

め、ウロコの ALP および TRAP 活性をウロコの面積 (mm²) 当たりの活性で表す方法を今回検討した。これまで 96 穴プレート 1 枚当たり約 2 時間程度かかっていたウロコ重量測定時間が、ウロコの乾燥を待つことなく約 5 分程度の面積測定時間に短縮された。また、ウロコ面積は、画像処理ソフトによる自動測定なので、誰が何度やっても同じ値となり、正確度と再現性が著しく向上した。さらに、これまで困難であった 1mg 未満の小さなウロコの測定も 1 枚ごとに容易に測定できるようになった。

ウロコの重量と TRAP 総活性値の間には相関があったが、ウロコの重量と ALP 総活性値の間には相関はなかった。一方、ウロコの面積と ALP および TRAP 総活性値の間には相関があった。これは、ウロコの破骨細胞や骨芽細胞が、ウロコの中に 3 次元的に分布しているのではなく、ウロコ上に 2 次元的に分布している(Azuma, *et al.* 2007) ことや、ウロコの重量は、石灰化の割合により大きく変化し、必ずしもウロコサイズと一致しないことも影響したと考えられる。したがって、ウロコの ALP および TRAP 活性のウロコサイズによる影響をなくすには、単位面積あたりの酵素活性表示が適するものと思われる。

ALP および TRAP 活性の重量補正法 (従来法) と面積補正法 (改良法) との間には、相関関係が見られた (Fig. 9)。したがって、今後ウロコの ALP および TRAP 活性を単位面積当たりによる面積補正法で表しても従来法で測定した値との間に十分な互換性が期待できる。また、ALP および TRAP 活性を単位面積当たりによる面積補正法で表すと、ALP および TRAP 活性は、ウロコのサイズによる影響がないことが明らかになった (Fig. 10)。

2. 評価システムによる細胞毒性の検出

骨芽細胞活性及び破骨細胞活性同様に、単位面積当たりに換算することでホルマザン産生量比 (生細胞比 %) を算出することができた。

酵母では 10⁻⁵ mol/L で 4-OHBaA と BaA とともに細胞死が起きており、また 4-OHBaA の方が BaA より強く毒性が現れていたが (早川未発表データ)、今回のウロコの細胞では 4-OHBaA と BaA に対してはともに細胞毒性は認められなかった。したがって魚の場合、PAH 及び OHPAH は毒性が低い可能性がある。

3. ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出

ウロコにおいて、エストロゲン受容体が検出され、ノーマルの intact のウロコにおいても、再生過程の再生ウロコにおいても、ウロコを再生させている側とは反対側のウロコ (ontogenic scale) においても、ベータタイプがメインで発現していることが判明した。一方、アルファタイプの発現は非常に低く、アルファタイプがメインのヒトとは異なっていることがわかった。

4. エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析

前記したように、ウロコの骨芽細胞と破骨細胞とは ER が発現しており、E₂ 処理をすると、哺乳類では骨芽細胞が活性化し、破骨細胞が抑制されるが、魚類では骨芽細胞と破骨細胞どちらも活性化することが知られている (Yoshikubo *et al.*, 2005)。10⁻⁶ mol/L の濃度で E₂ 処理すると骨芽細胞活性は 6 時間後に上昇し、破骨細胞は 10⁻⁸~10⁻¹⁰ mol/L で活性が上昇した。

魚類は産卵のときに脊椎骨ではなくウロコからカルシウムを供給し、卵に含まれる含カルシウムタンパク質であるビテロジェニンを生成する。その際にウロコの破骨細胞が活発に働

き、骨吸収反応がおこる。また魚類の E₂ を含むステロイドホルモンの体内濃度は 10⁻⁸~10⁻⁹ mol/L であり (Kobayashi *et al.*, 1986)、体内の E₂ 濃度に近い状態だと破骨細胞の方が骨芽細胞よりも活発に働いていると考えられる。

酵母 two-hybrid 分析法でエストロゲンアゴニスト活性のある 4-OHBaA は 6 時間で骨芽細胞、破骨細胞ともに活性が上昇した。つまり E₂ と同じ時間に同じ方向に作用した。これは 4-OHBaA が ER を介して骨芽細胞及び破骨細胞活性に影響を及ぼしている可能性が高い。今後、様々な物質の作用を解析していく予定である。

10⁻⁶ mol/L の 4-OHBaA は 6 時間で骨芽細胞及び破骨細胞活性が最大に上昇するのに対し、10⁻⁶ mol/L の BaA を曝露させるとそれより遅れて 12 時間で破骨細胞の活性が上昇した。また予備的な実験により、ウロコには CYP1A1 が発現していることがわかった。またヒトの CYP1A1 で BaA 代謝させてモノヒドロキシ体の割合を測定すると 90 % が 4-OHBaA であるというデータがある (早川 未発表データ)。またヒトの尿中代謝物では 3-OHBaA が主代謝物であるという報告もある (Gündel *et al.*, 1999)。4-OHBaA も 3-OHBaA も酵母 two-hybrid 分析法ではともにエストロゲンアゴニスト活性を示している。つまりウロコの CYP1A1 で BaA が代謝されて 4-OHBaA や 3-OHBaA が生成したため、4-OHBaA の活性上昇 (6 時間) より遅れて 12 時間後に破骨細胞活性が上昇してきた可能性が高い。今後、培地中の成分分析を行い、ウロコにおいて、BaA から 4-OHBaA への変換が行われているかを調べていく予定である。

