型 X^rX^r)がメスとなる性的二色性メダカを用いると、性ホルモンの作用により、機能的にメスでありながらオスの体色、あるいは機能的にオスでありながらメスの体色を持つメダカ(性転換魚)が出現する。従って、孵化後性分化が起こる2週間の間に化学物質を含む水溶液中に曝露して、性転換魚の産まれる確率から内分泌攪乱作用(エストロゲン活性またはアンドロゲン活性)を評価できる。そこで、孵化した稚魚を天然ホルモン及び内分泌攪乱化学物質に曝露し、尾鰭の鱗にできる色素胞(オスは黄色素胞を持つがメスは色素胞を持たない)を顕微鏡下観察して遺伝的性別を判定し、さらに成長した幼魚の背鰭と臀鰭の形状から機能的性別を判定した。

2.2 メス特有のリン酸化蛋白質をマーカーとする内分泌攪乱作用の評価法の開発

Fig. 2に示すように、ビテロゲニン₁は、エストロゲンによって肝臓中で生成するメスに特有のリン蛋白質であり、卵黄蛋白質ホスビチンやビテリンの前駆体となる。しかし、オスにおいても、エストロゲンを含む水溶液中で飼育するとビテロゲニン₁が生成し、精巣の一部が卵巣となって、オスからメスへの性転換が認められている。また、内分泌攪乱化学物質も同様にエストロゲン受容体に結合して性転換を起こすと考えられている。ビテロゲニン₁やホスビチン、ビテリンなどの卵黄蛋白質は、蛋白質中のアミノ酸がリン酸化されたメスに特有のリン蛋白質であることから、本研究では、オスのメダカを様々な化学物質を含む水溶液中で一定期間飼育し、生体内リン酸化蛋白質中の構成ホスホアミノ酸レベルから内分泌攪乱作用(エストロゲン様作用)を評価する方法を検討した。

