

特集 魚類ビテロジェニン

魚類血清ビテロジェニン測定法開発の現状

山田 久

The Present Situation on the Development of Methods for Fish Plasma Vitellogenin Determination

Hisashi Yamada*

1. はじめに

ビテロジェニン（以下VTGと言う）は卵黄タンパク質の前駆物質である。前章で松原により詳細に述べられているように、生殖内分泌系の支配を受け、肝臓で合成される。肝臓で合成されたVTGは血液中に分泌され、卵巣に運ばれた後に、生殖腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン、GTH）の影響下で成長期の卵母細胞に卵濾胞細胞を經由して選択的に取り込まれる。卵内に入ったVTGは特異的に酵素（カテプシンD様酵素）により分解され、リポビテリン、ホスピチン及び硬骨魚類に特有のB'-コンポーネントと呼ばれるタンパク質に解裂する。リポビテリン、ホスピチン及びB'-コンポーネントは貯蔵タンパク質として卵母細胞中に蓄積され、受精後の卵発生及びふ化仔魚に対して栄養を補給する役割を有すると報告されている（原, 1998, 1999）。

水環境中の外因性内分泌かく乱物質（特に、女性ホルモンと同様な作用を有する物質、以下EDCsと略記する）は、内因性エストロジェン（17 β -エストラジオール（E2））と同様に魚類に作用し、雌のみならず雄肝臓においてVTGを生成し、血液中への分泌を引き起こす。このVTG生成は低濃度のEDCsにより引き起こされ、さらに、

EDCsに対して特異的な反応であることから、雄魚血清中VTGの検出及び測定が環境水中EDCsの暴露を評価する生化学的指標（バイオマーカー）となることが指摘されている（原, 1999）。

水産学の分野では、これまでVTGに関する研究は、魚類の生殖生理機構の解明を目的として行われてきた。これらの基礎研究の成果は水産増養殖のための実用面に活用され、①早期雌雄判別、②魚類個体の成熟度の確認及び人工受精の時期の決定、③排卵のためのホルモン投与時期の決定など成熟の管理の応用研究が実施されるとともに、多くの成果をあげてきた（原, 1998）。これらの研究では成熟期の雌を研究対象とすることが多く、比較的高濃度のVTGを測定することが多かった。

一方、EDCsによる水域汚染の実態解明や魚類の繁殖・再生産に対する作用機構の研究では、雌のみならず雄血清中のVTGを測定することも必要である。藤井（2005）は雄マコガレイ血清中VTG濃度の季節的変動の研究を行い、VTG濃度は成熟の盛期（12月）より少し早い10月に最大値（0.6 μ g/mL）に達するが、3月～7月の間はND～0.02 μ g/mLで推移する季節変動を解明した。有明海のトビハゼの研究（塚本ら, 2006）では、雌血清中VTG濃度が0.01～10mg/mLの範囲で、成熟期に高くなる変動を示すのに対し、雄血清中からはVTGが10～20 μ g/mLのレベルで周年にわたり検出

（2007年12月21日受付, 2008年1月15日受理）

* 財団法人 海洋生物環境研究所 事務局
（〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3丁目29番地 帝国書院 ビル5階）
E-mail : h-yamada@kaiseiken.or.jp

されるが、精巢の成熟度との関係は明瞭ではなかったと報告されている。

このように、EDCsの魚類に対する影響解明の研究では、汚染が認められない対照水域の雄魚類血清などきわめて低濃度のVTGから汚染水域の比較的高濃度のVTG、あるいは、EDCsの魚類暴露試験における陽性対照魚類の血清など高濃度のVTG、すなわち、低濃度から高濃度の広い濃度範囲のVTGを検出・定量する手法が必要である。

このような状況において本稿では、魚類を対象としてVTGの化学的特性を概観するとともに、VTGの検出・定量手法の開発、発展状況について取りまとめ、水域汚染実態把握調査に求められるVTGの検出・定量手法について今後の方向性を検討する。

2. ビテロジェニンの化学的特性

魚類のVTGは、カルシウム、鉄、亜鉛、カロテノイドを結合し、1%の糖、12%の脂質、1.3%のリンを含む脂糖リンタンパク質 (lipoglycophosphoprotein) である。VTGの構造は有園 (1998) によりFig.1のように模式的に示されている。VTGはリポビテリン、ホスピチン及びβ'-コンポーネントで構成される。また、分子量は約46万で分子量約20万の2つのサブユニットから構成される2量体である (原, 1999)。

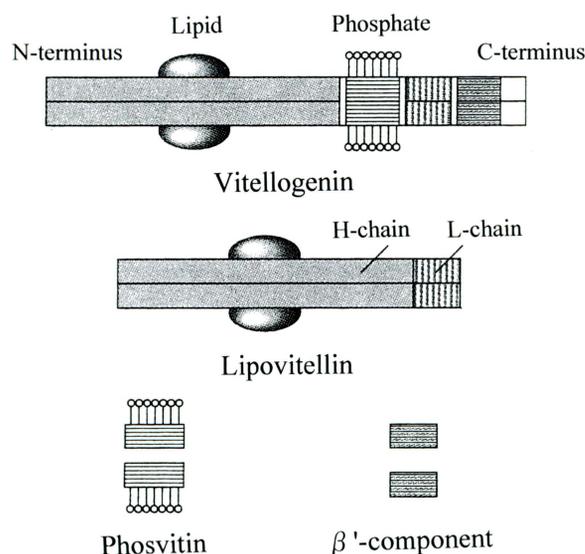


Fig. 1 Structure of fish plasma vitellogenin.

VTGを構成するリポビテリンは、20%の脂質及び0.5%のリンを含む分子量400,000のリポタンパ

ク質で、分子量が約200,000のサブユニット2個から形成される2量体である。サブユニットは、分子量約120,000の重鎖と約31,000の軽鎖の2つのペプチドから構成される。一方、もう一つの構成成分であるホスピチンは、リンを9.5%含む分子量約35,000~40,000のタンパク質である。構成アミノ酸の50%以上がセリンであり、しかもほとんどがリン酸化されている。また、通常のタンパク染色方法では染色できない特徴を有する。各種の魚種についてVTGが精製され、その化学的及び生化学的特性が研究されてきた。これらの多くの研究の一部分について分子量をまとめると、分子量は、マイワシ (*Sardinops melanostictus*) で450kDa (Matsubara *et al.*, 1994), マダイ (*Pagrus major*) で486kDa (藤井, 2000), ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) で540kDa (Hara *et al.*, 1993), 大西洋サケ (*Salmo salar*) で520kDa (So *et al.*, 1985) であると報告されている。また、Hara (1987) により、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*), サケ (*Oncorhynchus keta*) 及びウナギ (*Anguilla japonica*) のVTGの分子量は、それぞれ、600kDa, 600kDa及び350kDaと報告されている。魚種により分子量が異なるので、VTGを構成するリポビテリン、ホスピチン及びβ'-コンポーネントのペプチドの大きさ及びアミノ酸配列等も魚種により異なることが考えられる。

Ohkubo *et al.* (2003a) はマハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) のVTGを生化学的及び免疫化学的に研究した。ハイドロキシアパタイトによる吸着クロマトグラフィー, Superose 6によるゲル濾過クロマトグラフィー及びMonoQによるイオン交換クロマトグラフィーを用いるクロマトグラフィーの手法により精製したところ、クロマトグラフィーに対する反応性や溶出位置から分子量が530kDaと320kDaと推定される2種類のVTGが存在することが明らかになった。Ohkubo *et al.* (2003a) によると、分子量の大きいVTGは脂質及びリン含有量から他の魚種においても報告されている一般的なVTGであり、分子量の小さいVTGはリン含有量が低いことからティラピア (Kishida and Specker, 1993) 及びゼブラフィッシュ (Wang *et al.*, 2000) で報告されている別なタイプのVTG (ホスピチンが含有されないVTG) であることを報告している。このように魚類のVTGにはいくつかの異なった分子種が存在することが次第に明らかになっているが、それらの機能や役割の解明

は今後の課題である。Ohkubo *et al.* (2003b) はこれら2種類のVTGに対する特異抗体を作製するとともに、後述する酵素免疫測定法を確立し、マハゼの2種類のVTG濃度をそれぞれ区別して測定している。