E. 結論

1. 再生ウロコを用いた単位面積あたりの骨芽細胞及び破骨細胞活性測定法の開発により、測定感度及び精度共に向上させることがで

きた。

2. ウロコのバイオアッセイでは、骨芽細胞及び破骨細胞の活性だけではなく、細胞毒性も評価でき、少なくとも今回用いた化合物の作用は細胞毒性ではなく、内分泌かく乱作用であることが判明した。
3. ウロコにおいてもエストロゲン受容体が発現しており、ベータタイプがメインであることが判明した。
4. 酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示した 4-OHBaA はウロコにおいてもエストロゲン様活性が認められ、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を上昇させることが判明した。

F. 引用文献

1. Arcaro K. F., O'Keefe P. W., Yang Y., Clayton W., Gierthy J. F., Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells, *Toxicology*, 133, 115-127 (1999).
2. Azuma K., Kobayashi M., Nakamura M., Suzuki N., Yashima S., Iwamuro S., Ikegame M., Yamamoto T., Hattori A., Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362, 594-600 (2007).
3. Bue B.G., Sharr S, Seeb J.E., Evidence of damage to pink salmon populations inhabiting Prince William Sound, Alaska, two generations after the Exxon Valdez oil spill, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 127, 35-43 (1998).
4. Cerver L.A., Hogenesch J.B., Beadfield C.A., Tissue specific expression of the rat β -receptor and ARNT mRNAs, *Nucleic. Acid. Res.*, 22(15), 3038-3044 (1994).
5. Charles G.D., Bartels M.J., Zacharewski T.R., Gollapudi B.B., Freshour N.L.,Carney, E.W., Activity of benzo[a]pyrene and its

- hydroxylated metabolites in an estrogen receptor- α reporter gene assay, *Toxicol. Sci.*, 55, 320–326 (2000).
6. Choi, C.Y., Habibi, H.R., Molecular cloning of estrogen receptor α and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 204, 169–177 (2003).
 7. Clemons J. H., Allen L. M., Marvin C. H., Wu Z., McCarry B. E., Bryant D. W., Zacharewski T. R., Evidence of estrogen- and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM-10 air particulate material using in vitro gene expression assays, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1853–1860 (1998).
 8. Gündel, J., Angerer, J., Mannschreck, C., Monohydroxylated PAH metabolites as biomarkers for occupational PAH exposure, *Polycycl. Aromat. Compd.*, 17, 1–145 (1999).
 9. Hankinson O., The aryl hydrocarbon receptor complex, *Annu. Rev. Pharmacol.*, 35, 307–40 (1995).
 10. Hayakawa K., Nomura M., Nakagawa T., Oguri S., Kawanishi T., Toriba A., Kizu R., Sakaguchi T., Tamiya E., Damage to and recovery of coastlines polluted with C-heavy oil spilled from the Nakhodka, *Water Res.*, 40, 981–989 (2006).
 11. Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Chung S.W., Kizu R., Toriba A., Kameda T., Tang N., Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeast two-hybrid assay, *J. Health Sci.*, 53, 562–570 (2007).
 12. Heintz R.A., Rice S.D., Wertheimer A.C., Bradshaw R.F., Thrower F.P., Joyce J.E., Short J.W., Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 208, 205–216 (2000).
 13. Hirose, T., Morito, K., Kizu, R., Toriba, A., Hayakawa, K., Ogawa, S., Muramatsu, M., Masamune, Y., Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives, *J. Health Sci.*, 47, 552–558 (2001).
 14. Jaruchotikamol, A., Jarukamjorn K., Sirisangtrakul W., Sakuma T., Kawasaki, Y., Nemoto N., Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 224, 156–162 (2007).
 15. Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Mizokami, A., Burnstein, K.L., Klinge, C.M., Hayakawa, K., Antiandrogenic activities of diesel exhaust particle extracts in PC3/AR human prostate carcinoma cells, *Toxicol. Sci.*, 76, 299–309 (2003).
 16. Kobayashi M., Aida K., Hanyu I., Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1152–1158 (1986).
 17. Li D., Daler D., Ocean pollution from land-based sources: East China Sea, China, *Ambio*, 33, 107–113 (2004).
 18. Lima A.L.C., Eglinton T.I., Reddy C.M., High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 53–61 (2003).
 19. Liu, Y., Zhu, L., Shen, X., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 840–844 (2001).
 20. Ma, C.H., Dong, K.W., Yu, K.L., cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor β -subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1490,

