

## E. 結論

PAHQ の分子構造とエストロゲン様及び抗エストロゲン活性との関係を検討した。L/B 比と O-H distance を用いて評価したところ、強いエストロゲン様活性を示す PAHQ の O-H distance 値は 10.290 ~ 11.519 Å の狭い範囲に存在した。

次に、PAHQ の酸素原子の部分電荷及び第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P を、CACHe を用いたコンピューターシミュレーション解析によって算出した。エストロゲン様活性を示す PAHQ では、第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P のパラメーターでそれぞれ 8.526 ~ 9.029 eV、4.909 ~ 5.556 debye、3.462 ~ 3.782 の狭い範囲に存在した。抗エストロゲン活性を示す 11 種の PAHQ では、第 1 イオン化エネルギー、log P でそれぞれ 8.526 ~ 9.201 eV、2.459 ~ 3.782 の比較的狭い範囲で存在し、これらのパラメーターの範囲が活性を示すための指標となる可能性が示唆された。

さらに、酵母 two-hybrid アッセイ法によって得られた PAHQ のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を比較した。強い活性を持った PAHQ は 4 環性 CQ 骨格を共通構造とし、2 つのケトン基を末端の環に持つことが分かった。また、その構造は E<sub>2</sub> の構造と類似することがわかり、PAHQ にも OHPAH 同様に構造活性相関があるのではないかと考えられた。

Table 1 L/B and O-H distance of E<sub>2</sub> and PAHQ

Compound	L/B ratio	O-H distance (Å)
E <sub>2</sub>	1.95	11.185 / 11.695
1,2-NQ	1.25	7.434
AcQ	1.04	6.967
1,4-AQ	1.45	8.144 / 8.153
9,10-AQ	1.46	6.115 / 6.116
1,4-PQ	1.41	8.436
9,10-PQ	1.43	7.204 / 7.214
Frt-2,3-Q	1.24	9.211
1,2-BAQ	1.31	8.411
1,2-CQ	1.8	11.519
1,4-CQ	1.7	10.330
5,6-CQ	1.73	8.189
BcP-1,4-Q	1.31	9.851
BcP-5,6-Q	1.29	8.971
BeP-4,5-Q	1.18	9.778 / 9.782
BaP-1,6-Q	1.27	10.364
BaP-3,6-Q	1.36	10.914
BaP-4,5-Q	1.31	9.577
BaP-7,8-Q	1.32	10.29
BaP-7,10-Q	1.41	11.514
BaP-11,12-Q	1.3	8.368

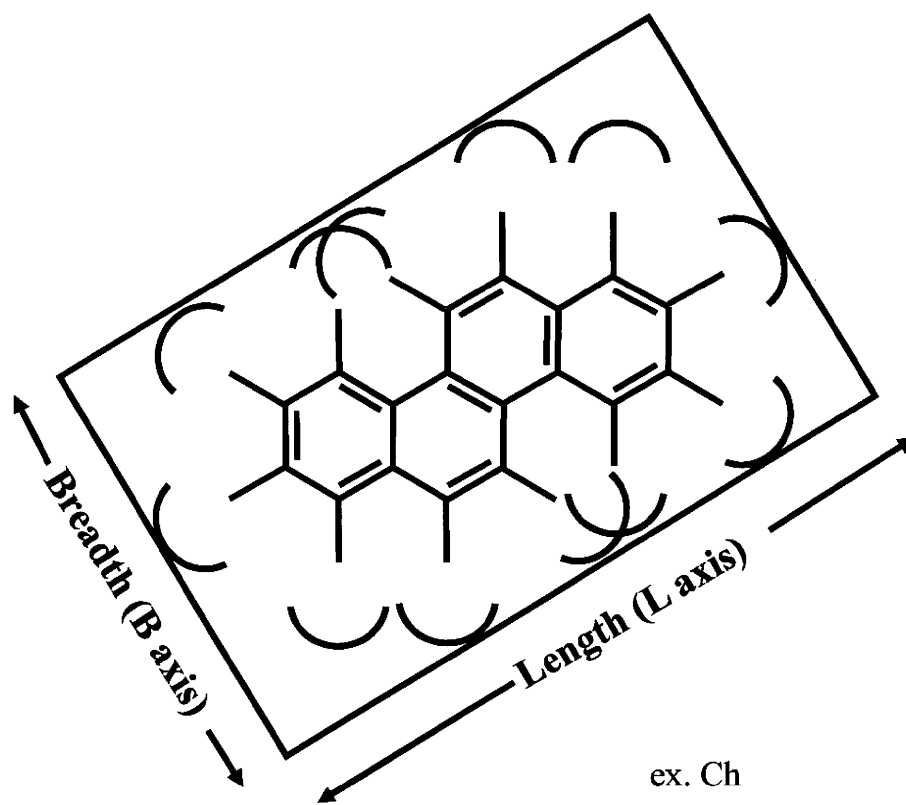


Fig. 1 Length-to-breadth ratio (L/B) of planar PAHs

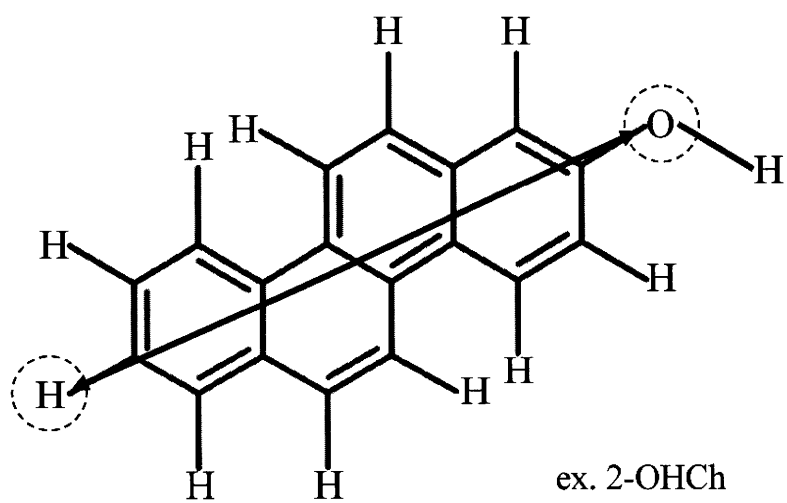


Fig. 2 Farthest distance between oxygen of hydroxygroup and hydrogen (O-H distance)