3. ビテロジェニンの検出・測定法

初期のVTGの検出・測定方法は、タンパク質の研究に用いられてきた手法を応用したものが多かった。上述したように、VTGは1%弱のリンを含むタンパク質であることから、血清を電気泳動した後にリンを染色し、発色した色の強度をデンストメーターで測定する方法により定量された。また、VTGはアルカリで不安定なリンを含有する唯一の血清タンパク質である特性に着目してアルカリで遊離するリンを測定する間接的定量法が用いられた(原, 1999)。一方、分子量が大きいこと及びタンパク質の特性に着目してゲル濾過クロマトグラフィー法及びイオン交換クロマトグラフ法でVTGを分離した後に紫外線(280nm)の吸光度測定により定量する方法も検討されてきた。しかし、これらの方法は検出感度や再現性が悪く、定量性が良くないために広く普及しなかった。EDCsの魚類に対する作用機構の解明や影響実態の解明・評価のためには、雄血清のように低濃度VTGの測定が必要であり、従来方法以上に特異性が高く(生体試料のように多種多様なタンパク質の中に目的のタンパク質が微量存在する場合に、目的タンパク質のみを正確に区別すること)、定量性の良い(低濃度であっても検出でき、再現性が良いこと)測定法の確立が要求される。これらの目的を達成するために、VTGに対する特異抗体を用いる抗原・抗体反応に基づく免疫学的定量法が開発されてきた。

3.1 免疫学的定量法

免疫学的定量法は、直接法、競合法及び非競合法(固相法、サンドイッチ法とも言う)に大別される。直接法は、特異抗体と抗原を直接接触させ、抗原抗体反応を起こさせる。形成された抗原抗体複合体に取り込まれた抗体の量を酵素反応により発色させる方法あるいは抗原抗体複合体量を直接測定する方法により抗原(ここではVTG)の量を定量する方法である。後述する寒天ゲル内一元放射免疫拡散法が直接法の代表的な例である。競

合法はFig.2に模式的に示すように特異抗体に対し識別できる2種類の抗原(例えば、ラジオアイ

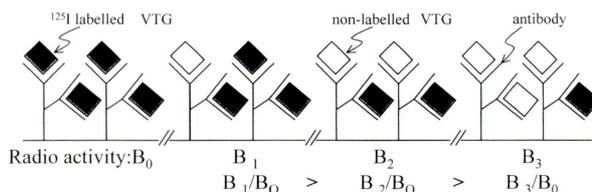


Fig. 2 Principle of the radioimmunoassay for the determination of fish plasma vitellogenin.

ソトープで標識したVTG及び非標識VTG)を反応させ、抗原抗体複合体中の放射能値から抗原(VTG)を定量する方法である。競合法は抗原抗体反応が起こる部位が少ない小さい分子量の抗原の定量に適している方法であり、ラジオイムノアッセイは競合法に分類される。

非競合法の測定原理は以下の通りである。VTGの特異抗体(捕獲抗体)と抗原を反応させ、抗原を捕獲抗体に結合させる。捕獲された抗原に酵素標識されている抗体をさらに反応させる。最後に、発色あるいは発光基質を添加し、発色あるいは発光強度を測定する。捕獲抗体-抗原-酵素標識抗体の系が形成され、抗原が2種類の抗体に挟まれるのでサンドイッチ法とも言われる。また、Fig.3に示すように酵素標識抗体の代わりにビオチン化抗体で抗原をサンドイッチし、さらに、酵素標識アビジン(ビオチンと特異的に結合する)と反応させる方法もある。抗体を標識する場合、酵素よりもビオチンの方が標識し易いこと、市販されている種々の酵素標識アビジンが使用できるため応用が広がることなどから近年ではこの方法が一般化している。非競合法は数種の抗体を使用するために、抗原抗体反応が起こる部位が複数必要とな

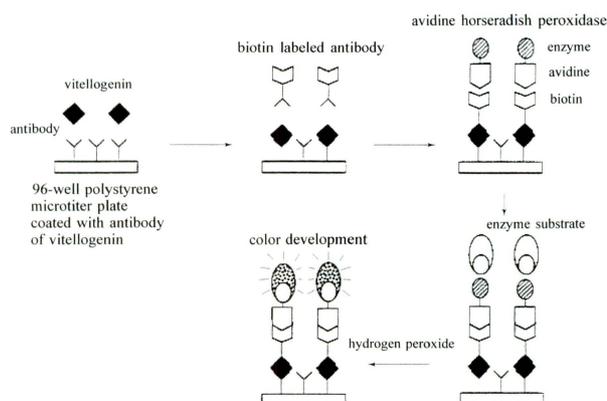


Fig. 3 Principle of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of fish plasma vitellogenin.(after Kashiwada S., 2003)

るので、タンパク質など大きな分子の検出・定量に適している。また、同一の試料（タンパク質）に対し、捕獲抗体と2次抗体の2種類の抗体を使用するために特異性が非常に高い方法である。

VTGの免疫学的定量においては、測定対象魚類のVTGに対する抗体を作製する必要がある。

3.1.1 魚類VTGに対する抗体の作製方法

免疫学的検出・定量のためには、VTGに特異的な抗体を作製する必要がある。精製したVTGあるいは成熟した卵巣卵抽出物（未受精卵の卵黄抽出物）を用いて作成する方法が一般的である。卵黄は既に述べたようにVTGが解裂した結果形成されるので、リポビテリンなどにはVTGと共通するアミノ酸配列が存在する。したがって、卵黄抽出物に対して得られる抗体はVTGに対しても免疫反応を示す。

1) VTGに対する抗体の作製

成熟した雌あるいはE2を暴露した魚類（E2を暴露すると雄、雌いずれについてもVTGを誘導するので、雄、雌いずれでも良い）の血清を採集し、血清中のVTGを各種のクロマトグラフィーの手法を用いて精製する。精製VTG試料を免疫賦活剤（フロイント・コンプリート・アジュバントなど）と混合・乳化する。この乳化物を以下の方法でウサギに免疫し、抗VTGウサギ抗体を作製する。すなわち、乳化物をウサギの背部10カ所程に皮下注射、さらに2週間後に血清（0.5mL）のみを同様に注射、最後に注射した2週間後にウサギの耳縁辺部から採血する。血清を分離後、Protein Gカラムなどの適当なクロマトグラフィーの手法により精製する（例えば、藤井（2000））。

2) 卵黄抽出物に対する抗体の作製

成熟した未受精卵を摘出し、0.9%の生理的食塩水で洗浄する。リン酸緩衝液を加えホモジナイズ後、遠心分離（1,000G, 4°C, 10分）する。上層の脂質層と下層の沈殿物の中の水層を採取し、卵抽出液を得る。これを各種のクロマトグラフィーの手法により精製し、リポビテリンを分取する。精製リポビテリンを抗原として血清中VTGの場合と同様にウサギに免疫して抗体を作製する。

抗卵抽出液ウサギ抗体を雄血清で吸収操作を行った後に血清中VTGに対する抗体作製の場合と同様にProtein Gカラムなどの適当なクロマトグラ

フィーの手法により精製し、抗卵抽出液ウサギ抗体を得る。なお、雄血清による吸収操作は、雄血清中に存在するタンパク質を抗卵抽出液ウサギ抗体中に存在するタンパク質と結合、沈殿、除去することにより抗体を精製することを目的として次の操作で行われる。まず、抗体（抗血清）に同量の雄血清を混合し、4°Cで一昼夜放置することにより、タンパク質を結合、沈殿させる。沈殿物を遠心分離（15,000G, 4°C, 30分）及び孔径、0.45 μmの濾紙による濾過により除去する。

このようにして得られた抗VTGウサギ抗体及び抗卵抽出液ウサギ抗体はポリクロナール抗体であり、複数の抗原認識部位を有する。したがって、近縁種のVTGには免疫反応（交叉性）を示すこともあり、近縁種の魚種のVTG測定に使用できる場合がある。しかし、免疫反応の低下により、検出感度の低下などの問題がある。VTGの化学的特性において述べたように、分子量が魚種によっても異なることが次第に解明され、VTGを構成するペプチドのアミノ酸配列も魚種によって異なることが考えられる。したがって、測定しようとする魚種毎に抗体を作製することが望ましいと考

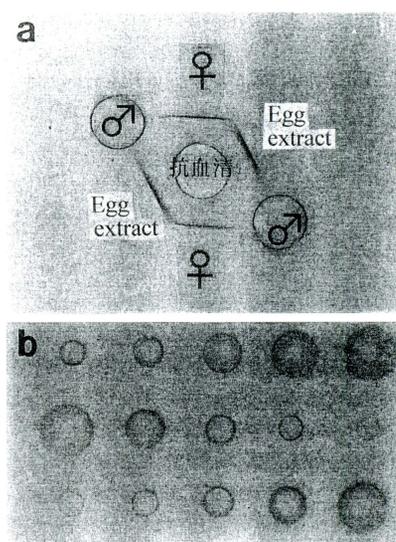


Fig. 4 Precitin reaction of fish plasma vitellogenin. (after Hara, 1998)

a: Detection of vitellogenin with the ouchterlony diffusion method. The antibody of vitellogenin is contained in the center circle, plasma of female, egg extract and plasma of male fish is contained in the circle of ♀, Egg and ♂, respectively. The female plasma and egg extract reacted with antibody and formed precipitate, while, male plasma did not react with antibody.

b: Results of the single radial immunodiffusion. Concentration of VTG is proportional to the area of precipitate at the end of the diffusion.