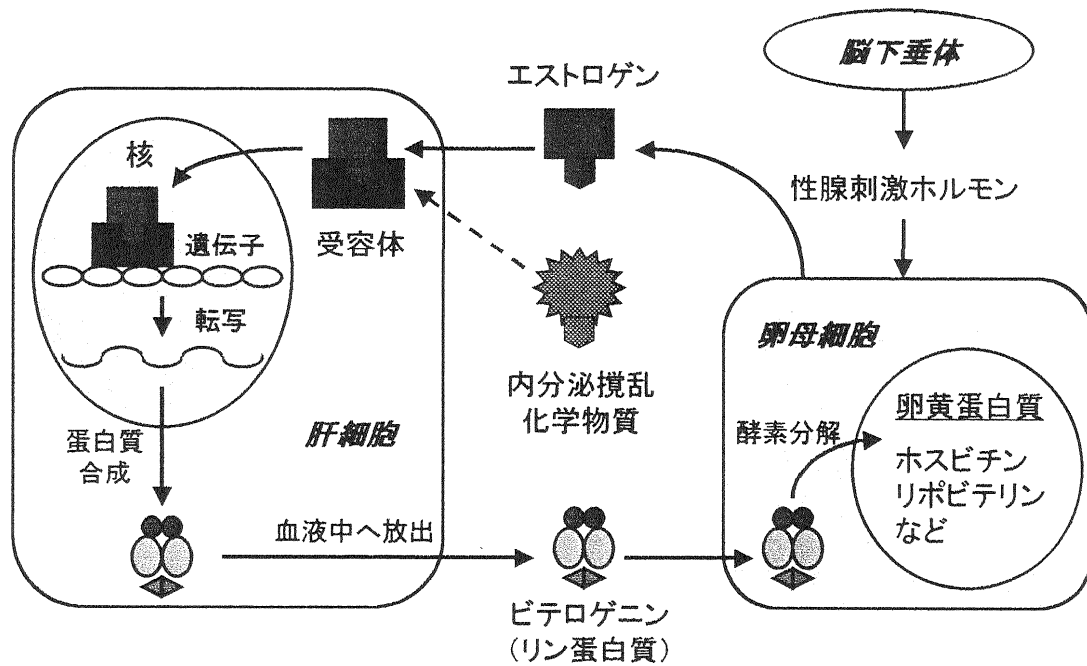


Fig. 2 エストロゲンによる魚類体内ビテロゲニンの発現

リン酸化蛋白質の分析は、加水分解後、遊離するホスホアミノ酸を我々が既に開発した高感度かつ選択的な炎光光度検出ガスクロマトグラフ (FPD-GC) 法¹⁾により測定し、どのアミノ酸のリン酸化が内分泌攪乱作用と関連しているかを内分泌攪乱化学物質の種類や濃度、曝露期間などを変えて検討した。Fig. 3は方法の概要を示している。

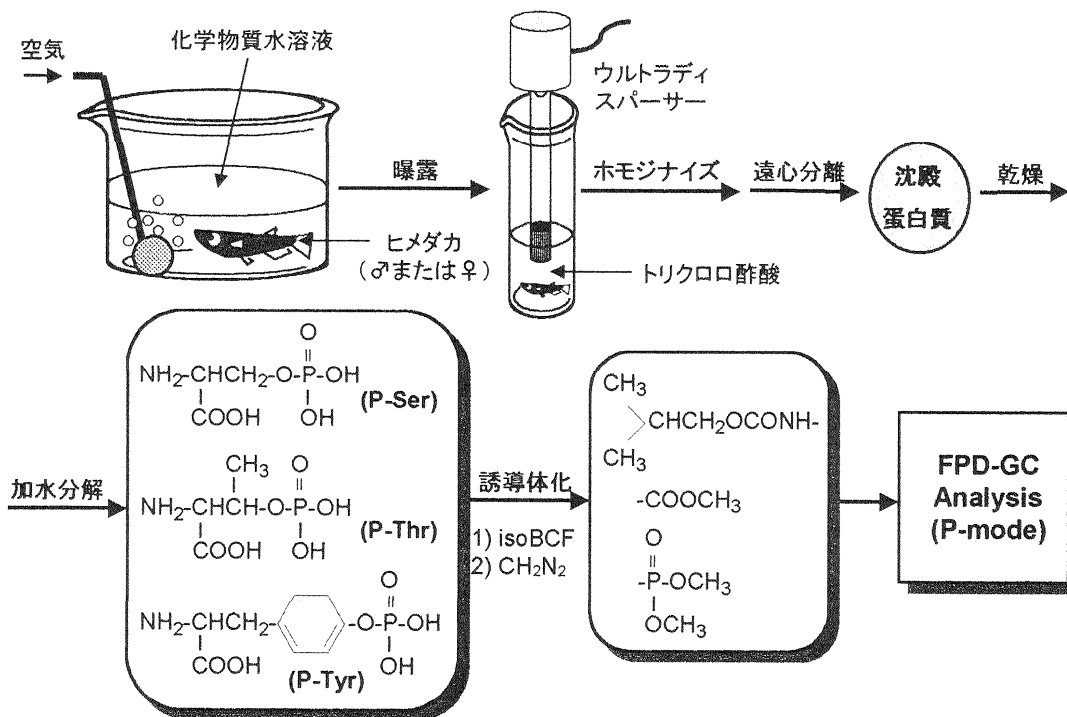


Fig. 3 化学物質曝露による体内リン酸化レベルの解析

3. 結果および考察

3.1 メダカの体色マーカーに基づく内分泌攪乱作用評価法の検討

Fig. 4 に示すように、メダカ稚魚の雌雄判別法として、孵化 3~4 週間で顕微鏡下尾鰭の色素の斑点を観察することができ、ほぼ 100%の確率で体色が緋色(色素斑点あり:下段)のものがオス、白色(色素斑点なし:上段)のものがメスとなることを確認した。この結果から、孵化後の性分化が生じる時期にメダカを化学物質に曝露させると、形態学的雌雄(鰭の形状から判別可能)と色素斑点の有無を調べることにより容易に性転換が判定できると考え、現在性転換魚の出現率を検討している。しかし、稚魚が曝露中に死亡するケースが多く、明確な結論はまだ得られていない。