Table 2 Physicochemical properties of E<sub>2</sub> and PAHQ

	Partial charge	Ionization potential (eV)	Dipole moment (debye)	Log P
E <sub>2</sub>	-0.318 / -0.253	8.876	1.441	4.008
1,2-NQ	-0.256 / -0.256	9.766	4.968	1.457
AcQ	-0.249	9.479	4.978	1.761
1,4-AQ	-0.300	9.294	1.972	2.459
9,10-AQ	-0.309	10.172	0.583	2.459
1,4-PQ	-0.298 / -0.288	9.201	1.414	2.459
9,10-PQ	-0.263 / -0.262	9.447	4.675	2.459
Frt-2,3-Q	-0.254 / -0.252	9.366	5.239	2.779
1,2-BAQ	-0.307 / -0.298	9.125	1.168	3.462
1,2-CQ	-0.256 / -0.253	9.029	5.334	3.462
1,4-CQ	-0.299 / -0.290	9.007	1.887	3.462
5,6-CQ	-0.263	9.020	4.229	3.462
BcP-1,4-Q	-0.290 / -0.277	9.034	3.003	3.462
BcP-5,6-Q	-0.261 / -0.258	8.988	4.673	3.462
BeP-4,5-Q	-0.263 / -0.261	9.171	5.046	3.782
BaP-1,6-Q	-0.320 / -0.315	8.961	1.085	3.782
BaP-3,6-Q	-0.317 / -0.312	8.878	4.909	3.782
BaP-4,5-Q	-0.267 / -0.266	8.899	5.006	3.782
BaP-7,8-Q	-0.259 / -0.255	8.526	5.556	3.782
BaP-7,10-Q	-0.307 / -0.296	8.569	2.004	3.782
BaP-11,12-Q	-0.272 / -0.261	8.697	4.597	3.782

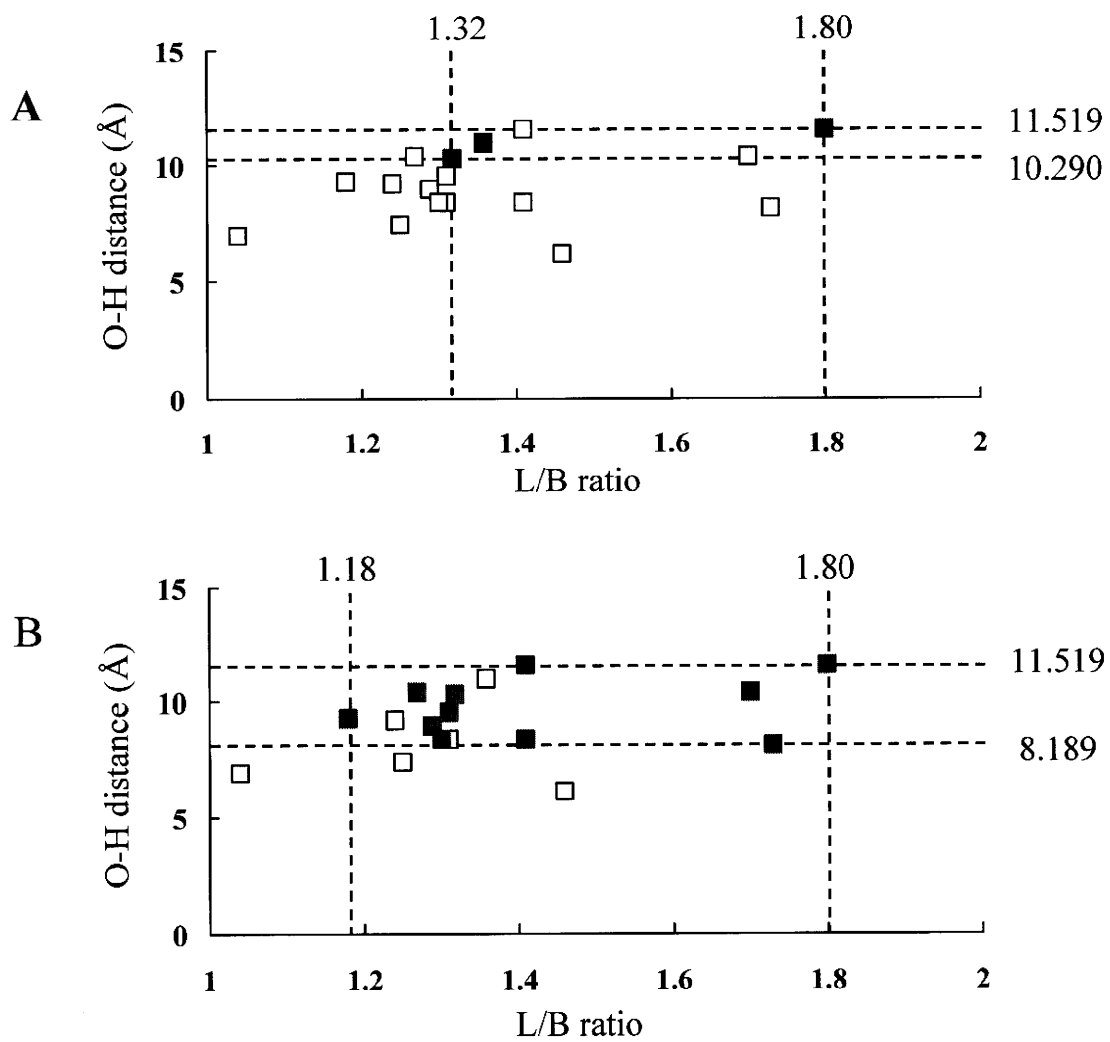


Fig. 3 Relationship between L/B ratio and (A) O-H distance and estrogenic activity or (B) antiestrogenic activity

Table 3 Induction and Inhibition to yeast two-hybrid assay, inhibition to receptor binding assay of PAHQ

Compound	induction (%)	Inhibition (%)
1,2-NQ	n	n
AcQ	n	n
1,4-AQ	n	—
9,10-AQ	n	n
1,4-PQ	n	37
9,10-PQ	n	—
Frt-2,3-Q	n	n
1,2-BAQ	n	n
1,2-CQ	25	59
1,4-CQ	n	50
5,6-CQ	n	50
BcP-1,4-Q	—	—
BcP-5,6-Q	n	44
BeP-4,5-Q	n	30
BaP-1,6-Q	n	40
BaP-3,6-Q	48	n
BaP-4,5-Q	n	47
BaP-7,8-Q	12	56
BaP-7,10-Q	n	24
BaP-11,12-Q	n	43