- 145–152 (2000)
21. Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., Klinge, C.M., Hayakawa, K., Antiestrogenic activity of extracts of diesel exhaust particulate matter in MCF-7 human breast carcinoma cells, *Polycycl. Aromat. Compd.*, **22**, 747-759 (2002).
 22. Peterson, C.H., Rice S.D., Short J.W., Esler D., Bodkin J.L., Ballachey B.E., Irons D.B., Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill, *Science*, **302**, 2082–2086 (2003).
 23. Smith, C.J., Hansch, C., The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate, *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 637-646 (2001).
 24. Suzuki, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Kambegawa, A., Hattori, A., Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals on bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* **22**, 439-446 (2004)
 25. Suzuki, N., Kitamura, K., Omori, K., Nemoto, T., Satoh, Y., Tabata, M.J., Ikegame, M., Yamamoto, T., Ijiri, K., Furusawa, Y., Kondo, T., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Wada, S., Shimizu, N., Sasayama, Y., Endo, M., Takeuchi, T., Nara, M., Somei, M., Maruyama, Y., Hayakawa, K., Shimazu, T., Shigeto, Y., Yano, S. and Hattori, A.: Response of osteoblasts and osteoclasts in regenerating scales to gravity loading. *Biol. Sci. Space*, **23**, 211-217 (2009)
 26. Tran D. Q., Ide C. F., McLachlan J. A., Arnold S. F., The antiestrogenic activity of selected polynuclear aromatic hydrocarbons in yeast expressing human estrogen receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 102-108 (1996).
 27. Utsumi, A., Nakashima, A., Ando, K., Kizu, R., Hayakawa, K., Flow injection analysis of C-fuel oil-contaminated samples based on the fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Sci.*, **14**, 845-847 (1998).
 28. Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J., Hattori, A., Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis, *Life Sci.*, **76**: 2699-2709 (2005).
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, **135**, 231-241 (2010).
 - 2) 北村敬一郎, 中野 淳, 川部季美, 早川和二, 根本 鉄, 大嶋雄治, 島崎洋平, 服部 淳彦, 鈴木信雄, 自動面積測定法によるキンギョのウロコを骨のモデルとしたアッセイ法の改良, *日本海域研究*, **42**, 27-34 (2011).
 - 3) Suzuki, N., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Omori, K., Takada, K., Tabata, J.M., Kitamura, K., Endo, M., Wada, S., Srivastav, A.K., Chowdhury, V.S., Oshima, Y., Hattori, A., Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales in vitro. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **56**, 47-51 (2011).
 - 4) Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Sasayama, Y., Hattori, A., Ikegame, M., Nakamura, M., Tabata, M.J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav,

- A.K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Martin T.J., Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, **48**, 1186-1193 (2011).
- 5) Satone, H., Lee, J.M., Oba, Y., Kusakabe, T., Akahoshi, E., Miki, S., Suzuki, N., Sasayama, Y., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S., Honjo, T., Oshima, Y., Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. *Aquatic Toxicol.*, **103**, 79-84 (2011).
2. 学会発表
- 1) 鈴木信雄, 中野 淳, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一郎, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦, 笹山雄一, 鳥羽 陽, 早川和一, 重油に含まれる多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用, 平成 22 年度日本動物学会中部支部大会, 2010. 7. 24-25, 愛知.
- 2) Kawabe, K., Suzuki, N., Hayakawa, K., Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish bone metabolism. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", 2010. 9. 2, Busan, Korea.
- 3) Nakano, J., Suzuki, N., Hayakawa, K., Development of the high sensitive bioassay system for analysis of bone metabolism using the regenerating scales. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", 2010. 9. 2, Busan, Korea.
- 4) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一郎, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦, 笹山雄一, 早川和一, 水酸化した多環芳香族水素類 (4-hydroxybenz[a]anthracene) の魚の骨代謝に対する作用, フォーラム 2010 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
- 5) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一, 再生ウロコの振動分光学研究, 平成 22 年度日本分光学会年次講演会, 2010. 11. 18-20, 京都.
- 6) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 鳥羽 陽, 早川和一, 多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用, 平成 22 年度日本薬学会北陸支部第 122 回例会, 2010. 11. 21, 石川.
- 7) 谷内口孝治, 鈴木信雄, 早川和一, 無機水銀は魚のウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性を抑制する, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011. 3. 18-20, 札幌.
- 8) 川部季美, 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 多環芳香族炭化水素類がキンギョの再生ウロコに及ぼす影響の *in vivo* 解析, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.

