

環境ホルモンの生体影響評価のための 分析法確立に関する研究

*Establishment of the method for evaluating health risks
to EDS associated with exposure chemicals*

鈴木 潤¹, 其木茂則¹, 佐俣哲郎¹, 本田政幸¹, 宮川洋三², 河村好章³

¹麻布大学, ²山梨大学, ³愛知学院大学

Jun Suzuki¹, Shigenori Sonoki¹, Teturo Samata¹, Masayuki Honda¹, Youzou Miyakawa², Yoshiaki Kawamura³

¹ AZABU UNIV, ² YAMANASHI UNIV, ³ YAMANASHI UNIV

Abstract. The biological effects of exposure to chemicals were evaluated using plasma protein and genomic analyses. Firstly, a high-speed micro 2-dimensional electrophoresis was used for plasma protein analysis, which is an expression system. With particular regard to plasma analysis for Medaka (*Oryzias latipes*), analysis on an individual basis became possible for the first time. Application of this individualized analysis system to toxicity assessment for bisphenol A (BPA) revealed that vitellogenin was present dose-dependently in the plasma of one male Medaka. In addition, toxicity assessments using a similar system were carried out in marine invertebrates and rats. In 2-dimensional electrophoresis analysis using the body fluid of blue mussel (*Mytilus edulis*), multiple spots were confirmed on the alkaline side. The effects of BPA exposure are currently being analyzed. In addition, in rats, administration of diethylstilbestrol (DES) resulted in delayed production of $\alpha 2u$ -globulin in male individuals. Secondly, for genomic analysis, gene analysis of factors such as gene expression in plants under exposure was conducted. Subsequently, two types of glutathione S-transferase (GST) genes whose expression are enhanced upon exposure to PCB126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) and TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) were identified in the genome of Arabidopsis using cDNA microarray and real-time RT-PCR. These findings suggest the feasibility of comprehensive impact assessments for exposure to chemicals in organisms such as plants, aquatic organisms, and rats, and contributed to establishment of a biological effect assessment system in addition to proteome analysis.

1. 目的

環境中には人為由来の化学物質（環境ホルモン）が極めて多種類含まれており、ヒトは常にその暴露を受けている。これらの化学物質が大気、土壌、また海洋に影響を及ぼし、ひいてはヒトにまで及んでいる。これらの影響評価法については未整備の状態にある。そこで化学物質暴露した海生無脊椎動物

（ムラサキイガイ）の血液成分、暴露植物遺伝子発現産物、暴露ラットおよびメダカの血漿タンパク質等の分析法の有用性を検討し、出来るだけハイスループットかつ高感度分析法により、プロテオームおよびゲノムの両面からの的確な評価を下すためのシステム（体系）の構築を目指した。タンパク質分析にはわれわれが開発した30分でサンプリングから脱色までの全操作が終了する迅速2次元電気泳動¹⁾を駆

使し、プロテオーム分析と併せた生体影響評価のための分析法の確立を目指した。

2. 方法

1) 試料の調整

①投与薬液

メダカおよびムラサキイガイでは何れも Bisphenol A (BPA) 1 mg/L を中心として暴露実験を行った。一方、ラットでは Diethylstilbestrol (DES) 4 mg とコーン油 10 ml を 30 分間混合し、完全に溶解させ投与したものを DES 群とし、コーン油のみを投与したものを Control 群とした。

②投与日

メダカおよびムラサキイガイでは暴露した淡水および人工海水中で飼育した。一方、新生児雄ラットでは生後 1 日から隔日毎に投与薬液 0.025 ml を計 6 回皮下接種した。

③試料採取

メダカは心臓採血²⁾、ムラサキイガイは閉殻筋(貝柱)から採血した。また、ラットは同一個体を 9 週間飼

育し、1~9 週目の各週で尾静脈から採血を行った。

2) 2次元電気泳動法^{3)~5)}

①装置

a) 直流安定化電源

Bio-Rad の Power Pac 3000 (最大電流 400 mA, 最大電圧 3,000 V) を用いた。

②泳動槽

1次元目泳動槽, 2次元目泳動槽とも、既報¹⁾のアクリル製の自作のものを用いた。

③1次元目等電点電気泳動法

a) キャピラリーゲルの調製

内径 0.5 mm のガラス毛细管を用いて既報¹⁾のとおりで作製した。アンフォラインは pH 3.5~5 が 0.3%, pH 3.5~10 が 1.25% になるように 4% アクリルアミドゲル溶液を調製した。

b) 電気泳動

試料は 0.4 μ L (血漿量 0.2 μ L) 添加し、泳動条件は定電圧 250 V で 4 分, 500 V で 4 分, さらに 1,000 V で 4 分とした。