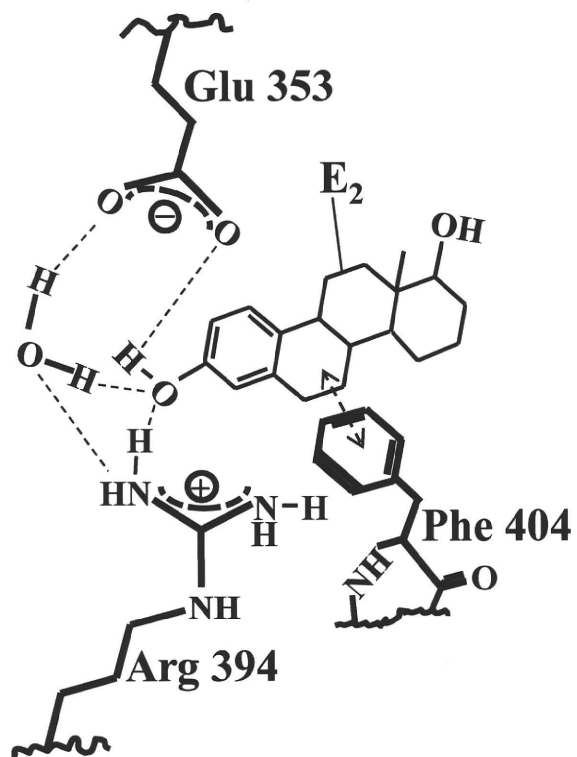


Fig. 4 Speculation of ER- E2 binding mode



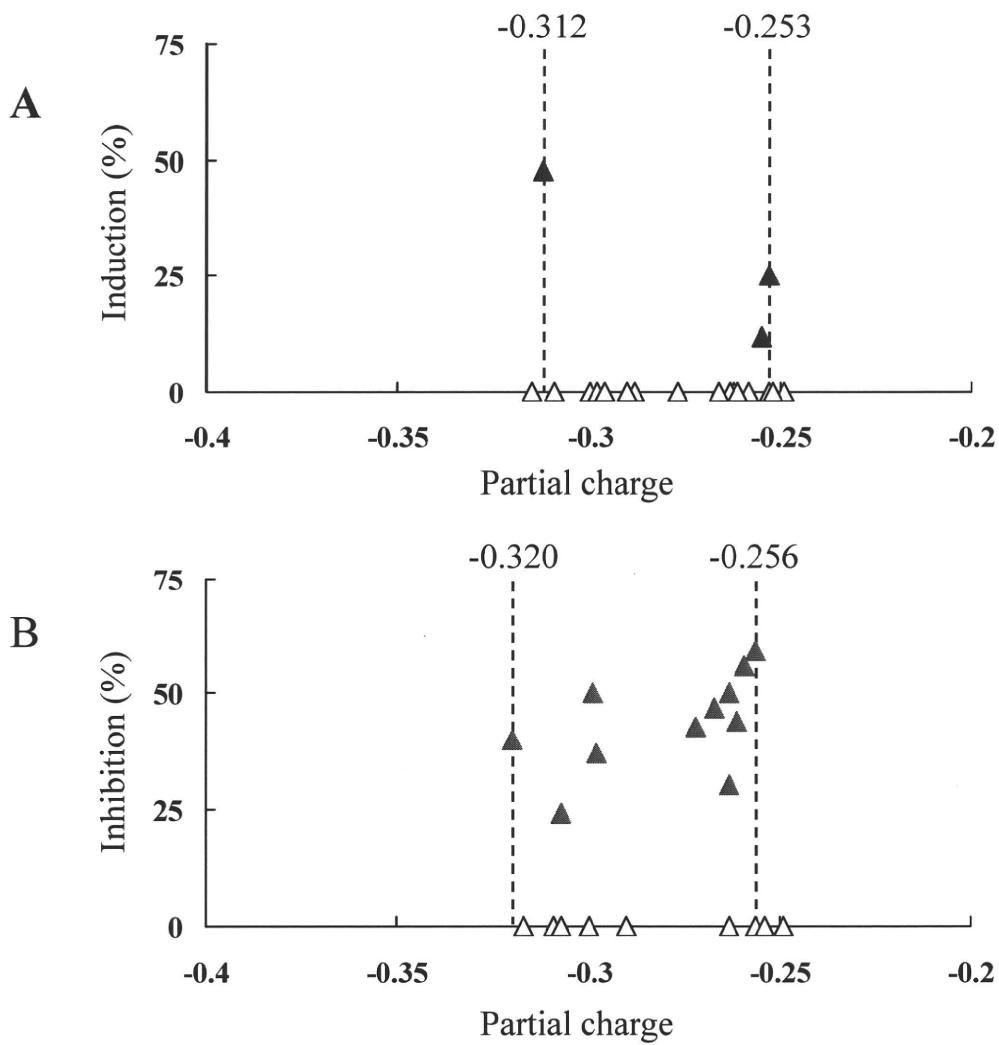


Fig. 5 Partial charge vs estrogenic activity (A) or antiestrogenic activity (B)

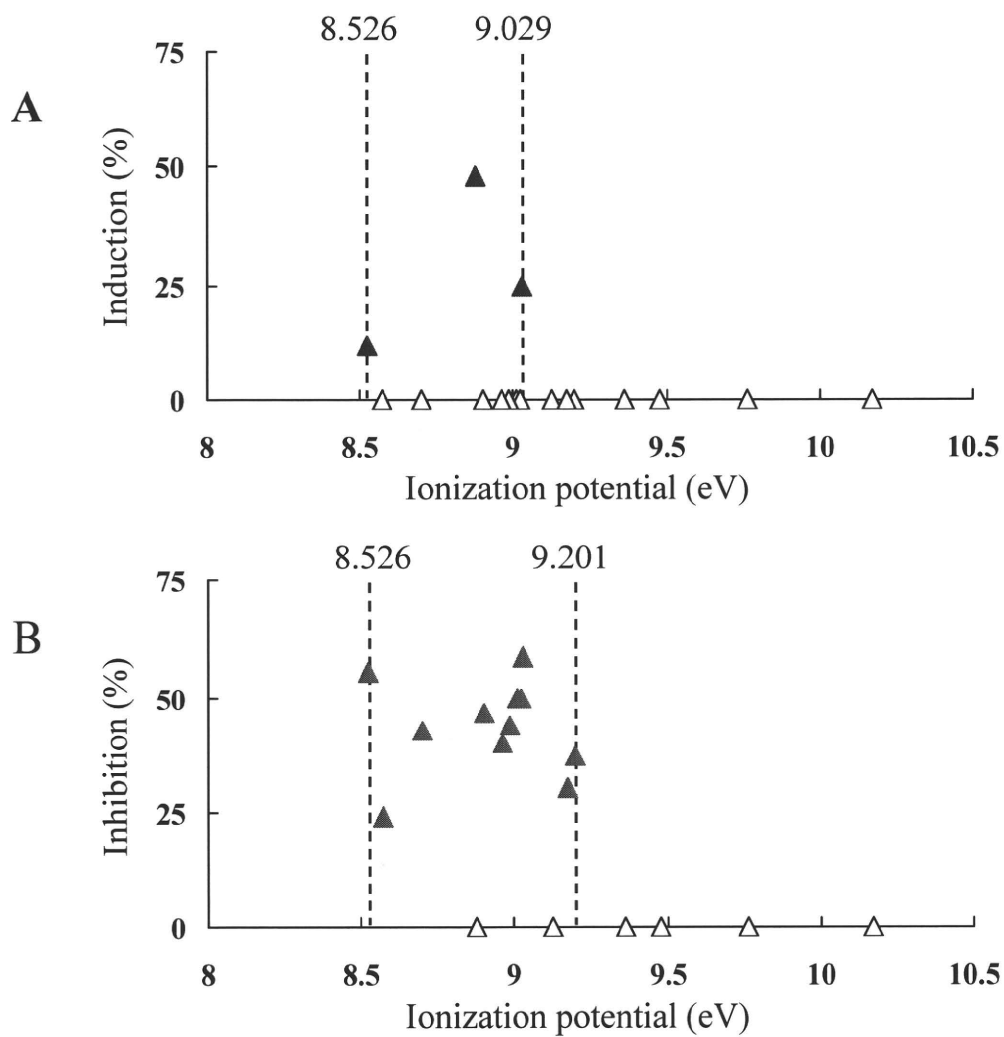


Fig. 6 Ionization potential vs (A) estrogenic activity and (B) antiestrogenic activity