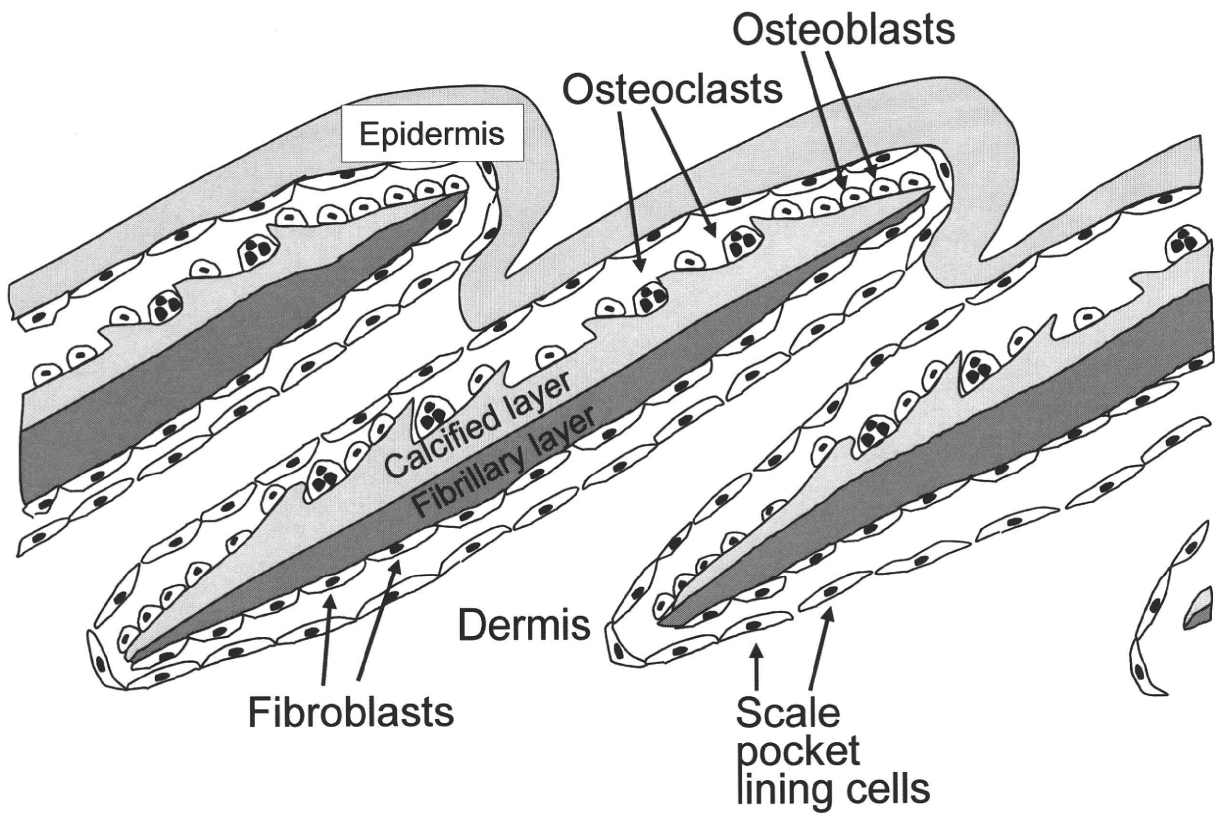


Fig. 1 Schema of a transverse section of teleost skin with scales. The teleost scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix and is similar to that found in mammalian membrane bone.

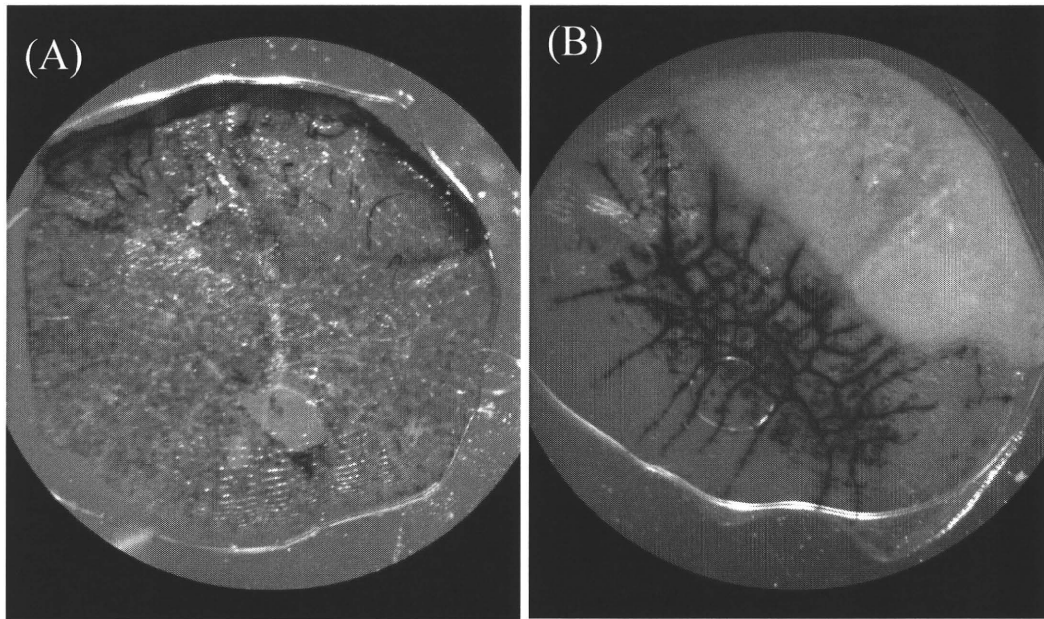


Fig. 2 (A) ALP staining and (B) TRAP staining in the regenerating scales of goldfish. (ALP : Alkaline phosphatase, TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase).