えられる。

3.1.2 寒天ゲル内一元放射免疫拡散法

寒天ゲル内二重拡散法（オクタロニー法とも言い、代表的な結果はFig.4(a)に模式的に示す）がVTGの検出を目的とする定性的な方法であるのに対し、この方法は定量を目的としてMancini *et al.* (1965) によって開発された方法であり、マンシーニ法と呼ばれることもある。

1) 測定原理

あらかじめVTGの特異抗体を含む寒天ゲルを作製し、穴に試料（抗原、VTG）を入れ一定時間培養する。培養後に穴の周囲に形成される沈降輪（抗原抗体複合体、代表的な結果をFig.4(b)に示す）の面積を測定する。既知のVTG濃度と沈降輪の面積との関係を線形回帰分析に適用して作成した検量線から未知のVTG濃度を推定する。

2) 操作

藤井（2000）はマダイ血清中VTGを次の操作で測定している。

2.4%量のアガロースを10mMリン酸緩衝液（PBS）（150mMNaCl, 0.05%アジ化ナトリウムを含む）に添加。加熱、溶解。

↓

↓

ウォーターバス上で55℃まで冷却、55℃に保温した抗血清（抗マダイ卵抽出液ウサギ抗体）を最終濃度が0.5～32%になるように添加。55℃のPBSでアガロースの最終濃度が1.2%になるように調整。

↓

↓

直径9cmのシャーレ1枚につき12mLずつ分注し、固化するまで室温に放置。

↓

↓

固化アガロースプレートに直径2mmの試料穴を空け、試料の2倍希釈系列5μLを添加。（検量線を作成する場合はVTG標準品）

↓

↓

シャーレに蓋をしてビニールテープで密閉し、室温でインキュベート。

↓

↓

各試料の穴の周りに形成される沈降輪の直径を経時的に計測し、沈降輪の面積とVTG量の関係について線形回帰分析を行う。なお、沈降輪の面積は次式で求める。

沈降輪の面積 = (沈降輪の半径)² × 3.14 - (試料穴の半径)² × 3.14

3) 測定法の検討

本法によるVTGの検出は寒天ゲル内の抗体濃度及び反応時間（培養時間）によって異なるため、Fujii *et al.* (1998) 及び 藤井（2000）は寒天ゲル内の抗体濃度と培養時間を変化させた場合に検出されるVTGの濃度範囲を調べた。結果の概要はFig.5に示されるが、抗血清濃度が0.5%の場合に沈降輪が観察できるVTGの最大濃度は、培養期間が1日目で0.166mg/mL（42.4mg/mLのVTG標準品を希釈した際の希釈倍率は256倍：256倍希釈、以下同様）、3日目で1.33mg/mL（32倍希釈）、5日目以降で10.6mg/mL（4倍希釈）、14日を通して21.2mg/mL（2倍希釈）と血清原液（42.4mg/mL）では沈降輪は認められない。沈降輪が観察できたVTGの最低濃度は培養期間14日を通して0.0104mg/mL（10.4μg/mL）であった。一方、抗血清濃度が1%以上の場合には、培養期間が1日目以降のVTGの検出上限濃度は変わらず血清原液（42.4mg/mL）においても沈降輪の形成が認められた。しかし、プレート中の抗血清濃度が上昇するにしたがってVTGの検出最小濃度は次第に上昇した。すなわち、検出最小濃度は1～4%のプレートでは0.0207mg/mL（20.7μg/mL）（2,048倍希釈）、8%のプレートでは0.0414mg/mL（41.4μg/mL）（1,024倍希釈）、16%のプレートでは0.0828mg/mL（82.8μg/mL）（512倍希釈）及び32%のプレートでは0.166mg/mL（166μg/mL）（256倍希釈）であった。

これらの実験結果から、抗血清と抗原の両濃度の相対的な関係により検出される（沈降輪を形成する）抗原濃度が増加し、抗血清濃度が上昇するに伴ってVTGの検出最小濃度が次第に上昇することが明らかであった。また、沈降輪の面積は経時的に拡大し、抗血清濃度が低いほど、また、抗原（試料中VTG）の濃度が高いほど面積が一定となる時間（抗原抗体反応が完結するまでの時間）が長くなった。例えば、14日までに抗原抗体反応がほぼ完結したVTG濃度は、プレート中抗血清濃

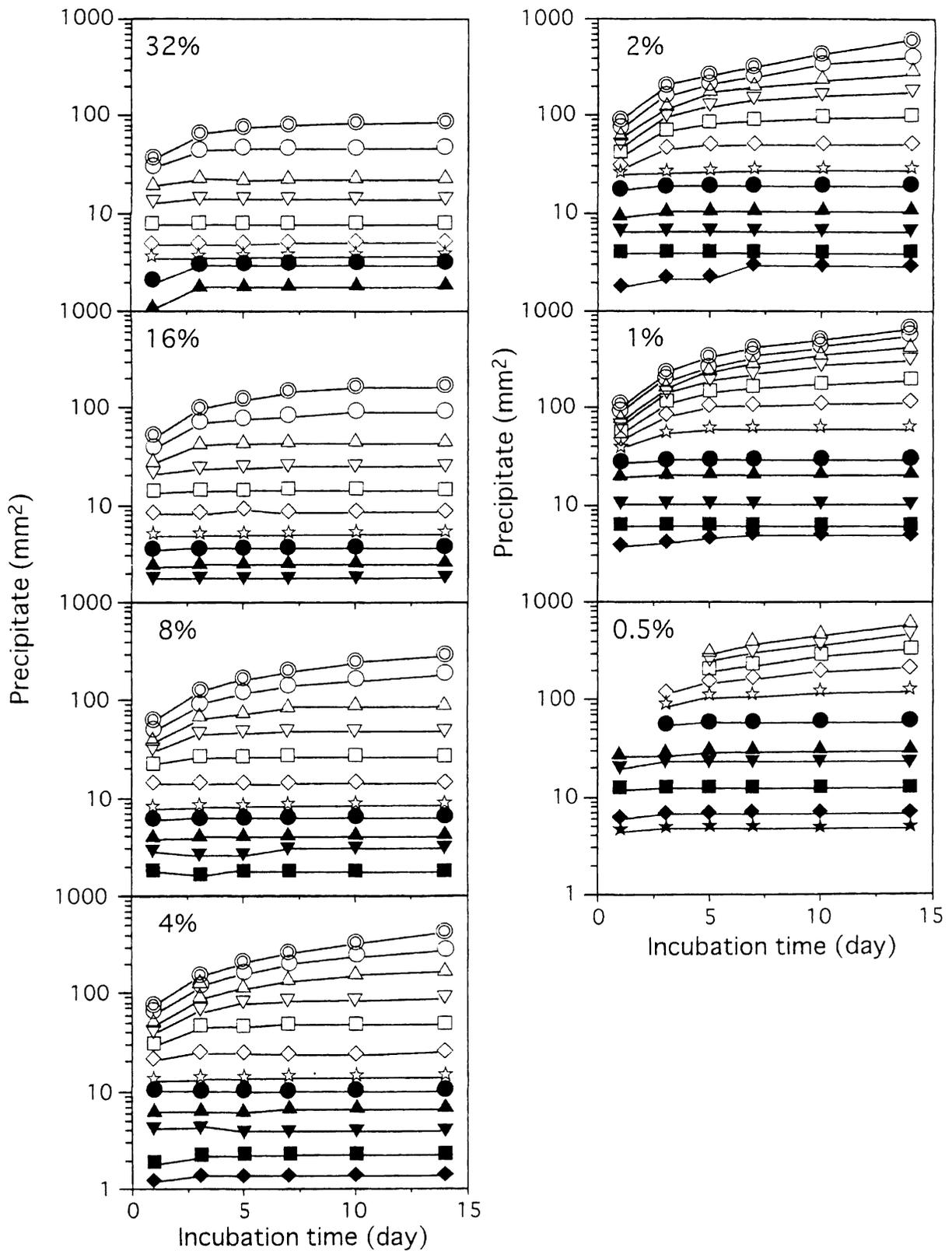


Fig. 5 Effects of concentration of antibody and incubation time on area of the precipitate. (after Fujii, 2000)

Numbers of percentage in the figures show the concentrations of the antibody contained in the plate. Vitellogenin concentration is represented by◎, 42.4mg/mL; ○, 21.2mg/mL; △, 10.6mg/mL; ▽, 5.3mg/mL; □, 2.65mg/mL; ◇, 1.33mg/mL; ☆, 663μg/mL; ●, 331μg/mL; ▲, 166μg/mL; ▼, 83μg/mL; ■, 41μg/mL; ◆, 20.7μg/mL; ★, 10.4μg/mL.