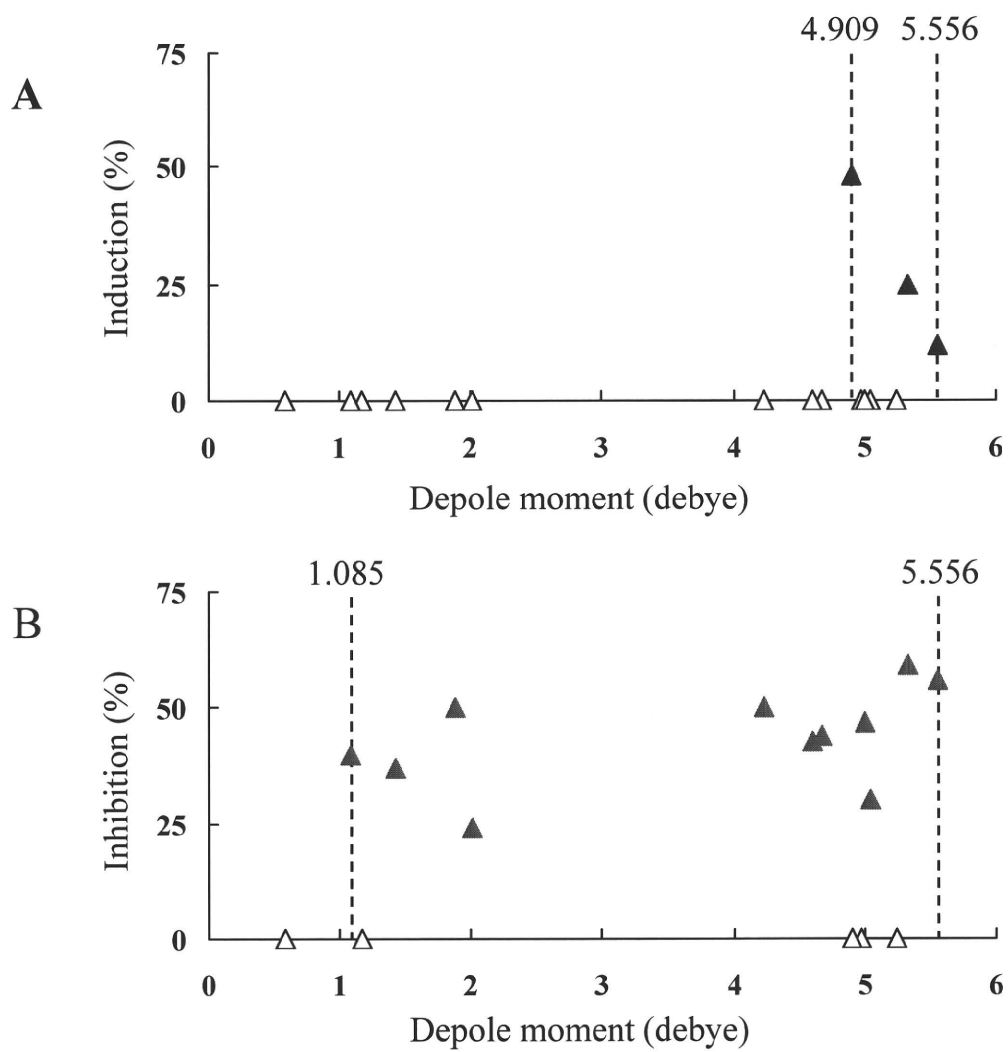


Fig. 7 Dipole moment vs (A) estrogenic activity and (B) antiestrogenic activity

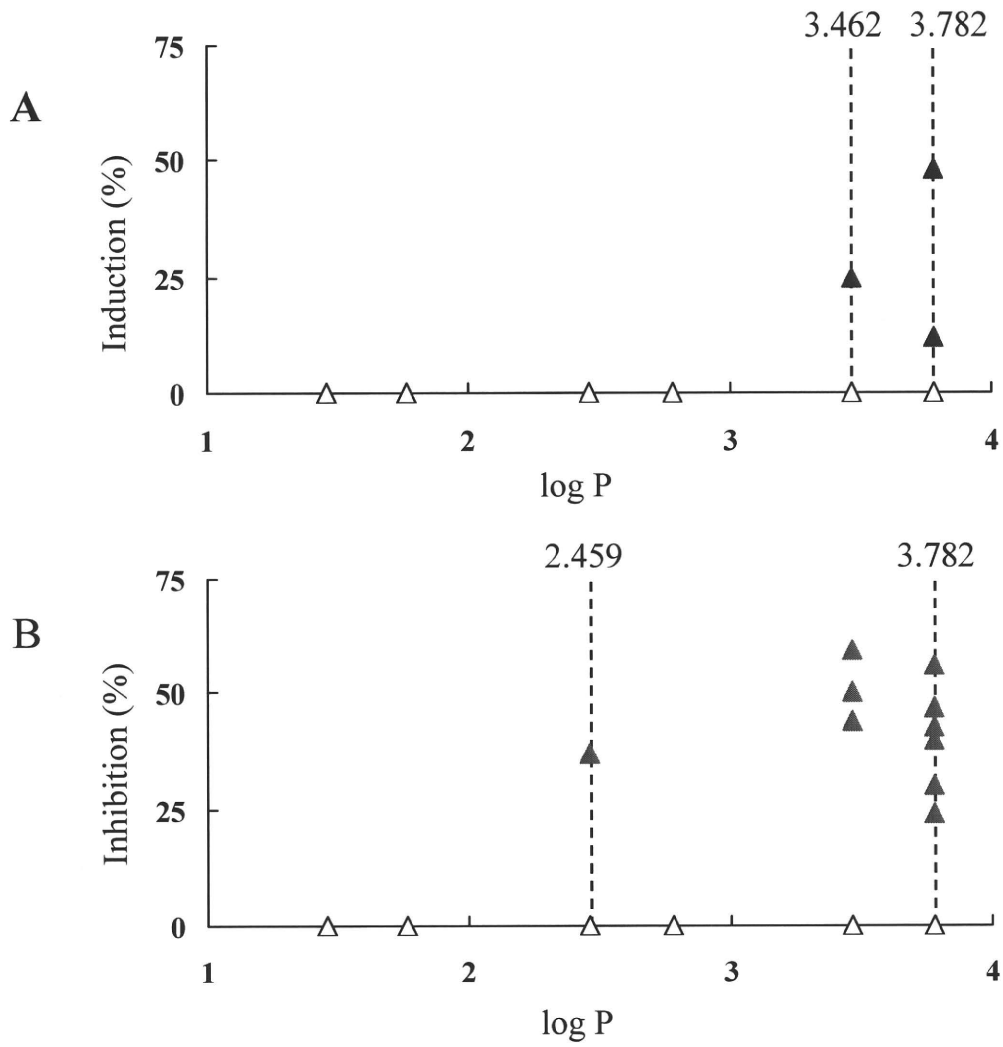


Fig. 8 log P vs (A) estrogenic activity and (B) antiestrogenic activity

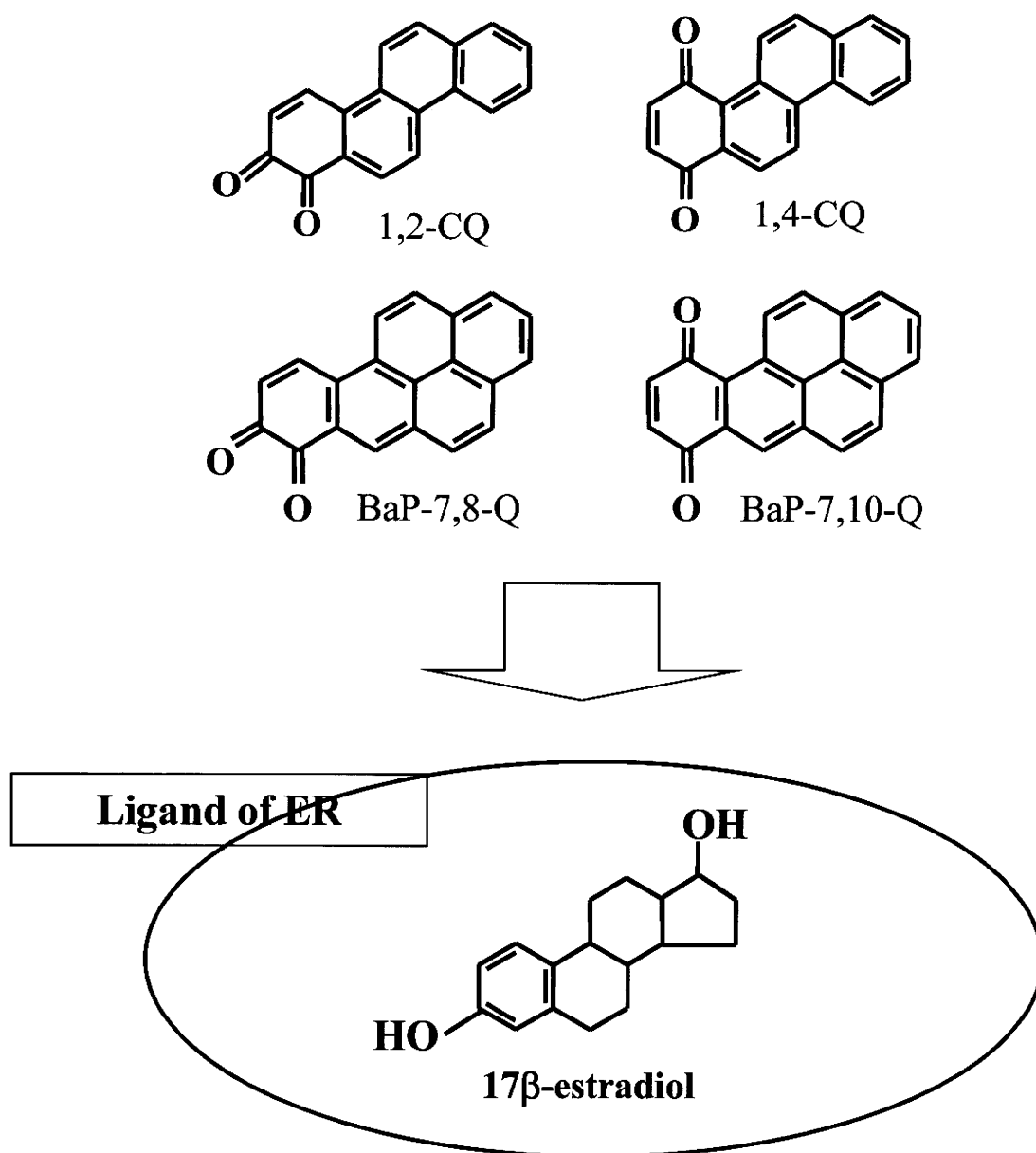