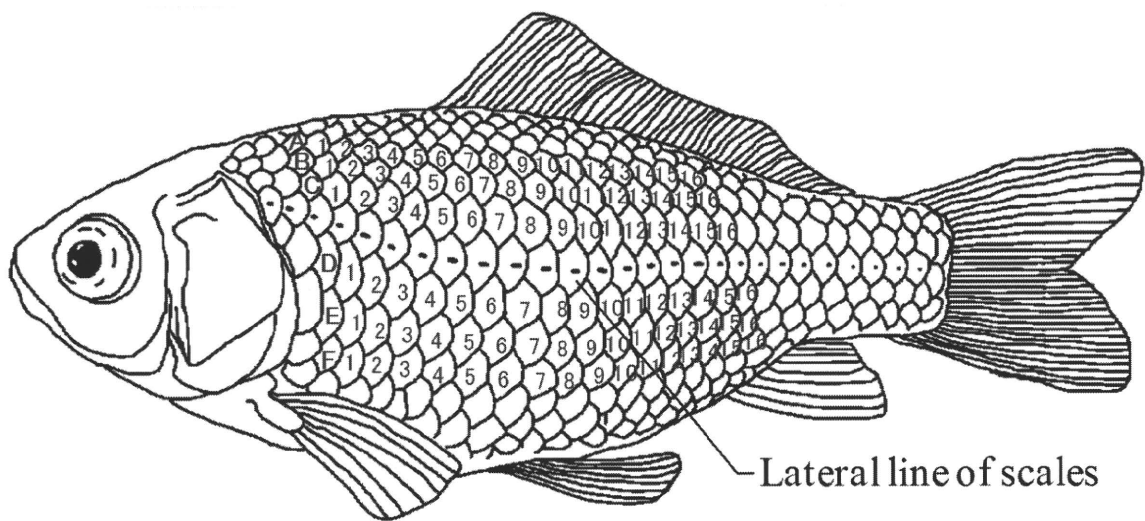


Fig. 3 Positions of scales used in this study.

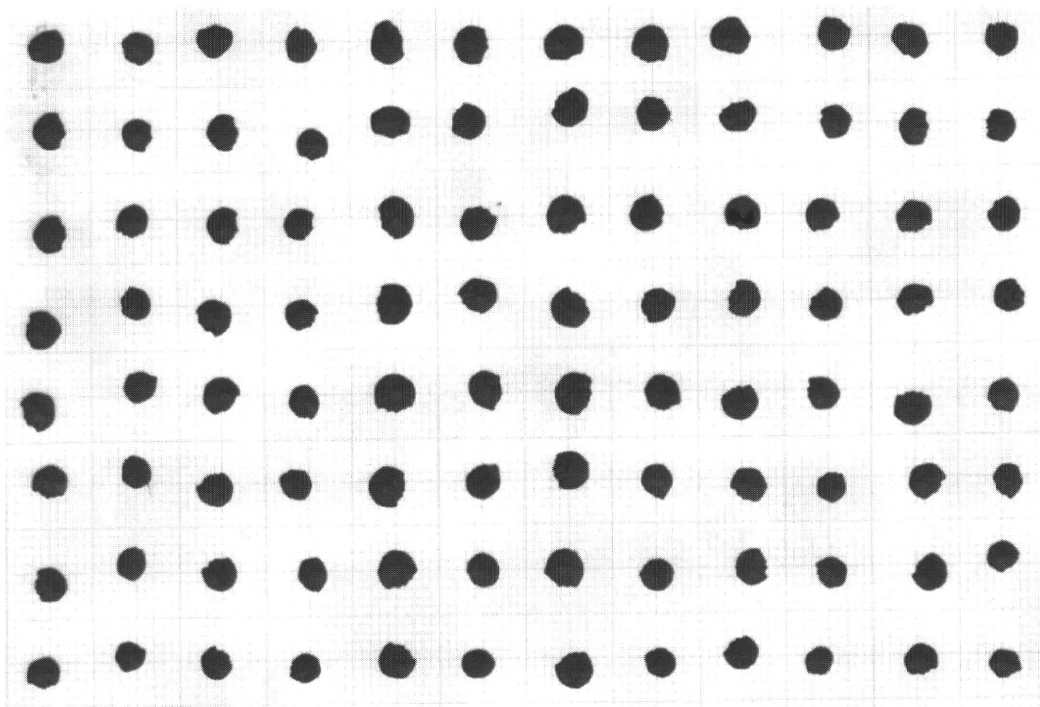


Fig. 4 A representative stained-scale image captured by an image scanner.