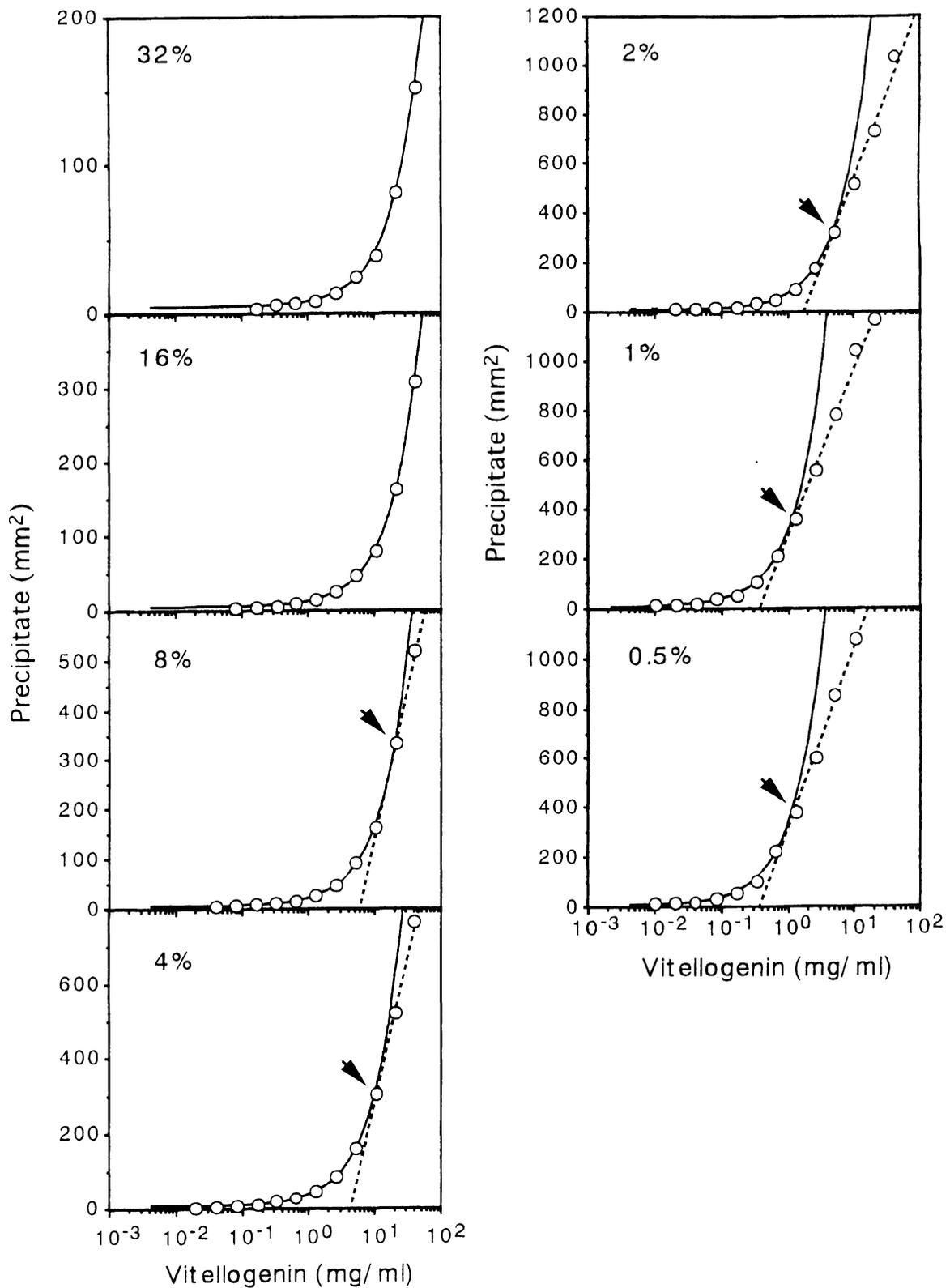


Fig. 6 Relation between area of precipitate and concentration of vitellogenin with 14days incubation.(after Fujii, 2000)

Numbers of percentage in the figures show the concentrations of the antibody contained in the plate. Dotted line and solid curves represent regression curves from the data of complete precipitates and from those of developing precipitates, respectively. Arrows show turning points which the diffusion is completed or not.

度が32%と16%で42.4mg/mL, 8%で21.24mg/mL, 4%で10.6mg/mL, 2%で5.3mg/mL, 1%で2.65mg/mL, また0.5%で0.66mg/mLであった。

14日間の培養終了時における沈降輪の面積とVTG濃度との関係は、Fig.6のように図示できる。抗原抗体反応が完結した試料と未完結の試料とに分けて別々に解析すると、沈降輪の面積とVTG濃度との間に強い相関が得られた。両者の間には、抗原抗体反応が完結した濃度範囲では1次回帰直線を、抗原抗体反応が完結していない高いVTG濃度の範囲では対数回帰曲線を適用すると強い相関関係が得られることが明らかになった。本法により試料中の抗原を定量するためには、ゲル内の抗体との抗原抗体反応を完結させる必要がある(Mancini *et al.*, 1965, 中村, 1985)と指摘されているが、抗原抗体反応が未完結であっても、抗原量と沈降輪の面積との関係を対数回帰式で表すことで、強い相関を示す検量線が得られることが明らかになった。

これらの結果は、抗血清の節約と測定時間の短縮が可能であることを示唆し、Fujii *et al.*, (1998)は寒天ゲル内抗血清濃度を1%, 反応(培養)時間を1日とした測定条件で0.0207mg/mLから42.4 mg/mLの濃度範囲のVTGが検出され、また、沈降輪の面積 (y) とVTG濃度 (x) の間には、Fig.7

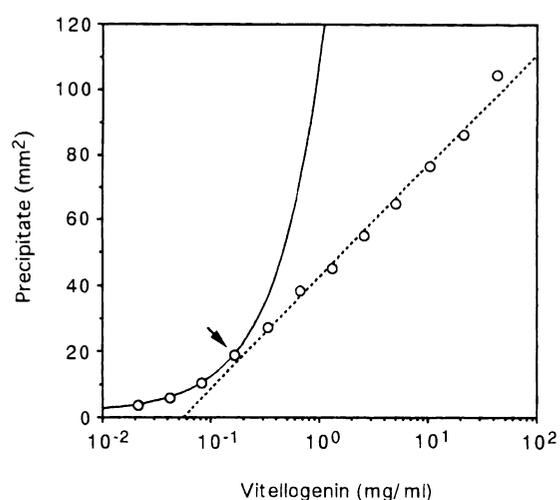


Fig. 7 Relation between area of precipitate and concentration of vitellogenin with 1day incubation on a 1% antibody gel plate. (after Fujii, 2000)

Solid curve and dotted line represent regression curves from the data of complete precipitates ($y=1.8476 + 105.52 x$; $r^2=0.999$) and from those of developing precipitates ($y=42.837+34.064 \log x$; $r^2=0.988$), respectively. Arrow shows the turning point (166 μ g/mL) of the diffusion completed or not.