Fig. 9 Comparison of common structures (1,2-CQ, 1,4-CQ, BaP-7,8-Q, BaP-7,10-Q) and E<sub>2</sub>

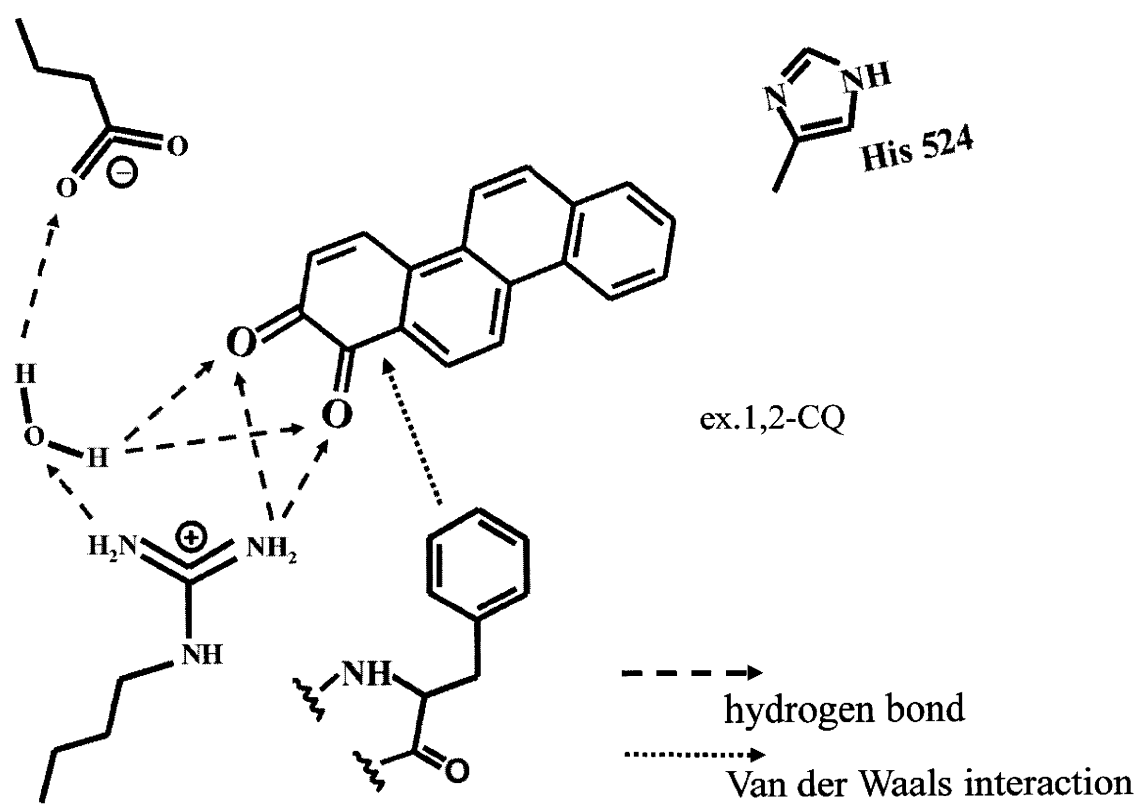


Fig. 10 Speculation of ER - *o*-PAHQ binding mode

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システム  
に関する研究  
平成 22 年度分担研究報告書