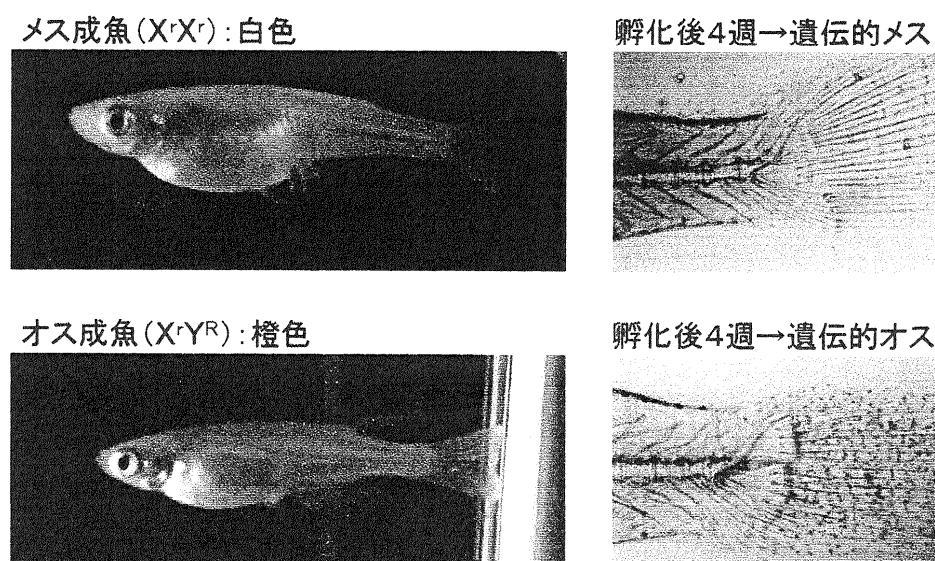


Fig. 4 性的二色性メダカ (d-rR 系) の特徴

3.2 メス特有のリン酸化蛋白質をマーカーとする内分泌攪乱作用の評価法の開発

ピテロゲニンがメスに特有のリン酸化蛋白質であることから、その構成ホスホアミノ酸を測定することにより簡単に内分泌攪乱作用を調べることができると考え、まずメダカ体内からの蛋白質の抽出方法及び構成ホスホアミノ酸への加水分解条件を確立した。曝露後のメダカは、水溶液中へ一旦戻して体表面に付着している化学物質を洗浄除去した。キムワイプで体に付着している水分を除いた後、5%トリクロロ酢酸を加えてホモジナイズし、遠心分離して得られた沈殿物を粗蛋白質試料として用いた。構成ホスホアミノ酸への加水分解条件を検討したところ、既報²⁻⁴⁾と同様に、ホスホセリン(P-Ser)及びホスホスレオニン(P-Thr)分析には6N塩酸気相中で110°C、2時間加熱、ホスホチロシン(P-Tyr)分析には3N水酸化カリウム中で130°C、1時間加熱分解する時、効率よく蛋白質からホスホアミノ酸を遊離できることがわかった。ホスホアミノ酸の分析については、既報¹⁻⁴⁾に従い、水溶液中から簡単にN-イソブトキシカルボニルメチルエステル誘導体(Fig. 3)へ変換することができ、炎光光度検出ガスクロマトグラフィー(FPD-GC)で選択的かつ高感度に分析できた。本手法を用いてメスの成熟メダカの体内ホスホアミノ酸レベルを調べた結果、特にP-Ser含量が高く、P-Thr及びP-Tyrもわずかに検出された。オスの成熟メダカをβ-エストラジオールの入った水溶液中で一定期間飼育し、メスに特有のピテロゲニン蛋白質の生成をその構

成ホスホアミノ酸レベルから測定したところ、P-Ser と P-Thr レベルが β -エストラジオールの入っていないコントロールに比べ顕著に増加したが、P-Tyr はほとんど変化しないことがわかった。また、Fig. 5 および 6 に示すように、 β -エストラジオール濃度及び曝露日数に依存して、これらのホスホアミノ酸レベルは上昇し、男性ホルモンであるテストステロン曝露ではほとんどホスホアミノ酸レベルの上昇は認められなかった。さらに、エストロゲン拮抗剤であるタモキシフェン