の関係が得られることを確認した。1日の培養時間の間に抗原抗体反応が終了したVTG濃度領域(0.0207~0.166mg/mL)では $y=1.8476+105.52X$ ($r^2=0.999$), また、抗原抗体反応が未終了の濃度範囲(0.166~42.4 mg/mL)では $y=42.837+34.064 \log X$ ($r^2=0.988$)の検量線を適用することにより正確なVTGの定量が可能であることが明らかになった。

4) 定量範囲等

Fig.5に示される最小検出濃度及びFig.6の検量線では、寒天ゲル内抗血清濃度が0.5%及び8%で検出されるVTG濃度の最低値は、それぞれ、10.4 μ g/mL及び41 μ g/mLであった。また、藤井(2000)の培養時間を短縮した測定条件(寒天ゲル内抗血清濃度1%, 培養時間1日)では、Fig.7に示すように20.7 μ g/mLのVTGを測定することが可能であった。これらの結果から、寒天ゲル内一元放射免疫拡散法の定量下限は10~40 μ g/mLの範囲であると考えられる。

EDCsの魚類に及ぼす影響調査では、汚染されていない対照水域における雄魚の血清VTG濃度を測定する必要がある。広島湾における調査(藤井, 2005)では、マコガレイ雄の血清中VTG濃度はND~0.6 μ g/mLであったと報告されている。すなわち、EDCsの影響実態把握調査では、1 μ g/mL以下のレベルのVTG濃度の測定が必要であるので、寒天ゲル内一元放射免疫拡散法よりさらに高感度な測定法の開発が必要である。

しかし、本法は簡便で特異性の高い方法である。さらに高価な機器を必要としないことも本法の長所であるので、魚類個体の成熟度のチェック及び排卵のためにホルモン投与時期の決定などの魚類成熟過程の管理のために、卵黄形成が進んでいる時のmg/mLレベルの血清VTG濃度を測定する研究においては有益な方法であり、高感度の測定法である酵素免疫測定法が開発されるまでは広く一般的に使用されてきた。

3.1.3 免疫電気泳動法(ロケット免疫電気泳動法, ローレルロケットテスト)

寒天ゲル内一元放射免疫拡散法では抗体を含んだゲル内を抗原が物理的に拡散して沈降輪を形成するので反応が完了するまでに長時間が必要である。しかし、抗原を電氣的に移動させ、分析時間を短縮するとともに、より正確な測定結果を得る

ために本法が開発された。

一般的には、本法は以下の操作で行う。アガロースゲルに抗血清を添加して厚さ1.5mm程度のゲル平板を作製し、ゲルに空けた直径2~3mmの穴に抗原溶液を充満させる。抗血清（抗体）が移動しない条件下で抗原溶液を電気泳動させると、抗原と抗体が反応してロケット状の沈降物（抗原抗体複合体）が形成される。ロケットの面積（あるいはロケットの高さ）は抗原量に比例するので、ロケットの面積や高さとの関係（検量線）から抗原（VTG）の濃度を求める。

3.1.4 ラジオイムノアッセイ法

寒天ゲル内一元放射免疫拡散法では検出できない低濃度のVTGをより高感度に検出・定量するために、ラジオイムノアッセイ法が1970年後半から1980年代にかけて開発された。開発した手法を魚類VTGの研究に応用し、大西洋サケ (Idler *et al.*, 1979, So *et al.*, 1985), ニジマス (Sumpter, 1985, Copeland *et al.*, 1986) 及びニベ科の海産魚 (spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*) (Copeland and Thomas, 1988) の血清中VTG濃度が測定された。また、SumpterらのグループによるEDCsの魚類に及ぼす影響実態把握や作用機構解明に関する研究において、ニジマス等の淡水魚類の血清中VTGがラジオイムノアッセイ法により測定された (例えば, Jobling *et al.*, 1996)。

1) 測定原理

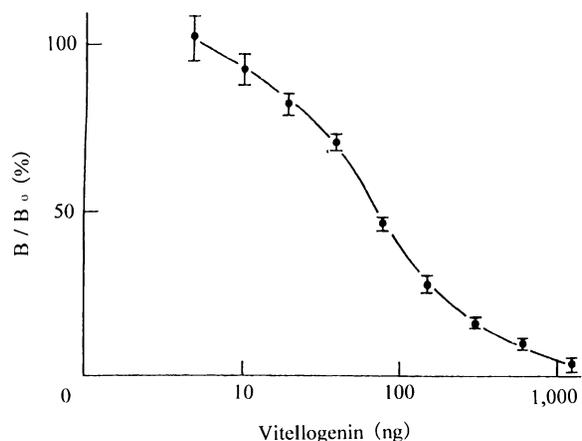


Fig. 8 Standard curve of vitellogenin determination by the radioimmunoassay. (after Copeland and Thomas, 1998)

Each point represents the mean \pm standard deviation (n=5).

Fig.2に模式的に示したように、VTGに対する特異抗体（抗魚類VTGウサギ抗体）に抗原（試料VTG）及びトレーサー（測定しようとする魚類のVTGを放射性元素（ ^{125}I あるいは ^{131}I が用いられている）を一定時間反応させる。形成された沈殿（抗原抗体複合体）の放射能（B）を測定する。抗体とトレーサーのみを反応させた時に形成される沈殿の放射能（ B_0 ）に対するBの割合を計算する。Fig.8に1例を示すが、既知量のVTGについて測定した B/B_0 とVTG量との関係（検量線）に基づき試料中VTG濃度を求める。

2) 操作

Copeland and Thomas (1988) がニベ科の海産魚類 (spotted seatrout) の血清中VTGを測定した方法の概要は下記の通りである。

試料VTG (100 μL), トレーサー (^{125}I で標識したVTG, 100 μL , 10,000cpm), 抗血清 (100 μL) をケイ酸ガラス試験管中で混合し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で一昼夜反応させる。

↓
↓

2番目の抗体（抗ウサギグロブリンヤギ抗体）50 μL (1:20希釈) 及びキャリアー血清（通常のウサギ血清, 1:1,000希釈）を添加し, さらに4 $^{\circ}\text{C}$ で一昼夜培養して反応を停止。

↓
↓

6%ポリエチレングリコール500 μL を添加し, ミキサーで攪拌後, 遠心分離 (15分, 1,500g) する。

↓
↓

上清をピペットで除去した後に沈殿の放射能 (B) を計測する。

↓
↓

試料VTGを含有しない系において同様な操作を行い, トレーサー (^{125}I で標識したVTG) と抗体（抗魚類VTGウサギ抗体）によって形成された沈殿の放射能 (B_0) を測定する。 B/B_0 の割合を求める。なお, 放射能 (B及び B_0) はゲルマニウム半導体検出器など適切な放射能測定器を用いて測定する。

↓
↓

既知量のVTGについて測定したB/B₀とVTG量との関係（検量線）を適当な回帰曲線に適用する。測定試料のB/B₀を検量線に適用し試料中VTG濃度を求める。

なお、検量線を作製する時には、測定対象魚類で調製した既知濃度のVTGを用いる。

3) トレーサー（放射性ヨウ素で標識したVTG）の作製

トレーサーの作成は2つの過程、VTGの精製と放射性元素による標識に大別される。

(1) VTGの精製

通常成熟期雌の血清あるいはE2によりVTGの生成が誘導された雄個体の血清を試料として用いて、3.1.1魚類VTGに対する抗体の作製方法において述べたように、遠心分離、透析、再溶解及び各種のクロマトグラフィーの操作により測定対象魚類のVTGを精製する。

(2) 放射性ヨウ素によるVTGの標識

So *et al.* (1985) は、Salacinski *et al.* (1981) の方法に準拠した外部標識法でニジマスのVTGを放射性ヨウ素で標識し、ニジマス血清中VTGの定量に用いた。ヨウ素化の手順は以下の通りである。

ジクロロメタンで1mg/mLに調整した1, 3, 4, 6-テトラクロロ-3 α , 6 α -ジフェニルグリコールウリル（ヨードゲン）5 μ Lをケイ酸ガラス試験管に入れ、溶媒を揮発させる。

↓
↓

試験管の底にヨードゲンの膜を形成する。

↓
↓

VTGが溶解されている0.5Mのリン酸緩衝液（pH 7.4）25 μ L（VTG量10 μ g）を試験管に添加する。

↓
↓

1.5mCiのNa¹³¹Iが混合物に添加され、12分間放置して反応が進められる（半減期の長いアイソトープ、Na¹²⁵Iが使用される場合もある）。

↓
↓

0.05Mリン酸緩衝液600 μ Lを添加して反応を停止する。放射性ヨウ素により標識されたVTGをSephadex G-25Mを使用するカラムクロマ

トグラフィーで精製する。

4) 解説

試料VTG、トレーサー（¹²⁵Iあるいは¹³¹Iで標識したVTG）及び抗血清（抗魚類VTGウサギ抗体）を反応させる抗原抗体反応において、試料VTG及びトレーサーはいずれも抗血清と反応し、沈殿（抗原抗体複合体）を形成する。結合するトレーサーの量は試料中に存在するVTG量に依存して変化する。試料中VTGの量が多いほど、結合するトレーサー量の割合は小さくなり、Bの放射能値は小さくなる。したがって、B/B₀の割合も試料中VTGの量が多いほど小さくなる。

