

研究要旨：

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の α 2u-globulin (AUG)の測定方法を開発し、その endocrine disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。今回開発した測定法は添加回収率、再現性共に良好であり、diethylstilbestrol (DES) を正常雄ラットに投与した際の血清 AUG 濃度の変動を観察した結果、DES 投与群で著しい減少が観察され、病理組織学的に精巣の萎縮性変化を認めなかった動物においても明らかな血清 AUG の低下が認められた。このことから、血清 AUG の測定は正常動物に対する estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

A. 研究目的

ELISA 法によるラット血清中の α 2u-globulin (AUG)の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter(EDs) screening 法への応用の可能性について検討する。

cellulose カラムに添加した。カラムを洗浄後、同緩衝液に NaCl を 0.5M の gradient をかけて吸着した蛋白を溶出し最初の溶出ピークを採取、更に Sephacryl 100HR カラムを通し、AUG を精製した。

B. 研究方法

1. Sandwich ELISA 法による α 2u-Globulin (AUG) 測定法の開発

AUG の精製

雄 SD ラット (10 週齢) に Decaline を 200 mg/kg の用量で 5 日間投与し、投与 4 日後、5 日後の尿を pool した後、12000 rpm、10 分遠心分離し上清を採取した。上清に硫酸アンモニウムを 50%飽和となるように加え (globulin 分画)、4℃、overnight mixing した後、12000 rpm、10 分遠心分離し、沈澱を回収した。沈澱を 0.01M リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.1) に溶解、同緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラムに添加し蛋白分画を採取し、同緩衝液で平衡化した DEAE

ウサギ polyclonal 抗 AUG 血清 (IgG 分画) の作製

AUG を Freund's Complete Adjuvant と混合乳化し、NZW 雄ウサギに蛋白量として 100 μ g/animal の用量で、週 1 回、計 3 回免疫し、最終免疫の 2 週間後に得られた血清を採取した。抗血清には 1 ml あたり 0.18 g の硫酸ナトリウムを加え、室温で 1 時間攪拌後、12000 rpm、10 分遠心して得た沈澱を 17.5 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.3) に溶解し、同緩衝液で平衡化した PD-10(Sephadex G25)カラムに添加して蛋白分画を採取した。次いで得られた蛋白分画を同緩衝液で平衡化した DEAE cellulose カラムに添加し、カラムを素通りする蛋白分画を

IgG fraction として採取した。

Affinity 精製抗 AUG 抗体の作製

AUG を定法に従って 5mg/ml の用量で Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (CNBr4B, Pharmacia BT) に固相化し Affinity 担体を作製した。作製した AUG-Sepharose にウサギ抗血清を添加し室温で 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し結合しなかった蛋白を洗い流した。カラムに吸着した抗体は 0.5 M NaCl 含有 Glycine hydrochloride buffer (pH 2.4) で溶出した。なお、溶出した抗体は 3 M Tris hydrochloride (pH 7.4) で直ちに中和し変性を防いだ。

酵素標識抗 AUG 抗体の作製

Horseradish peroxidase (HRP) 10 mg を 0.2 ml の 1.25% glutaraldehyde 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を生理食塩液で平衡化した Sephadex G25 に添加し活性化 HRP を得た。活性化 HRP 1 ml に 5 mg の IgG を加え、更に 0.1 ml の 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) を加えた後、4℃で 24 時間反応させた。0.2 M lysine 溶液 0.1 ml を加えた後、PBS (pH 7.2) に対して 4℃、一夜透析を行い、酵素標識抗体を作製した。

Sandwich ELISA 法によるラット血清 AUG の測定

抗体固相化プレートの作製

Affinity 精製抗 AUG 抗体を 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を用いて 5µg/ml に調製した後、ポリスチレン製 ELISA プレート (Immulon 200, Greiner) の well 内に 100µl を加え 4℃、一夜放置した。プレートは 25%BlockAce で

ブロッキングを行った後、使用した。

血清 AUG の測定

血清は 0.5%Tween 20 含有 Tris buffered saline (TBS-Tween, pH 7.2) で 1000 倍に希釈した後、抗体固相化プレートに添加し、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、TBS-Tween で希釈した酵素標識抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、o-phenylenediamine、H₂O₂ を基質として発色させた。1N H₂SO₄ を加えて反応を停止した後、SpectraMAX™ (Molecular Devices Inc.) を用い、650 nm を参照波長として 490 nm の吸光度を測定し、既知の抗原を反応させた際の標準曲線から血清中 AUG 濃度を推定した。

2. Diethylstilbestrol (DES) 投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響

使用動物：

動物は日本チャールス・リバー株式会社 (日野飼育センター、〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735) で生産された Crj: CD (SD) IGS ラット (SPF) を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 23±2℃、相対湿度 55±10%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯-19 時消灯) に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ (165 W_300 D_150 H mm、トキワ科学器械株式会社) に個別飼育した。

被験物質の調製及び投与

Diethylstilbestrol (DES, SIGMA CHEMICAL COMPANY) を購入し、olive oil

を媒体として 1、10、100mg/kg/day の用量で 14 日間反復強制経口投与を行った。なお、1mg/kg/day は 8 日目以降、投与量を 0.1 mg/kg/day に変更した。