生物材料を用いた試験  
—魚類のウロコを用いた新規かつ高感度バイオアッセイ系の開発と応用—

研究分担者 鈴木 信雄 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設 准教授

研究要旨

真骨魚類例えばキンギョは、背骨ではなくウロコからカルシウムの出し入れを行っていることに注目して、ウロコの培養システムを開発した。ウロコには、ヒトの骨と同様に骨を作る細胞（骨芽細胞）と骨を壊す細胞（破骨細胞）が石灰化した骨基質の上に共存しており、シンプルな骨のモデルである。さらに、ウロコは再生するという性質をもち、その再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性が非常に高いことが判明した。そこで本研究では、①再生ウロコを用いた評価システムの構築、②評価システムによる細胞毒性の検出、③ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出、④エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析の4項目について報告する。

A. 研究目的

多環芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH）類は石油や石炭など化石燃料の燃焼に伴って生成して大気中に放出される非意図的生成化学物質の一つ（Lima et al., 2003）であり、難分解性の有機化合物として環境中に広く存在している。PAH は有機物質の不完全燃焼によって生成し、ガソリン車、ディーゼル車などの自動車排ガスや工場からの排気、ゴミの焼却、タバコ煙などの人為的発生源の他、森林火災や火山の噴火などの自然現象に起因するものもある（Liu et al., 2001 ; Smith et al., 2001）。

内分泌かくらん化学物質 は生物の恒常性、生殖、発生、あるいは行動に関与する種々の天然のホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合などにおいて類似の作用を示す又は阻害することで、直接的もしくは間接的にヒトや野

生生物に様々な影響を与える可能性があると考えられている。最近、非意図的生成化学物質の一つである PAH 類が内分泌かく乱化学作用を持つことが報告された（Tran et al., 1996 ; Clemons et al., 1998 ; Arcaro et al., 1999）。さらに、研究代表の早川らは、ディーゼル排出粉塵抽出物がエストロゲン様/抗エストロゲン活性、抗アンドロゲン活性を呈すること（Kizu et al., 2003）、そして酵母 two-hybrid 分析法を用いた研究において PAH はヒトエストロゲン受容体（Human estrogen receptor : hER）に対して活性を持たないが、モノヒドロキシ多環芳香族炭化水素（OHPAH）類は活性を示すことを証明した（Hirose et al., 2001 ; Hayakawa et al., 2007）。

PAH 類のいくつかはダイオキシンレセプターと言われるアрил炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon receptor : AhR）に結合し、Cytochrome P450（CYP）を誘導する（Charles et

al., 2000 ; Jaruchotikamol et al., 2007)。AhR はリガンド活性化型の転写因子であり (Hankinson et al., 1995)、全身に発現しているが特に肺や胸腺、肝臓で発現レベルが高い (Cervera et al., 1994)。そして PAH は誘導された CYP1A1 によって代謝され OHPAH になることが知られている (Charles et al., 2000 ; Jaruchotikamol et al., 2007)。したがって、体内で CYP1A1 により代謝された PAH 類が内分泌かく乱化学物質の本体である可能性が高い。

一方 PAH は原油にも含まれており (Utsumi et al., 1998 ; Okamura et al., 2002)、1997 年 1 月に日本海で発生したロシア船籍タンカーナホトカ号の重油流出事故では、流出した大量の重油による海洋生態系への影響が危惧されている。また 2010 年 4 月に起きたメキシコ湾の石油掘削基地の爆発により原油が流出した。これは 1989 年に 4 万キロリットルが流出したアラスカ州のタンカー事故 (エクソンバルディーズ号原油流出事故) を超え、過去最悪の環境汚染を引き起こす恐れがある。実際にエクソンバルディーズ号の重油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察されている (Peterson et al., 2003)。

海洋の PAH 汚染は主に雨水の流入と大気からの分配による (Lima et al., 2003 ; Li and Daler, 2004) が、これらオイルタンカー等の事故は直接、海洋の PAH 汚染を引き起こす (Bue et al., 1998; Heintz et al., 2000 ; Hayakawa et al., 2006)。重油流出直後に海洋の PAH 濃度は高値になり、長い期間 (14 年以上経って)、その海域の生物に影響を与えている (Peterson et al., 2003)。よって PAH 汚染は重大な環境問題であり、海洋生物に与える影響は深刻であり、一刻も早い原因の究明が急がれる。

日本海の海水中にも多くの PAH 類が検出されており、重油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察されていることから、本研究では環境中での有機汚染物質の毒性化反応の中で、特に魚の骨代謝に焦点を絞り研究を行った。そこ

で魚の骨代謝の影響を評価する方法として、魚類のウロコに注目した。魚類のウロコは、骨基質タンパク上に骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞が共存している (Fig. 1)。さらにウロコは再生するという性質をもち、その再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性が非常に高いことを報告している (Suzuki et al., 2009) (Fig. 2 参照)。

以上のことから、本研究では、①再生ウロコを用いた評価システムの構築、②評価システムによる細胞毒性の検出、③ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出、④エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析の 4 項目について報告する。

## B. 研究方法

### 実験動物

内分泌かく乱作用を解析するため、内在性のホルモンの影響を除外するために、オスのキンギョを用いた。すべての実験内容は、金沢大学動物実験倫理規程に従い実施した。

### 1. 再生ウロコを用いた評価システムの構築

#### 1-1. ウロコの採取

キンギョを 0.03% m-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネート (ナカライテスク株、京都市、日本) 水溶液で麻酔後、側線鱗の上および下の各 3 行より左右対称に各行 16 枚ずつ別々に抜去し (Fig. 3)、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した Leibovitz's L-15 培地 (Invitrogen, Auckland, NZ, USA) へ移した。そして、左側面のウロコを重量法で、右側面のウロコを面積法で、破骨細胞及び骨芽細胞のマーカーとしてそれぞれ酒石酸耐性酸ホファターゼ (TRAP) およびアルカリホファターゼ (ALP) 活性を測定した。



### 1-2. TRAP 活性の吸光度測定

ウロコを生食水で洗浄後、pH 5.3 の酸性酒石酸緩衝液 (20 mM 酒石酸含有 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液) 100  $\mu$ l ずつが入った 96 穴マイクロプレートの各ウェルの中へ 1 枚ずつ入れた。ウロコを入れた直後に、マイクロプレートをマイナス 80  $^{\circ}$ C で凍結・保存した。室温で解凍後 20 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含む pH 5.3 の酸性酒石酸緩衝液 100  $\mu$ l ずつ各ウェルへ加えて、20  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、3 N NaOH を 50  $\mu$ l ずつ各ウェルへ加えて反応を止めた。ウェル内をピペティングで攪拌後、150  $\mu$ l ずつ新しい 96 穴マイクロプレートへ移した。反応時にウロコを入れなかったウェルの溶液をブランクとして、405 nm で吸光度を測定した。