形成された抗原抗体複合体の放射能値の計数のためには、抗原抗体複合体を分取する必要がある。一般的に遠心分離により分取されるが、分取を容易にするために抗原抗体複合体の形状を大きくすることが望ましい。このために抗原抗体複合体に2番目の抗体（抗ウサギ γ グロブリンヤギ抗体）を反応・結合させ、抗原抗体複合体の形状を大きくする。なお、抗ウサギ γ グロブリンヤギ抗体は各社から市販されており、購入・使用することができる。

VTGの放射性同位元素による標識においては、放射性ヨウ素による標識が一般的である。Na¹³¹I（あるいはNa¹²⁵I）をイオン化させ、タンパク質に結合させる。このヨウ素のイオン化のために各種の酸化剤が使用される。ラジオイムノアッセイのためには、比放射能（10mCi/mg程度）の高い標識抗原が必要である。また、ヨウ素のイオン化のために使用する酸化剤によるVTG（タンパク質）の損傷は、比放射能の低下のみならず、VTGの免疫学的活性低下を引き起こすことも考えられる。酸化剤としてクロラミン-T、過酸化水素、塩素ガス及びチオ硫酸ナトリウムのような各種の化合物が使用されてきたが、Salacinski *et al.* (1981) は、ヨードゲンが従来から使用されている酸化剤に比較してタンパク質の損傷を最小にし、さらに比放射能の高いVTGが得られることを明らかにした。したがって、Salacinski *et al.* (1981) は、タンパク質のような高分子化合物の放射性同位元素による外部標識においてはヨードゲンが適していることを解明し、以後一般的に使用されている。

5) 定量範囲等

寒天ゲル内一元放射免疫拡散法に比較すると感度は1万倍高く、数ng/mLの低濃度のVTGの測定

が可能である。雄及び成熟休止期の雌血清中のVTG測定が可能である。

ラジオイムノアッセ法では放射性同位元素 (^{125}I あるいは ^{131}I) で標識した抗原を作製し、さらに、VTGの測定操作において放射性同位元素で標識した抗原を使用することが必須である。放射性物質を取り扱うために、特別な施設が必要である。さらに、標識抗原中の放射性同位元素 (^{125}I あるいは ^{131}I) が放出する γ 線を測定する必要があるため、そのためには γ 線スペクトロメトリー (ゲルマニウム半導体検出器) の放射能計測機器を必要とする。このように、特殊な施設及び機器を必要とすること及び次に述べるVTGの高感度な分析手法である酵素免疫測定法が開発されたために、現在我国ではあまり普及していない。

3.1.5 酵素免疫測定法 (サンドイッチ法)

酵素免疫反応の特異性の高さ及び定量性の良さを確保しながらラジオアイソトープを使用するラジオイムノアッセ法の短所を改良する目的で1990年代初頭から多くの研究が行われてきた。ヨーロッパソール (*Solea vulgaris*) (Rodriguez *et al.*, 1989), アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) (Kwon *et al.*, 1990), マイワシ (*Sardinops melanostictus*) (Matsubara *et al.*, 1994), スズキ科魚類 (*Dicentrarchus labrax*) (Mananos *et al.*, 1994), ウナギ (*Anguilla japonica*) (Okumura *et al.*, 1995), マコガレイ (*Pleuronectes yokohamae*) (Hashimoto *et al.*, 1998), マハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) (Ohkubo *et al.*, 2003b) などの魚類について測定系が確立された。そのほか、コイ、ヒメダカ等の淡水魚についても測定法が確立している。また、近年、松原らの研究チーム(大久保ら, 2006) は、トビハゼ、シロギス、ボラ、イシガレイ、メイトガレイ及びマガレイの6種類の海産魚類及びウグイのVTG測定系を確立し、EDCsによる水域汚染実態解明調査を行っている。酵素免疫測定法の開発により、血清中微量VTGの測定が可能となり、卵黄形成過程におけるVTGの生理学的研究、雄魚血清におけるVTGの存在及び季節変動、並びに海域におけるEDCsによる水域汚染実態解明に関する研究が大きく前進した。

1) 測定原理

Fig.3に測定原理を模式的に示すが、測定対象魚類のVTGに対する特異抗体 (抗魚類VTGウサ

ギ抗体, 捕獲抗体) に抗原 (試料VTGあるいは標準VTG) を反応させ、VTGを捕獲抗体に結合させる。捕獲抗体に捕集されたVTGにビオチンで標識している対象魚類VTGに対する抗体を結合させる。酵素標識したアビジンを反応させた後に酵素の基質 (発色基質) を加える。酵素反応の生成物 (発色物質) の吸光度を測定する。標準VTG濃度と吸光度の関係式 (検量線) から試料中VTG濃度を定量する。

2) 操作

Okumura *et al.* (1995) がウナギの血清VTGの測定系を開発した研究に基づきその操作を以下に述べる。

(1) 測定の準備

ポリスチレン製ELISA用96穴マイクロタイタープレートに精製した抗ウナギVTGウサギ抗体 (捕獲抗体) (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ リン酸緩衝液 (PBS)) 150 μL を分注する。4 $^{\circ}\text{C}$ で4時間インキュベートし、マイクロタイタープレートの表面に抗体を塗布する。

↓

↓

0.1%Tween20を含有するPBS (PBS-T) 200 μL で2回洗浄

↓

↓

プレート表面へのVTGの非特異的吸着 (抗体が塗布されていないプレート表面への吸着) を阻止するために、抗体が塗布されていない器壁面へ牛血清アルブミン (BSA) を塗布する。なお、BSAは捕獲抗体には結合しない。この操作をブロッキングと言う。

1%BSAを含有するPBS (PBS-BSA), 200 μL を分注し、4 $^{\circ}\text{C}$ で4時間インキュベートする。さらに、PBS-Tで2回、PBSで1回洗浄し、余分なBSAを除去する。

↓

↓

(2) 測定操作

試料 (あるいは標準VTG) 溶液100 μL を分注し、4 $^{\circ}\text{C}$ で8時間インキュベートする。その後、PBS-Tで2回、PBSで1回洗浄し、捕獲抗体に結合しなかったVTGを除去する。

VTGは1%BSA, 0.1%Tween 20及び0.01%チ

メロサルを含むリン酸緩衝液 (PBS-BSA-T) で等倍に希釈される。BSAは低濃度でのVTGの安定化のため、TweenはVTGの非特異的吸着 (抗体以外の場所への吸着) の防止、チメロサルはVTGの分解防止のために使用される。

↓

ビオチンで標識した抗リポビテリンウサギ抗体 (PBS-BSA-Tを用いて希釈) 100 μ Lを分注し、4 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートする。インキュベート後、PBS-Tで2回、PBSで1回洗浄し、捕獲抗体上のVTGに結合しなかった余分なビオチン化抗体を除去する。

↓

ストレプトアビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体溶液 (PBS-BSA-Tで調製) 100 μ Lを分注し、室温で1.5時間インキュベートする。さらに、PBS-Tで2回、PBSで1回洗浄し、ビオチンに結合しなかったペルオキシダーゼ複合体を除去する。

↓

酸化還元試薬 (オルトフェニレンジアミン) 溶液を添加し、ペルオキシダーゼの作用によりオルトフェニレンジアミンを酸化し、発色させる。1N硫酸150 μ Lを添加して発色反応を停止後、492nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。

↓

吸光度とVTG濃度との関係式 (検量線) を用いて試料中VTG濃度を定量する。

3) 定量範囲等

Ohkubo *et al.* (2003a, b) は、マハゼ血清中に分子量が530kDaの他の魚種についても報告されているVTG (VTG-530) と、これよりは分子量が小さい (320kDa) 成分を検出した。分子量320kDaの物質はティラピア (Kishida and Specker, 1993) やゼブラフィッシュ (Wang *et al.*, 2000) で報告された別のタイプのVTG (VTG-320) (ホスピチンが欠落したVTG) であると推定した。この2つのVTG (VTG-530及びVTG-320) に対する抗体を作成するとともに、測定系を確立した。