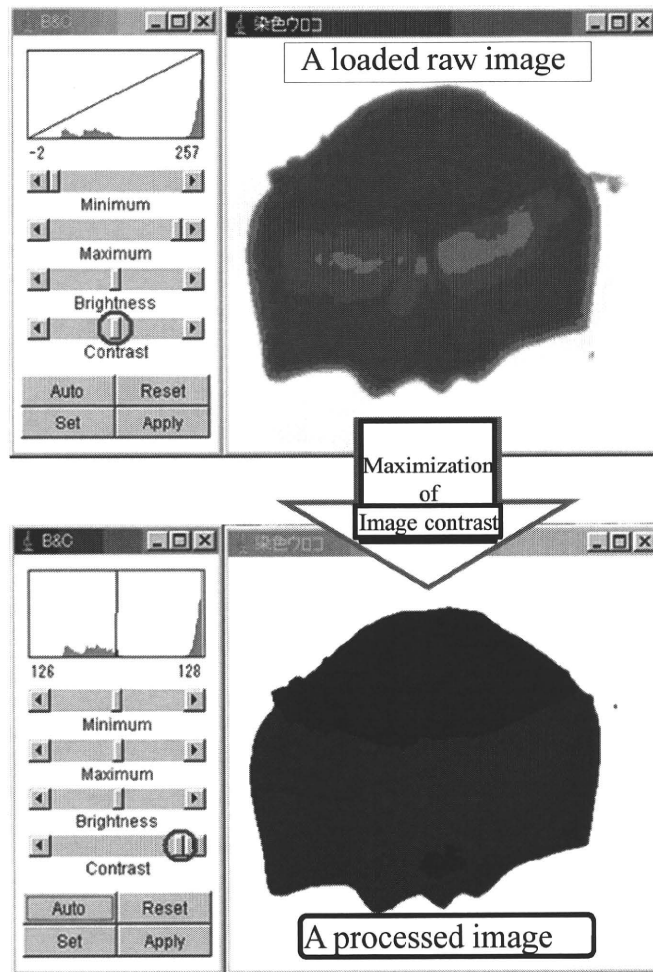


Fig. 5 Maximization of image contrast.

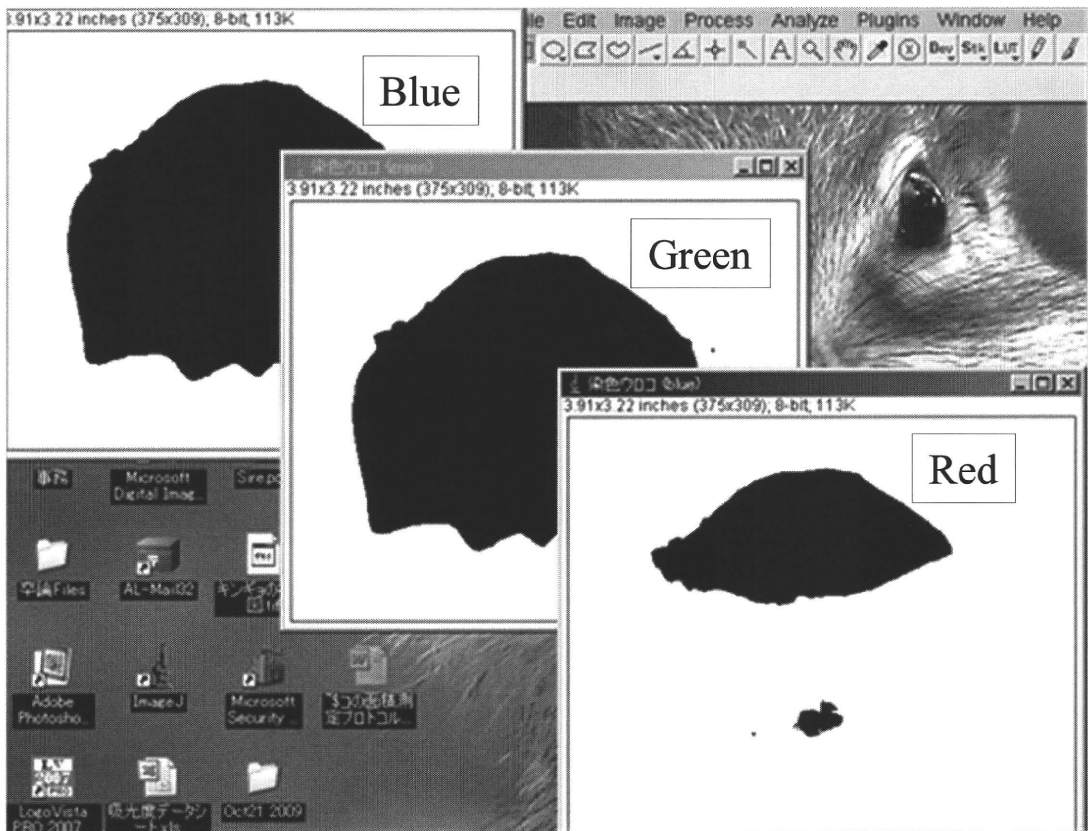


Fig. 6 Image binarization.