④2次元目密度勾配ゲル電気泳動

a) 平板ゲルの調整 (4%~17% 密度勾配ゲル)

既報¹⁾のとおり 0.5 mm 厚のガラスゲルモールドにアクリルアミド濃度が 4%~17% となるように作製した。

b) 電気泳動

泳動条件は平板ゲル 1 枚当たり 15 mA の定電流で 7 分間とした。

⑤染色および脱色

0.1% CBBR-250 溶液染色した後, 20% メタノール-酢酸溶液を加えラップをかけて振とうして脱色した。5 分ごとに脱色液を交換して約 15 分間脱色した。

⑥ゲルの写真撮影

ゲルの画像取り込みは Epson の透過光ユニット付 スキャナー GT-9600 を使用し 600 dpi でスキャンした。パソコンは Gateway の GP-550 (550 MHz, 256 MB) を用いた。

⑦ウエスタンブロット (WB) 法

ブロッティング装置はアトーのホライズブロットを用いて、真鍋らの方法³⁾に従って行った。PVDF 膜へのタンパク質の転写は、ブロッティング装置に、電気転写用緩衝液 (0.1% SDS 0.025M トリス-0.19M グリシン) を用いて、ゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で 60 分間通電し、2次元目の泳動終了後のゲル 4 枚を同時にブロットした後、1次抗血清に抗メダカ VTG を用いて、AP 染色キットで免疫染色を行った。

⑧膜の写真撮影

膜の画像取り込みは膜を乾燥させた後、ゲル同様にパソコンに撮りこんだ。

3. 結果と考察

化学物質暴露下の生体影響を知るために、プロテオームおよびゲノムの両面から解析を試みた。第一に表現系である血漿等タンパク質分析には迅速マイクロ 2次元電気泳動を駆使したが、特にメダカの血漿分析では 1 個体からの分析がはじめて可能になった。具体的には 0.2 μ L の微量試料で 40 個のタンパク質スポットが得られ、ウエスタンブロット法によるピテロジェニンの同定²⁾も可能になったので、この系を用いた化学物質、BPA の毒性評価⁶⁾への適用を試み

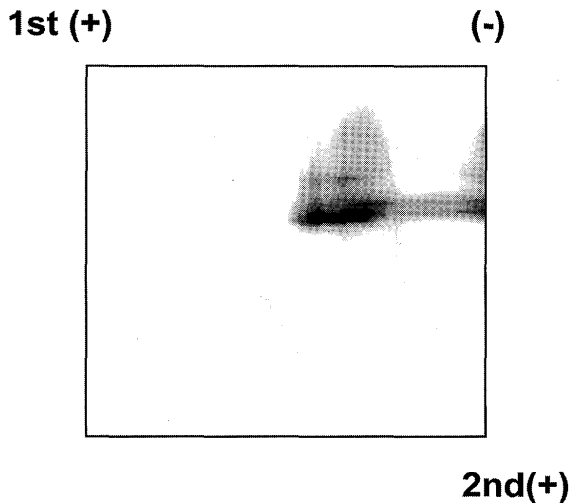


Fig. 1 Western blots pattern of VTG in of male plasma of Medaka exposed to BPA
BPA concentration; 1,000 $\mu\text{g/L}$
Analysis; Rapid micro two-dimensional electrophoresis

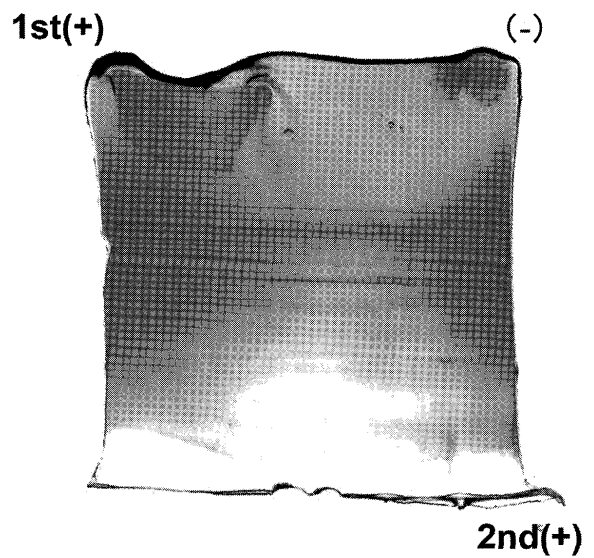


Fig. 2 Rapid micro two-dimensional electrophoresis analysis of plasma protein from *Mytilus edulis*
Sample; 0.2 μl
Analysis; Rapid micro two-dimensional electrophoresis