血清の採取

尾静脈から約 1 ml 採血し、3000 rpm、10 分遠心分離し血清を採取した。なお、採血は DES 投与開始 1 日前、投与 1、3、7、10、14 日後に行った。

病理組織学的検査

全例の精巣についてブアン液にて固定した後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して光学顕微鏡的に検査を行った。

C. 研究結果

1 Sandwich ELISA 法による α_{2u} -Globulin (AUG) 測定法の開発

ウサギ抗 AUG polyclonal 抗体を用いて Sandwich ELISA 法による AUG 測定法の開発を試みた結果、測定範囲は、10~250ng/ml であった。添加回収率は 98.3 %、同時再現性は CV=4.53~13.15%、日差再現性は CV=6.24%であり良好な結果が得られた。

本法を用いて無処置の Crj:CD(SD)IGS 雄 Rat について 5 週齢から 20 週齢までの血清 AUG 濃度の推移を観察した結果、血清 AUG は 5 週齢では検出されず、6 週齢から急激に上昇し、8 週齢以後 20 週齢までほぼ一定の値で推移した。なお、雌では血清希釈倍率による吸光度の変化がみられないことから、雌ラット血清中には AUG が含まれないことが確認された。

2 Diethylstilbestrol(DES)投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響

いずれの DES 投与群においても媒体対照群と比較して投与 3 日後から AUG 値の著しい低下が観察され、10、100mg/kg/day の用量群では投与 7 日後以降、血清 AUG level は検出限界以下となった。投与終了時に採取した精巣について病理組織学的検査を行った結果、媒体対照群では異常は認められなかったが、1 mg/kg/day 投与群では 5 例中 4 例に軽度から中等度のパキテン期精母細胞の変性 (Degeneration of pachytene spermatocytes) が認められ、10 mg/kg/day 投与群では全例に中等度のパキテン期精母細胞の変性及び伸長精子細胞の停滞 (Retention of elongated spermatids) 並びに精子細胞の精細管からの離脱抑制 (Inhibited spermiation)、5 例中 4 例に伸長精子細胞の減少 (Decreased elongated spermatids) が認められた。また、100 mg/kg/day 投与群では全例に中等度のパキテン期精母細胞の変性及び精子細胞の滞留が認められ、1/5 例には重度の精細管の萎縮 (Atrophy of seminiferous tubules) 及び Leydig 細胞の過形成 (Leydig cell hyperplasia) が認められた。

D. 考察

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の AUG の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。今回開発したウサギ抗 AUG polyclonal 抗体を用いた Sandwich ELISA 法は添加回収率は 98.3 %、同時再現性は C.V.=4.53~13.15%、日差再現性は C.V.=6.24%と良好な結果が得られた。本法を用いて無処置の

Crj:CD(SD)IGS 雄 Rat について 5 週齢から 20 週齢までの血清 AUG 濃度の推移を観察した結果、血清 AUG は 5 週齢では検出されず、6 週齢から急激に上昇し、8 週齢以後 20 週齢まではほぼ一定の値で推移した。また、雌では血清希釈倍率による吸光度の変化がみられなかった。AUG は雌ラット及び幼若雄ラットでは発現せず(Kulkarni, A.B.ら, 1985)、肝臓での AUG 生合成は生後 9-12 週齢で Peak に達する(Sippel, A.E.ら, 1975)と報告されていることから、正常雌ラット及び雄ラットの血清 AUG level の測定結果は既報と一致するものと思われる。したがって、本法はラット血清中の AUG 測定法として有用と思われる。

次いで Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討するため、本法を用いて Endocrine disrupter 研究に繁用されている DES を雄正常ラットに投与した際の血清中の AUG 濃度の変動を観察した。その結果、DES 投与群では投与 3 日後までは明白な変化はみられないものの、投与 5 日後以降各投与群とも血清 AUG 濃度は著しく低下し、10 mg/kg/day 以上の群では投与 7 日後以降は検出限界以下となった。同時に行った精巣の病理組織学的検査の結果では DES 投与群では用量依存的に精巣の萎縮性変化が認められた。1 mg/kg/day 投与群では 5 例中 4 例に軽度から中等度のパキテン期精母細胞の変性が認められたのみであったが、いずれの動物にも著しい血清 AUG の低下がみられ、病理組織学的に異常を認めなかった 1 例に関しても血清 AUG の明らかな低下が認められていることから、血清 AUG の測定は正常動物に対する Estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

肝における AUG 遺伝子の発現調節機構は未だ解明されておらず、今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにし、AUG 測定の意義を明確にする必要があるが、古くから本蛋白質が Estrogen 投与により影響を受けることが知られており、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法の開発は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

E. 結論

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の $\alpha 2u$ -globulin (AUG)の測定方法は、添加回収率、再現性共に良好であり、正常動物に対する Estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

F. 研究発表

1. 論文発表

2 学会発表

穴井俊二、武吉正博、飯田憲二、Sandwich ELISA 法による $\alpha 2u$ -Globulin 測定系の検討、第 32 回実験動物技術者協会総会(仙台)、1998