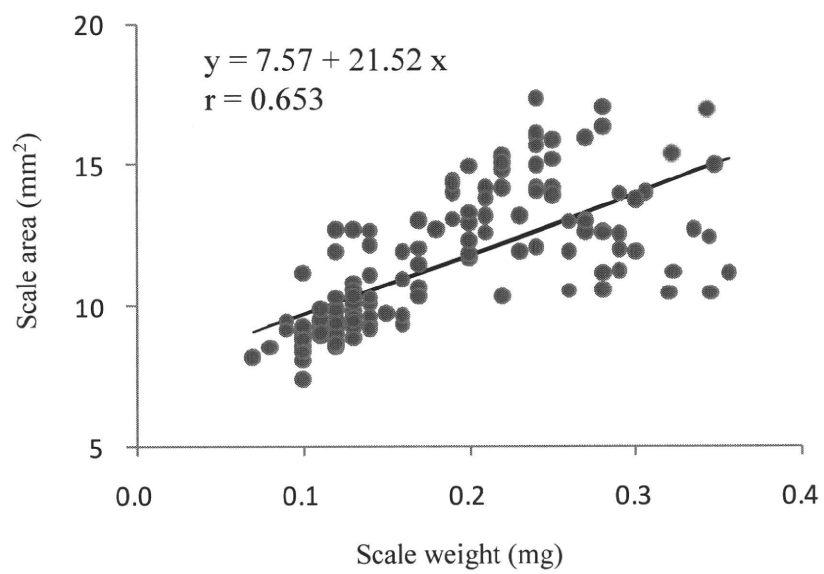


Fig. 7 Correlation analysis between scale weight (mg) and scale area (mm²).

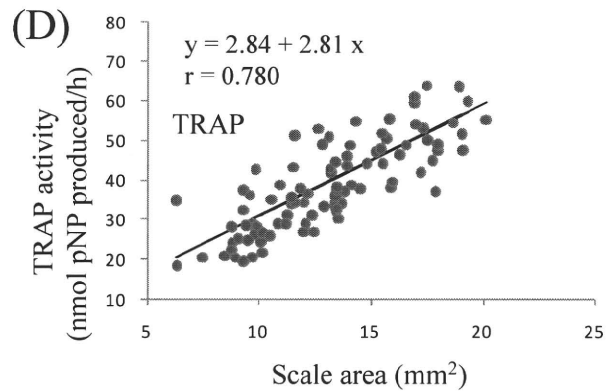
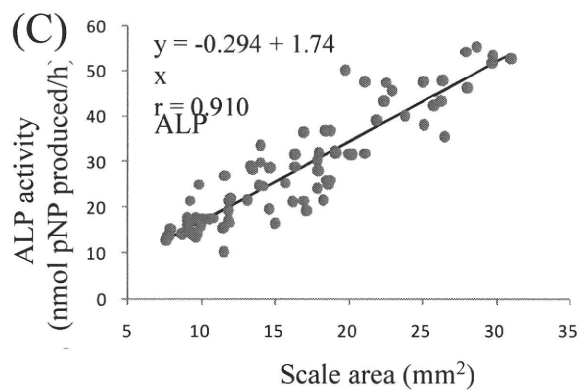
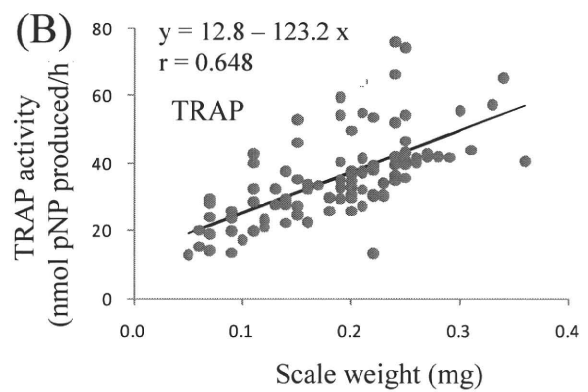
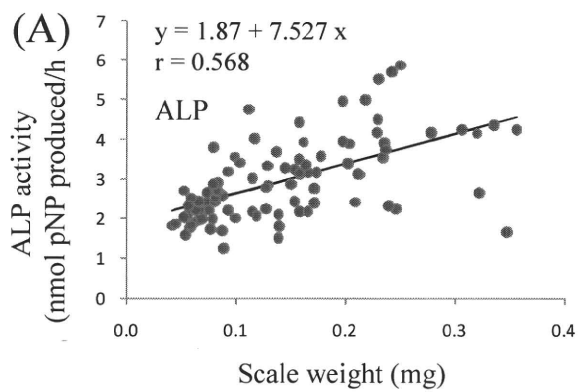


Fig. 8 Correlation analyses (A : scale weight vs ALP activity; B : scale weight vs TRAP activity; C : scale area vs ALP activity; D : scale area vs TRAP activity).