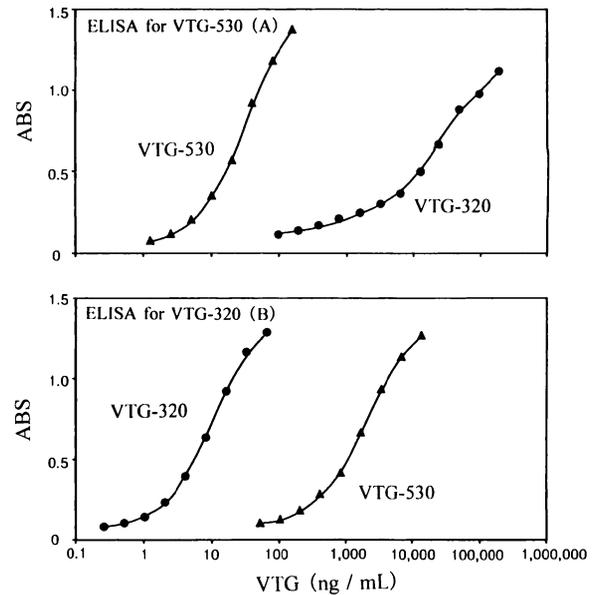


Fig. 9 Standard curve of two kind of vitellogenin (VTG-530 and VTG-320) in Japanese common goby on ELISAs for VTG-530 (A) and VTG-320 (B). (after Ohkubo *et al.*, 2003b)

測定可能なVTGの濃度範囲は、Fig.9に示した検量線からVTG-530で1.3~160ng/mL、また、VTG-320で0.3~66ng/mLであった。酵素免疫測定法の測定感度はラジオイムノアッセイと同等かあるいは優れていると考えられる。

4) 解説

(1) 捕獲抗体及びビオチン化抗体の作製

3.1.1で述べた手法により魚類血清VTGあるいは卵黄抽出液に対して作製・調製した抗体を捕獲抗体として使用する。Okumura *et al.* (1995) によるウナギの測定系では、卵巣抽出液 (リポビテリン) に対する特異抗体がVTGを保持するために使用されている。リポビテリンに対する特異抗体 (抗リポビテリンウサギ抗体) をペプシンで消化した後に、非特異結合 (VTG以外のところへの結合) の要因となりうるフラグメントFcを除き、抗原 (VTG) との特異的な結合に重要なフラグメント ((Fab')₂) を精製し、さらにビオチン標識を施している。フラグメント ((Fab')₂) の使用目的は、VTG以外の場所へのビオチン化抗体の結合を防止することによりバックグラウンドのノイズを低減し、検出感度を高めることである。なお、ビオチン標識キットが各社から販売されており、フラグメント ((Fab')₂) のビオチン標識に使

用されている。

Ohkubo *et al.* (2003b) は、マハゼ血清中のVTG-320をVTG-530のアッセイ系（抗VTG-530ウサギ抗体を使用）で、また、VTG-530をVTG-320のアッセイ系（抗VTG-320ウサギ抗体を使用）を用いて測定した。VTG-530及びVTG-320は、それぞれ、Fig.9の（A）の黒丸及び（B）の黒三角印の曲線のように測定された。この結果から、抗VTG-530抗体及び抗VTG-320抗体は共通の認識部位を持ち、それぞれ、VTG-320及びVTG-520と免疫反応（交叉性）を示すが、その検出感度は著しく低下することが明らかである。したがって、抗体は、基本的には測定しようとするVTGに固有であり、測定対象毎に作製する必要がある。

（2）ストレプトアビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体

アビジン（卵白中に含まれる糖タンパク質）はビオチンと特異的に結合する。アビジンは測定対象魚種に特異的な成分ではないので市販品を全ての魚種のVTG測定に使用することができる。

（3）発色系

ペルオキシダーゼの他にアルカリホスファターゼ及びβガラクトシダーゼと、それらの酵素反応によって呈色する色素を基質とする酵素反応系が用いられる。上で引用したすべての測定系では、ペルオキシダーゼによる基質の酸化による発色系が採用されていた。

このように本法は魚種に特異性が高く、また、定量性の良さ（検出感度が高い）など多くの長所を備えている。発光試薬の使用など検出系の改良により検出感度をさらに高くすることも可能である。マイクロプレートリーダーなど高価な機器も必要とするが、放射性同位元素を取り扱うような特別な施設及び機器を必要とせず、ラジオイムノアッセイに取って代わる方法であると言える。しかし、特異性が高いがために、測定対象魚類について、抗原（血清中VTG及び成熟卵抽出物）の精製、抗原のウサギへの免疫、抗体の作製、抗体の精製などの多くの煩雑な操作が必要であり、これに伴って熟練した技術が要求される。これらの技術の習得及び熟練の必要なことが酵素免疫測定法の短所である。

また、ラジオイムノアッセ法と同様に検出感度が高いために、卵黄形成期盛期の雌血清中の

VTGのような高濃度の試料（サケ・マス類の雌血清では30~40mg/mLまで上昇すると報告されている（原，1998））では、高い倍率で希釈する必要があると考えられる。試料を高い倍率で希釈することは測定誤差の原因となるので、高濃度試料に対して酵素免疫測定法（サンドイッチ法）あるいはラジオイムノアッセイ法を適用することは問題があると考えられる。測定感度の劣る寒天ゲル内一元放射免疫拡散法あるいは後述する高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いる機器分析による手法の適用を検討することも重要であると考えられる。

メダカについては、酵素免疫測定法に必要なVTG（抗原）の精製及び抗体の作製が企業（株式会社トランスジェニック）で開発され、ELISAキットとして市販されている。海産魚についてもルーチンの測定法として普及するためには、測定法の規格化、キットの作製、あるいは、多くの魚種に交叉性を有するユニバーサル抗体の作製などが今後の課題であると考えられる。

3.2 機器分析（HPLC）手法による測定

VTGはプロテアーゼによる分解を受けやすいことから迅速な分析方法も有用であると考えられる。近年、HPLC装置及び分離用カラムの開発・発展により、HPLCによるVTGの分離・定量も可能となってきた。Yamanaka *et al.* (1998) は、陰イオン交換カラムを使用する方法をマミチヨグ、マダイ及びコイの血漿試料に適用し、20µg/mLレベルの血漿中VTGを検出・定量することができる手法を開発した。

分析条件は、以下の通りである。

カラム：POROS-HQ（陰イオン交換カラム）

検出器：UVモニター（280nm）

試料量：10µL

溶離液：A；20mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）

B；1.5M NaClを含有する20mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）

溶離液の濃度勾配：

下記のプログラムのように溶離液A及びBを混合し、溶離液Bの割合を段階的に増加し、混合溶離液中NaCl濃度を増大させる。

0-2分；溶離液A100%，2-3分；溶離液Bの割合を10%まで直線的に増加，3-4分；溶離液B10%，4-10分；溶離液Bの割合を80%まで直線的に増加，

10-11分；溶離液Bの割合を100%まで直線的に増加，11-14分；溶離液B100%

溶離液の流速：2.5mL/分

この分析条件で、陰イオン交換カラムに吸着したVTGは、溶離液の塩濃度（イオン強度）の変化に伴ったイオン交換により、Fig.10に示すように分析開始約10分後に溶出する。飯島ら（2001）もイオン交換HPLC法によるVTGの分析を検討し、Yamanaka *et al.*（1998）と同様な結果を得ている。Yamanaka *et al.*（1998）及び飯島ら（2001）は、保持時間約10分のピークをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析した結果、ほぼ単一のバンドを示し、分子量が150-170kDaのVTG単量体であることを明らかにした。すなわち、魚類血清中VTGをイオン交換HPLC法

により他の成分から単離できることが明らかになった（Fig.10）。

精製VTGを用い、イオン交換HPLC法により検量線（Fig.10）を作成したところ、2-150 μ gまでの範囲で直線性を示したことから、検出下限は2 μ gであった。分析に使用する試料溶液を10 μ Lとすると、検出下限は約20 μ g/mLであり、成熟・産卵期の雌血清中のVTG測定には使用することができる。

飯島ら（2001）は、成熟・産卵期のマコガレイの雌血清中VTGを酵素免疫測定法及びイオン交換HPLC法で測定し、両者の測定値を比較した。VTG濃度が1mg/mL以上の血清を1,000-10,000倍に希釈し、酵素免疫測定法で測定した場合、イオン交換HPLC法による測定値より低くなる傾向が見られることを報告し、VTG濃度が1mg/mL以下と予測される場合には酵素免疫測定法を、また、以上と予測される場合にはイオン交換HPLC法を適用することを推奨している。

VTGの分子量は魚種により異なることを上述した。VTGの化学的特性は、イオン交換HPLCによるVTGのクロマトグラム（保持時間及びピークの形状）に影響する可能性がある。従って、検量線の作製などのために標準物質として使用するVTGは測定対象魚類から精製・調製することが必要である。しかし、イオン交換HPLC法では、酵素免疫測定法と異なって測定対象魚類毎に抗体（捕獲抗体及びビオチン化抗体）を作製する必要がない。抗原の免疫及び抗体作製並びに抗体の精製のための煩雑な操作及び熟練した技術が要求されない。操作が簡便であるために、1mg/mL以上の高濃度の血清中VTG試料のルーチンの分析には有益な方法である。