### 1-3. ALP 活性の吸光度測定

ALP 活性の吸光度測定は、アルカリ緩衝液 (1mM 塩化マグネシウム、0.1 mM 塩化亜鉛を含む、pH 9.5 の 100 mM トリス・塩酸緩衝液) を酸性酒石酸緩衝液に換えて使用した。その他の条件は、TRAP 活性測定と同様条件で行った。

### 1-4. ウロコの面積測定

吸光度測定のために反応液を新しいプレートへ移した後、残った反応液を除き、0.4 % のメチレンブルー液を各ウェルへ 100  $\mu$ l ずつ加え 5 分以上染色した。その後染色液を取り除き、生食水で洗浄後、透明なポリプロピレンシート上に 96 穴マイクロプレートと同じ配置で染色されたウロコを並べた。ポリプロピレンシート上の余分な水分をペーパータオルで除去した。その後ウロコが剥がれないようにポリプロピレン製のホルダーに挟み込み、イメージスキャナ

ー (CanoScan LiDE 600F, キヤノン(株)、日本) により解像度 300 ドット/インチ (dpi) の JPEG 画像としてウロコ画像を取り込んだ (Fig. 4)。

アメリカ国立衛生研究所 (NIH) から提供されている画像処理ソフトウェア「Image J」により、ウロコ画像のコントラストを最大化 (Brightness/contrast : Fig. 5) し、着色ウロコ以外のノイズ画像を除去後、カラー分離 (Split channels : Fig. 6) を行って、2 値化画像に変換して各ウロコのドット数を自動カウントした。その後、カウントした各ウロコのドット数をエクセルファイルへ出力し、個々のウロコ面積 ( $\text{mm}^2$ ) に換算した。

### 1-5. ウロコの TRAP および ALP 活性

基質液添加後 20 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、測定した 405nm の吸光度からブランク値を差し引いた吸光度を求めた。この吸光度を p-ニトロフェノール希釈系列より求めた校正曲線を用い 30 分間に脱リン酸化酵素により生じた p-ニトロフェノール量 (nmol pNP produced) を求めた。その後、重量補正法では、反応時間 (h) とウロコ 1 枚の重さ (mg) で生じた p-ニトロフェノール量を除して、単位時間 (h)・単位重量 (mg) 当たりの酵素活性 (nmol pNP produced/(mg scale $\times$ h)) とした。一方、面積補正法では、反応時間 (h) とウロコ 1 枚の面積 ( $\text{mm}^2$  scale) で生じた p-ニトロフェノール量を除して、単位時間 (h)・単位面積 ( $\text{mm}^2$ ) 当たりの酵素活性 (nmol pNP produced/( $\text{mm}^2$  scale $\times$ h)) とした。

### 1-6. ウロコの重量または面積と ALP および TRAP 活性の関連

キンギョの片側のウロコの ALP(48 枚)および TRAP(48 枚)活性 (nmol pNP produced/h) とそれ

それぞれのウロコ重量 (mg) を測定し、同じ個体の対側の対称位置のウロコの ALP(48 枚)および TRAP(48 枚)活性 (nmol pNP produced/h) とそれぞれのウロコ面積 (mm<sup>2</sup>) を 4 個体について測定した。そして、ウロコの重量と ALP または TRAP 活性との関連とウロコの面積と ALP または TRAP 活性との関連を調べた。

#### 1-7. 重量補正法と面積補正法との関連

ALP および TRAP 活性のそれぞれについて、単位重量当たりの活性値 (従来法) と単位面積当たりの活性値 (改良法) との間の相関関係を調べた。

#### 1-8. ウロコの面積と単位面積当たりの ALP および TRAP 活性との関連

ウロコの面積で ALP または TRAP 活性値 (nmol pNP produced/h) を除して算出した単位面積当たりの ALP または TRAP 活性値 (nmol pNP produced/(mm<sup>2</sup> scale×h)) とウロコの面積 (mm<sup>2</sup>) との関連から、単位面積当たりの活性に変換した効果を調べた。

#### 1-9. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差(standard error of mean: SEM)の形で表した。ウロコの重量または面積と ALP および TRAP 活性の関連は、ウロコの酵素活性を目的変数、ウロコの重量あるいは面積を説明変数とする回帰分析を行った。重量補正法と面積補正法との関連は、単位面積当たりの活性値 (改良法) を目的変数、単位重量当たりの活性値 (従来法) を説明変数とする回帰分析を行った。ウロコの面積と単位面積当たりの ALP および TRAP 活性との関連は、単位面積当たりの ALP および TRAP 活性を目的

変数、ウロコの面積を説明変数とする回帰分析を行った。危険率 5%未満を統計学的有意水準とした。

#### 2. 評価システムによる細胞毒性の検出

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は生細胞数を測定するキットである。テトラゾリウム塩 (WST-8) は発色基質であり細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、生細胞数を計測することができる。そこで WST-8 を呈色反応させるのに最も適切な時間を検討した。1 個体のキンギョを使用して右側面と左側面の対称部位の再生ウロコ (32 枚) を比較する 2 群で均等に振り分け、12, 24 及び 36 時間呈色反応を行い最適な反応時間を検討するため比較する 2 群を 3 条件分用意した。

その反応条件を用いて、試験物質 (17β-estradiol:E<sub>2</sub>, benzo[a]anthracene:BaA, 4-hydroxybenz[a]anthracene:4-OHBaA) に対する細胞毒性の影響を解析した。実験群にはエタノールに溶解させた各試験物質 (E<sub>2</sub>, BaA, 4-OHBaA) を L-15 培地に、エタノール含量 1% になるように溶解させ任意の濃度に希釈し、それを実験群の再生ウロコが投入してある各ウエルに 50 μL ずつ添加した。また対照群には試験物質無添加のエタノールを L-15 培地に、エタノール含量 1% になるように溶解させて、対照群再生ウロコが投入してある各ウエルに 50 μL ずつ添加した。それぞれ 15 °C のインキュベーターで任意の時間培養した。

#### 3. ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出

キンギョから再生 14 日目の再生ウロコ (regenerating scale) を採取して、ウロコからキアゲンのキットにより mRNA を抽出し、キアゲンのキットを用いて cDNA を合成した。その後、mRNA

の発現に対する影響を Suzuki et al. (2004) の方法に従い、解析した。同様の方法を用いて、無処理のウロコ (intact scale)、ウロコを再生させた側とは反対側のウロコ (ontogenic scale) とも比較した。

以下に本研究で用いたプライマーを示す。

ER $\alpha$ 5': TATGTACCTAAGGAGGAGC;

ER $\alpha$ 3': TGAGTCTCCACACTCTTCAG;

ER $\beta$ 5': TCAAGATTGCCACAGACTCC;

ER $\beta$ 3': TTGTGTGTCCATCCGGAGAG;

ER $\gamma$ 5': TTCTCTGGCAGGATGAGAAC;

ER $\gamma$ 3': GCCGAAGCTCAGACACATGTT

ER $\alpha$ 及びER $\gamma$ :用のプライマーは、Choi and Habibi (2003)、ER $\beta$ :用のプライマーは、Ma et al. (2000) による。