た。この結果、雄メダカ1個体中の血漿中にビテロジェニンが用量依存的に検出可能なことを確認した (Fig. 1)。加えて、ムラサキイガイおよびラットについても同様の系を用いて毒性影響評価を行った。ムラサキイガイの体液を用いた2次元電気泳動分析ではアルカリ領域に複数のスポットが確認できた (Fig. 2)。現在、BPA 暴露による影響を解析中である。また、ラットではDES 投与^{7)~9)}により雄個体の精子数¹⁰⁾の減少傾向 (Fig. 3) および $\alpha 2\text{u}$ -グロブリンの産生時期が遅延することが確認できた (Table 1)。なお、2次元電気泳動スポットの質量分析 (MS/MS) による同定が今後の課題であるが、18年度に導入された質量分析機器を駆使して追究したい。一方、第二のゲノム解析にはダイオキシン類暴露下の植物遺伝子発現等の遺伝子解析を行い次の結果が得られた。コプラナー PCBs の同族体の一つである PCB126 (3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニール) と TCDD 暴露により発現が促進する2種類のグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子 (GST) がこれまでに見出されているが、その内、PCB126とTCDDの両方の2時間暴露および48時間暴露により発現が3.5~4.5倍促進した At1g17180 について、そのプロモーター領域のクローニングとプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結した領域のタバコ培養細胞 BY-2 ゲノムへの導入に成功した。現在、この形質転換タ

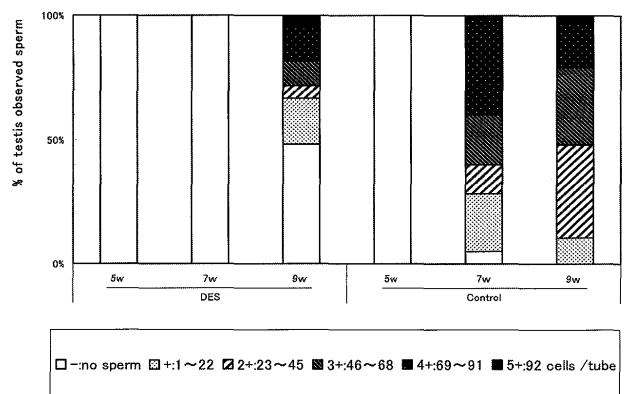


Fig. 3 Sperm production of 5-9 weeks old rats treated with DES in their newbornhood.

バコ培養細胞 BY-2 を用いて PCB126 および TCDD 暴露によるレポーター遺伝子発現変動を観察中である。この方法のコンセプトは図に示した (Fig. 4)。加えて PCB126 の2時間暴露のシロイヌナズナからタンパク質を調製し、等電点電気泳動を用いて At1g17180 と At1g78340 の発現促進を解析中であるが、今のところタンパク質レベルでの変動は確認できていない。これらの成績により植物、水生生物およびラット等を用いた化学物質の網羅的な影響評価の可能性が示唆され、プロテオーム解析につながる生体影響評価システム構築の一部を達成することができた。