4. おわりに

魚類血清中VTGの測定に焦点を当てて、その手法の開発及び発展過程を概観した。検出感度、精度、測定の簡便さ、使用する機器や設備の特殊性等の視点で考えると、EDCsによる水域汚染の実態解明や魚類に対する作用機構解明の研究において適用できる測定法は酵素免疫測定法及びイオン交換HPLC法であると考えられる。この2つの方法はともにほぼ完成していると考えられるが、特に、酵素免疫測定法については、手法の規格化、キット化などさらなる手法の簡素化のための検討

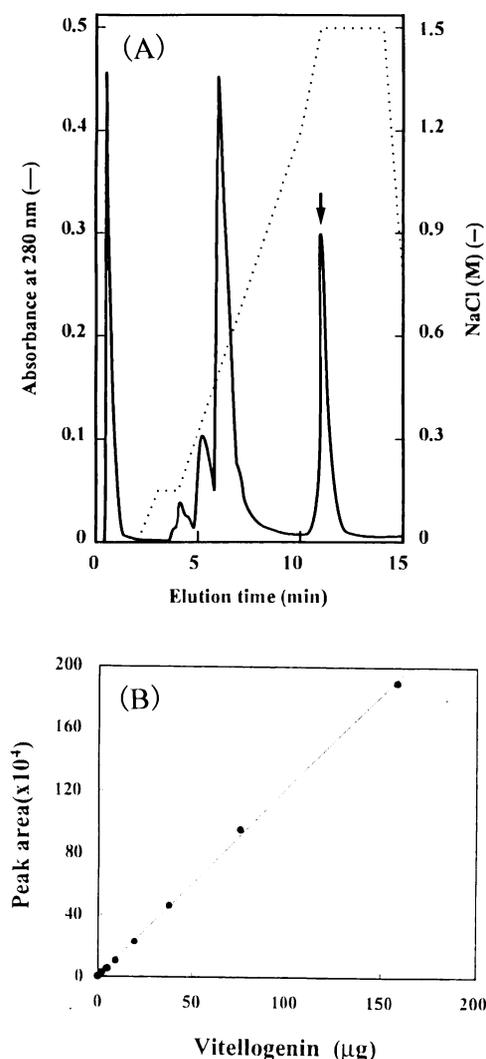


Fig. 10 Separation of serum proteins from female mature flounder by HPLC (A) and calibration curve of vitellogenin (B). (after Iijima *et al.*, 2001)

がなされることを期待する。

さらに、VTG生成に関与する遺伝子の発現がEDCsの影響解明の有益な情報となることが考えられ、遺伝子発現測定法の開発及び規格化（ルーチン化）に関する研究も今後の重要な課題と考えられる。

なお、次号では、初心者が実験を行う際の指針、参考とするために、酵素免疫測定法及びイオン交換HPLC法について最新の方法及び実験や現地調査を行う際の注意点について具体的に解説する予定である。

謝 辞

本原稿の取りまとめにおいて、清水昭男博士（(独)水産総合研究センター中央水産研究所）、藤井一則博士（同瀬戸内海区水産研究所）及び飯島憲章教授（広島大学）には、ビテロジェニンの免疫学的な特性や免疫測定法に関する基礎的な知見についてご教授を頂き、さらに、多くのご助言を賜った。図の作成においては柴崎道廣総括研究員のご尽力を頂いた。多くの方々のご協力に対し深く感謝の意を表します。

引用文献

- 有園幸司（1998）. 環境ホルモン測定法の進歩, 環境ホルモンの影響をはかる. 別冊化学, 環境ホルモン&ダイオキシン—話題の化学物質を正しく理解する—, 化学同人, 京都, pp. 48-53.
- Copeland, P. A., Sumpter, J. P., Walker, T. K. and Croft, M. (1986). Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 75-80.
- Copeland, P. A. and Thomas, P. (1988). The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 17-23.
- Fujii, K., Hara, A. and Shiraiishi M. (1998). Quantification of vitellogenin in red sea bream by single radial immunodiffusion. *SUISANZOSHOKU*, **46**, 355-366.
- 藤井一則（2000）. マダイ及びベステルのビテロジェニンに関する研究. 瀬戸内水研報, No.2, 1-48.
- 藤井一則（2005）. 第2章 水域生態系における内分泌かく乱物質の影響実態と作用機構の解明, 1. 影響実態の解明, (5) 新規バイオマーカーによる内分泌かく乱物質の魚類への影響評価法の開発と実態把握. 農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究（研究成果433）, 農林水産省農林水産技術会議事務局, pp. 152-156.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Sato, K., Hara, A. and Fujita, K. (1998). Vitellogenin in wild male flounder, *Pleuronectes yokohamae*, in Tokyo bay, Japan. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **1**, 75-85.
- Hara, A. (1987). Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleost: Immunochemical, physicochemical and structural studies. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **34**, 1-59.
- Hara, A., Sullivan, C. V. and Dickhoff, W. W. (1993). Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, **10**, 245-246.
- 原 彰彦（1998）. 魚類の血液で環境ホルモン汚染をみる, バイオマーカーとしての血清タンパク, ビテロジェニン. 科学, **68**, 591-596.
- 原 彰彦（1999）. 水環境における汚染影響評価のバイオマーカーとしてのビテロジェニン, 環境毒性学会誌, **2**, 35-42.
- Idler, D. R., Hwang, S. J. and Crim, L. W. (1979). Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 574-578.
- 飯島憲章・植松一眞・下川真理子・石井裕子・大嶋雄治・藤井一則・橋本伸哉・原 彰彦・山田 久（2001）. 瀬戸内海周防灘及び広島湾のマコガレイに対するエストロゲン様内分泌攪乱物質の影響実態. 環境毒性学会誌, **4**, 45-53.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. and Sumpter, J. P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic

- alkylphenolic chemics. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 194-202.
- 柏田祥策 (2003). 第5章 脊椎動物, 5.5 メダカ (特異タンパク～Vtgバイオマーカー). 生態影響試験ハンドブック—化学物質の影響リスク評価—, 日本環境毒性学会編, 朝倉書店, 東京, pp. 228-243.
- Kishida, M. and Specker, J. L. (1993). Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish. Physiol. Biochem.*, **12**, 171-182.
- Kwon, H. C., Hara, A., Mugiya, Y. and Yamada, J. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in white spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **41**, 162-180.
- Mananos, E., Nunez, J., Zanuy, S., Carrillo, M. and Menn, F. L. (1994). Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II -Validation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, **107B**, 217-223.
- Mancini, G., Carbonara, A. O. and Hermans, J. F. (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusions. *Immunochemistry*, **2**, 235-254.
- Matsubara, T., Wada, T. and Hara, A. (1994). Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 545-555.
- 中村 弘 (1985). 沈降反応. 実験生物学講座14, 免疫生物学, (村松 繁・増田 徹・桂 義元編), 丸善, 東京, pp. 71-83.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y. and Matsubara, T. (2003a). Estrogenic activity in coastal areas around Japan evaluated by measuring male serum vitellogenins in Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus*. *Fish. Sci.*, **69**, 1133-1143.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y. and Matsubara, T. (2003b). Development of enzyme - linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 353-363.
- 大久保信幸・持田和彦・松原孝博 (2006). III. 水産生物に対する影響実態と評価, 4. ビテロジェニンによる影響評価, § 1. 沿岸域の影響評価. 環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構—, (環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.65-75.
- Okumura, H., Hara, A., Saeki, F., Todo, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1995). Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish. Sci.*, **61**, 283-289.
- Rodriguez, J. N., Kah, O., Geffard, M. and Menn, F. L. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 741-746.
- Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E., Clement-Jones, V. V. and Lowry, P. J. (1981). Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal. Biochem.*, **117**, 136-146.
- So, Y. P., Isler, D. R. and Hwang, S. J. (1985). Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* Ouananiche): Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 63-71.
- Sumpter, J. P. (1985). The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Current Trends in Comparative Endocrinology*. (eds. by Lofts, B. L. and Holmes, W. N.), Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 355-357.
- Wang, H., Yan, T., Tan, J. T. T., Gong, Z. (2000). A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*,

256, 303-310.

Yamanaka S., Arizono, K., Matsuda, Y., Soyano, K., Urushitani, T., Iguchi, T. and Sakakibara, R. (1998). Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**,

1196-1200.

坂本達也・征矢野清・渡辺康憲 (2006). III. 水産生物に対する影響実態と評価, 4. ビテロジェニンによる影響評価, § 3. 内湾干潟域における影響実態. 環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構—, 恒星社厚生閣, 東京, pp.81-87.