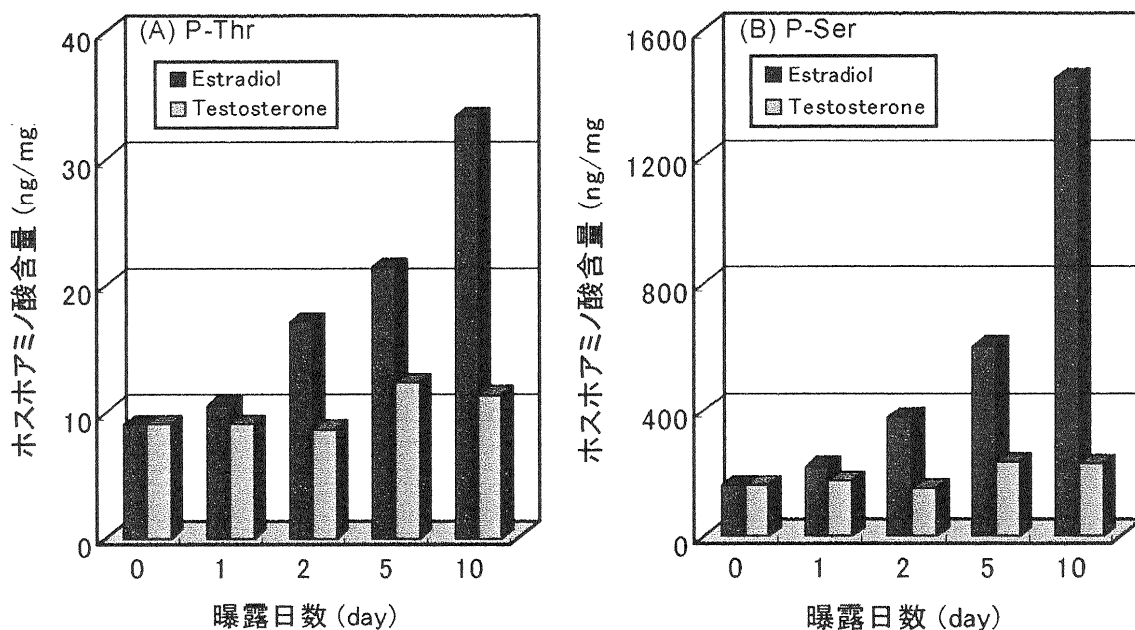


Fig. 5 メダカ体内リン酸化レベルに対する性ホルモン曝露の影響

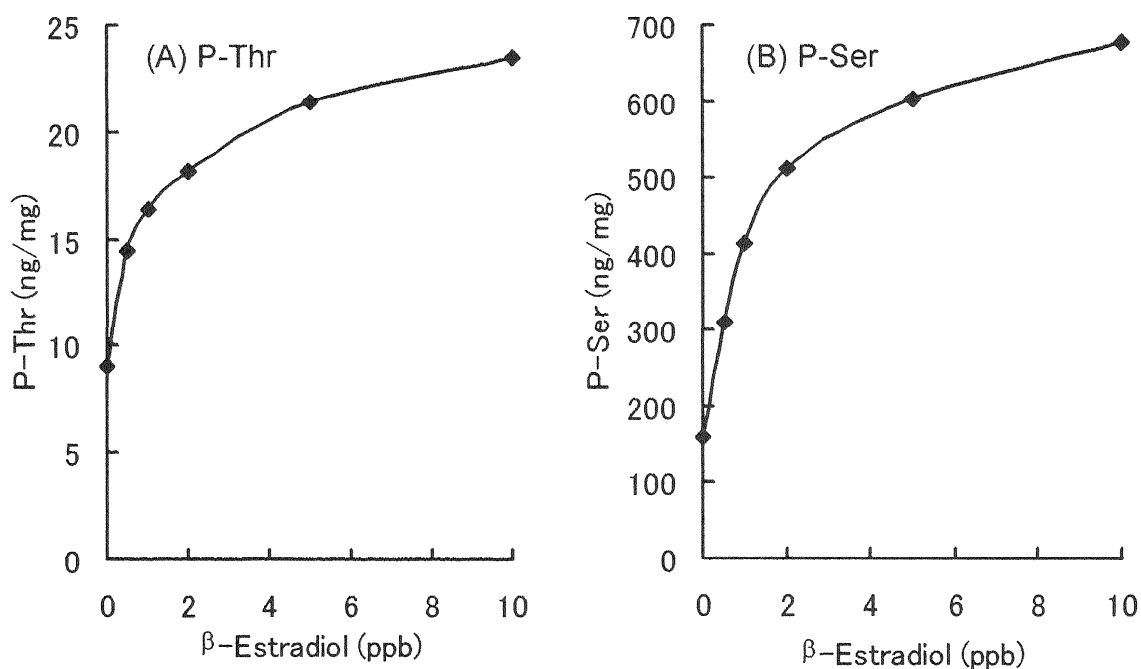


Fig. 6 メダカ体内リン酸化レベルに対する β -Estradiol 曝露濃度の影響

を同時に曝露するとこれらの上昇が抑制されることから、蛋白質リン酸化レベルがオスからメスへの性転換（エストロゲン活性）の指標になることが明らかとなった。この手法を用いて、天然及び合成ホルモンや内分泌攪乱作用が疑われている様々な化学物質の曝露によるエストロゲン様活性を調べたところ、合成女性ホルモンであるエチニールエストラジオールやジエチルstilbestrolでは、1 ppb 濃度、5 日間の曝露で著しいエストロゲン様活性の上昇が認められたが、アンドロゲンやコルチコステロイドではほとんどエストロゲン様活性は観察されなかった。また、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、ビスフェノールA、アルキルフェノール、PCB、DDT では、100 ppb 濃度、5 日間の曝露でもほとんどエストロゲン様活性は観察されなかった。今後、曝露濃度と曝露期間を延長して長期曝露によるこれらの化合物の影響を検討する必要があり、環境中に生育するメダカやその他の卵生生物における蛋白質リン酸化レベルから野生生物への汚染の実態を調査していく予定である。

4. おわりに

本研究では、性的二色性メダカの体色をマーカーとするスクリーニング法とメスに特有のリン酸化蛋白質をマーカーとする二つのバイオアッセイ法を検討した。前者については、まだ十分な結論が得られていないが、本アッセイ法が確立できれば、体色で簡単に内分泌攪乱化学物質汚染を調べることが可能となり、小学校や中学校での環境教育にも利用でき、自然環境の改善にも十分寄与できるものと考えられる。一方、後者の蛋白質リン酸化レベルを指標としたバイオアッセイ法は、エストロゲン受容体との結合に基づきエストロゲン活性を選択的に評価できるが、女性ホルモンより結合性の弱い内分泌攪乱化学物質については、さらに検討が必要である。しかし、本手法が確立されれば、短期間に確実に結果が得られ、またメダカのみならず魚類、昆虫類、両生類、鳥類などビテロゲニンを生成する様々な卵生生物に適用可能であることから、生活環境汚染や生態系への影響を把握するための有効な手法になるものと期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りましたタバイエスペック株式会社及び安田信託銀行株式会社に深く感謝いたします。

文 献

1. Kataoka, H., Sakiyama, N., Ueno, Y., Nakai, K. and Makita, M. (2000) Analysis of O-phosphoamino acids in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. *in* Methods in Molecular Biology: Amino Acid Analysis Protocols, edited by C. Cooper, N. Packer and K. Williams, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 183-206.
2. H. Kataoka, Y. Ueno and M. Makita, Analysis of O-phosphoamino acids in proteins by gas chromatography with flame photometric detection. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1587-1592 (1991).
3. H. Kataoka, K. Nakai, Y. Ueno and M. Makita, Analysis of O-phosphoamino acids in the protein fractions of mouse tissues by gas chromatography with flame photometric detection. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 1300-1301 (1992).
4. H. Kataoka, K. Nakai, and M. Makita, Analysis of free and bound O-phosphoamino acids in urine by gas chromatography with flame photometric detection. *Biomed. Chromatogr.*, 7: 184-188 (1993).