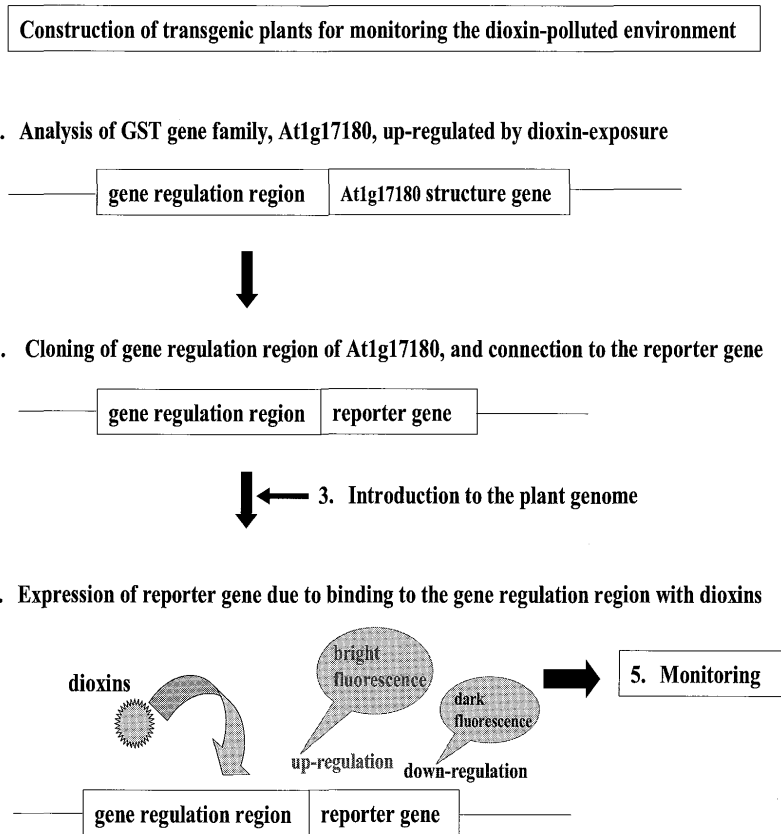


Fig. 4 Scheme of construction of transgenic plants for monitoring the dioxin-polluted environment

Table 1. Detection by M2D-EP analysis of RBP in plasma proteins of neonates rat exposed to DES.

Ages(W)	Control	Oil	DES
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	+	+	±

+; RBP protein

4. 要 約

化学物質暴露下の生体影響を血漿タンパク質およびゲノム解析より評価した。第一に表現系である血漿等タンパク質分析には迅速マイクロ2次元電気泳動

を駆使したが、特にメダカの血漿分析では1個体からの分析がはじめて可能になった。この系を用いた化学物質、BPA (bisphenol A) の毒性評価への適用を試みた結果、雄メダカ1個体中の血漿中にピテロジェニンが用量依存的に検出できることを確認した。加えて、ムラサキガイおよびラットについても同様の系を用いると、ムラサキガイの体液を用いた2次元電気泳動分析ではアルカリ側に複数のスポットが確認できた。現在、BPA暴露による影響を解析中である。また、ラットではDES (diethylstilbestrol) 投与により雄個体の精子数の減少傾向とα2u-グロブリンの産生時期が遅延することが確認できた。第二のゲノム解析には暴露下の植物遺伝子発現等の遺伝子解析を行い次の結果が得られた。cDNA マイクロアレイ、およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて、PCB126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) と TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) 暴露により発現が促進する2種類のグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子 (GST) をシロイヌナズナゲノム中に見出した。これらの成績により植物、水棲生物およびラ

ット等を用いた化学物質の網羅的な影響評価の可能性が示唆され、プロテオーム解析につながる生体影響評価システム構築の一部を達成することができた。

文 献

- 1) 田澤英克, 坂口和子, 鈴木潤. 生物物理化学 48:175-179. 2004.
- 2) 田澤英克, 坂口和子, 鈴木潤. 生物物理化学 50:75-80, 2006.
- 3) Manabe T, Takahashi Y, Higuchi N, Okuyama T. Electrophoresis. 6: 462-467. 1985.
- 4) Sakaguchi K, Suzuki J, Tanaka M and Akahori F. J Electrophoresis. 48: 105-109. 2004.
- 5) Sakaguchi K, Suzuki J, Tanaka M, Shirai M and Akahori F. J Electrophoresis 50: 25-31. 2006.
- 6) Terri Damstra, Sue Barlow, Aake Bergman, Robert Kavlock, Glen Van Der Kraak. 19: 173. 2004.
- 7) 宮本忠幸, 奈路田拓史, 香川征, 石村和敬. 日本内分泌学会雑誌 75: 367. 1999.
- 8) Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K. Arch Toxicol. 74: 48-53. 2000.
- 9) Miagawa S, Suzuki A, Katsu Y, Kobayashi M, Goto M, Handa H, Watanabe H, Iguchi T. Journal of Molecular Endocrinology. 32: 663-677. 2004.
- 10) H.O. Goyal, A. Robateau, T.D. Braden, C.S. Williams, K.K. Srivastava and K. Ali. Biology of Reproduction 68: 2081-2091 .2003.