#### 4. エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析

キンギョをそれぞれ 12 個体使用して、E<sub>2</sub> を 10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L の濃度で処理して、骨芽細胞及び破骨細胞活性を測定した。

次に、酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性が検出された 4-OHBaA とその親物質である BaA に対する影響を解析した。

### C. 結果

#### 1. 再生ウロコを用いた評価システムの構築

##### 1-1. ウロコの重量と面積の関連

キンギョの各ウロコの重量と面積の関係を 144 枚 (2 個体) について調べた結果、各ウロコの重量と面積の間には、正の相関が見られた ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 7)。

##### 1-2. ウロコの重量または面積と骨芽細胞及び破骨細胞活性の関連

キンギョの片側のウロコの骨芽細胞 (24 枚) 及び破骨細胞 (24 枚) 活性 (mmol pNP produced

/ h) とそれぞれのウロコ重量 (mg) を測定し、同じ個体の対側の対称位置のウロコの骨芽細胞 (24 枚) および破骨細胞 (24 枚) 活性 (mmol pNP produced / h) とそれぞれのウロコ面積 (mm<sup>2</sup>) を 4 個体について測定した。そして、ウロコの重量と骨芽細胞または破骨細胞活性との関連と、ウロコの面積と骨芽細胞または破骨細胞活性との関連を調べた。その結果、ウロコ 1 枚の骨芽細胞総活性とウロコの重量の間には、正の相関が見られた ( $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 8A)。また、破骨細胞総活性とウロコの重さの間にも、正の相関 ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.001$ ) が見られた (Fig. 8B)。ウロコ 1 枚の骨芽細胞総活性とウロコの面積の間には、強い正の相関が見られた ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 8C)。また、破骨細胞総活性とウロコの面積の間にも、強い正の相関 ( $r = 0.78$ ,  $p < 0.001$ ) が見られた (Fig. 8D)。

##### 1-3. 重量補正法と面積補正法との関連

単位重量当たりの活性値 (従来法) と単位面積当たりの活性値 (改良法) との間の相関関係を骨芽細胞及び破骨細胞活性のそれぞれについて調べた。その結果、単位重量当たりの骨芽細胞活性値 (従来法) と単位面積当たりの骨芽細胞活性値 (改良法) との間には、弱い正の相関 ( $r = 0.38$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 9A) が見られた。また、単位重量当たりの破骨細胞活性値 (従来法) と単位面積当たりの破骨細胞活性値 (改良法) との間にも、正の相関 ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 9B) が見られた。

##### 1-4. ウロコの面積と単位面積当たりの骨芽細胞及び破骨細胞活性との関連

ウロコの面積で骨芽細胞または破骨細胞活性値 (mmol pNP produced / h) を除して算出した単位面積当たりの骨芽細胞または破骨細胞活性値 (mmol pNP produced / (mm<sup>2</sup> scale × h))

とウロコの面積 ( $\text{mm}^2$ ) との関連から、単位面積当たりの活性に変換した効果を調べた。その結果ウロコの骨芽細胞および破骨細胞活性を単位面積当たりの活性で表すと、ウロコの面積に関係なくほぼ一定の値となった (Fig. 10)。

## 2. 評価システムによる細胞毒性の検出

細胞毒性測定法の原理をFig. 11に示す。このキットを用いて、 $\text{E}_2$  ( $10^{-5}$ ~ $10^{-10}$  mol/L) で処理し、24時間培養後、細胞毒性の検出をおこなった。その結果、 $\text{E}_2$  は  $10^{-6}$  mol/L で 10% 程度、生細胞の減少が起きているものの、それより低い濃度ではほとんど影響は見られなかった (Fig. 12)。

4-OHBaA と BaA を  $10^{-5}$ ~ $10^{-10}$  mol/L の濃度で添加して 24 時間培養した。その後、細胞毒性を検出した。その結果、4-OHBaA と BaA とともに各濃度で細胞数の減少は確認されなかった (Figs. 13, 14)。さらに、4-OHBaA と BaA を  $10^{-5}$  mol/L の濃度でウロコに曝露し、3、24、72 時間培養した。その結果、4-OHBaA と BaA とともに各培養時間で細胞数の減少は確認されなかった (Figs. 15, 16)。

## 3. ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出

キングョから再生 14 日目の再生ウロコ (regenerating scale) において、エストロゲン受容体が検出された。そのサブタイプは、ベーターが最も多く発現しており、アルファータイプの発現量は少ないことが判明した (Fig. 17)。

一方、無処理のウロコ (intact scale)、ウロコを再生させた側とは反対側のウロコ (ontogenic scale) においても同様にエストロゲン受容体が検出され、再生ウロコと同様にベータタイプの発現量がアルファータイプよりも高いことが判明した (Fig. 17)。

## 4. エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析

$\text{E}_2$  を  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  mol/L の濃度で処理して、骨芽細胞 (48 枚) 及び破骨細胞 (48 枚) 活性を測定した。その結果、骨芽細胞は  $10^{-6}$  mol/L で活性が上昇し ( $p = 0.006$ )、それより低い濃度でも上昇傾向が見られた (Fig. 18A)。一方、破骨細胞は  $10^{-8}$ ~ $10^{-10}$  mol/L で活性が上昇したが ( $10^{-8}$  mol/L :  $p = 0.004$ ,  $10^{-9}$  mol/L :  $p = 0.003$ ,  $10^{-10}$  mol/L :  $p = 0.009$ )、 $10^{-6}$  mol/L で逆に低下するという結果になった ( $p = 0.036$ ) (Fig. 18B)。

4-OHBaA を  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  mol/L の濃度で曝露して、骨芽細胞 (48 枚) 及び破骨細胞 (48 枚) 活性を測定した。その結果、骨芽細胞は  $10^{-6}$  mol/L で有意に上昇したが ( $p = 0.003$ )、 $10^{-7}$  mol/L で対照群と同程度の値になり、濃度を下げると徐々に上昇し  $10^{-10}$  mol/L でまた有意に上昇した ( $p = 0.032$ ) (Fig. 19A)。一方、破骨細胞は  $10^{-10}$  mol/L で活性が上昇した ( $p = 0.022$ ) (Fig. 19B)。

BaAは6時間の培養では変化が認められなかったので、タイムコースをとり、その影響を評価した。すなわち、キングョをそれぞれ 12 個体使用して、再生ウロコに  $10^{-6}$  mol/L の BaA を曝露させ、3、6、12、24 時間培養して骨芽細胞 (48 枚) 及び破骨細胞 (48 枚) 活性を測定した。その結果、骨芽細胞活性は上昇傾向にあるものの有意な差は認められなかった (Fig. 20A)。また破骨細胞活性は 12 時間培養で上昇した ( $p = 0.008$ ) (Fig. 20B)。

## D. 考察

### 1. 再生ウロコを用いた評価システムの構築

従来ウロコの ALP および TRAP 活性をウロコの重量 (mg) 当たりの活性で表していた方法では、ウロコの乾燥と 1 枚 1 枚の秤量に多大な時間を要したことから、再生ウロコのように 1mg 未満の軽いウロコの秤量に困難さがあつた