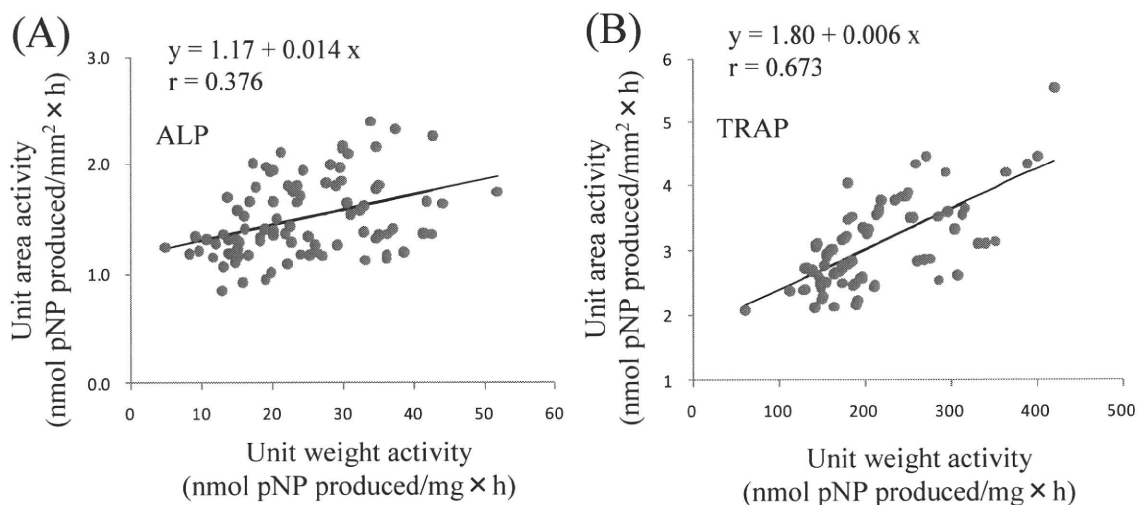


Fig. 9 Correlation analysis between weight-correction method and area-correction method. (A) shows correlation between unit weight ALP activity (conventional method) and unit area ALP activity (improved method). (B) shows correlation between unit weight TRAP activity (conventional method) and unit area TRAP activity (improved method).

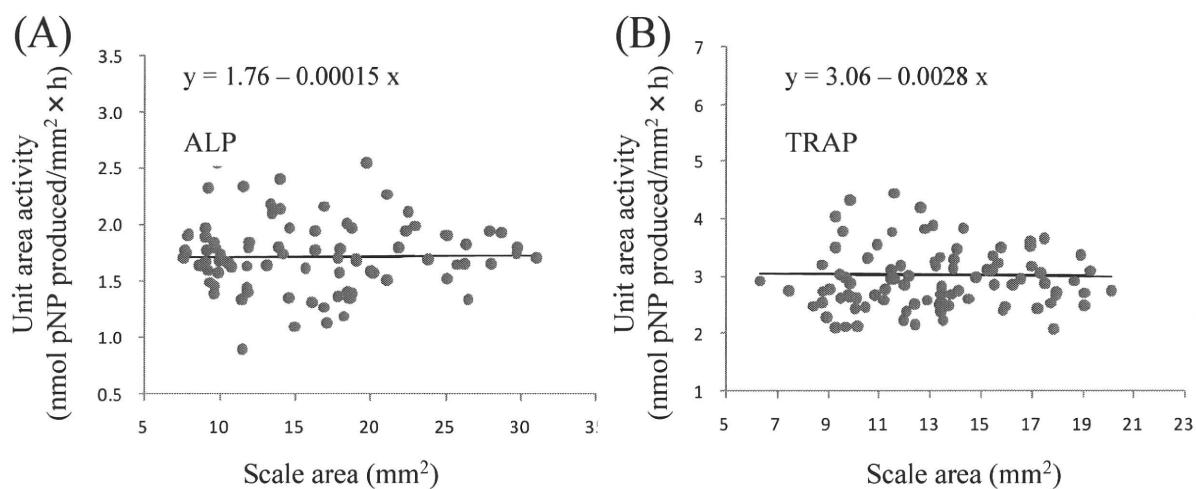


Fig. 10 Relationship between scale area and enzyme activity.
 (A) shows relationship between scale area and unit area ALP activity.
 (B) shows relationship between scale area and unit area TRAP activity.

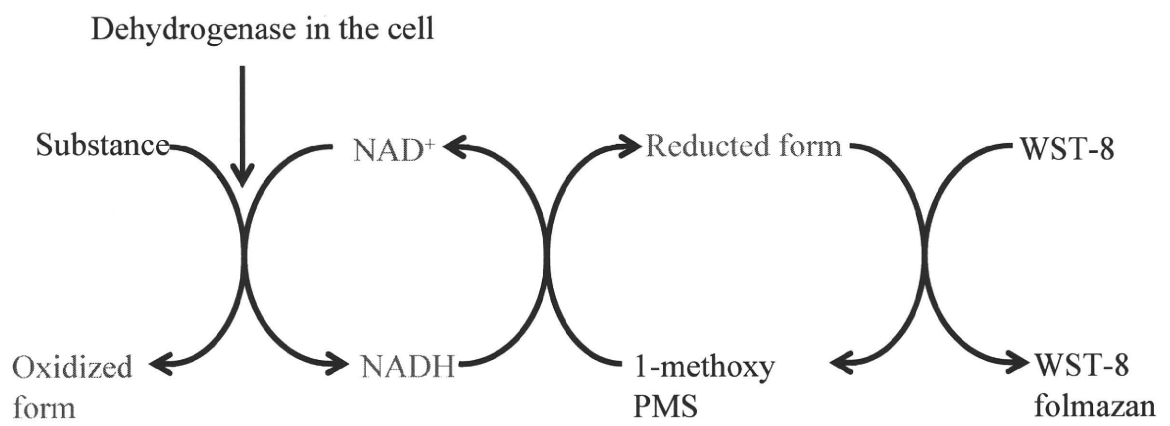


Fig. 11 Process of the reaction of CCK-8 (CCK-8 : Cell Counting Kit-8).

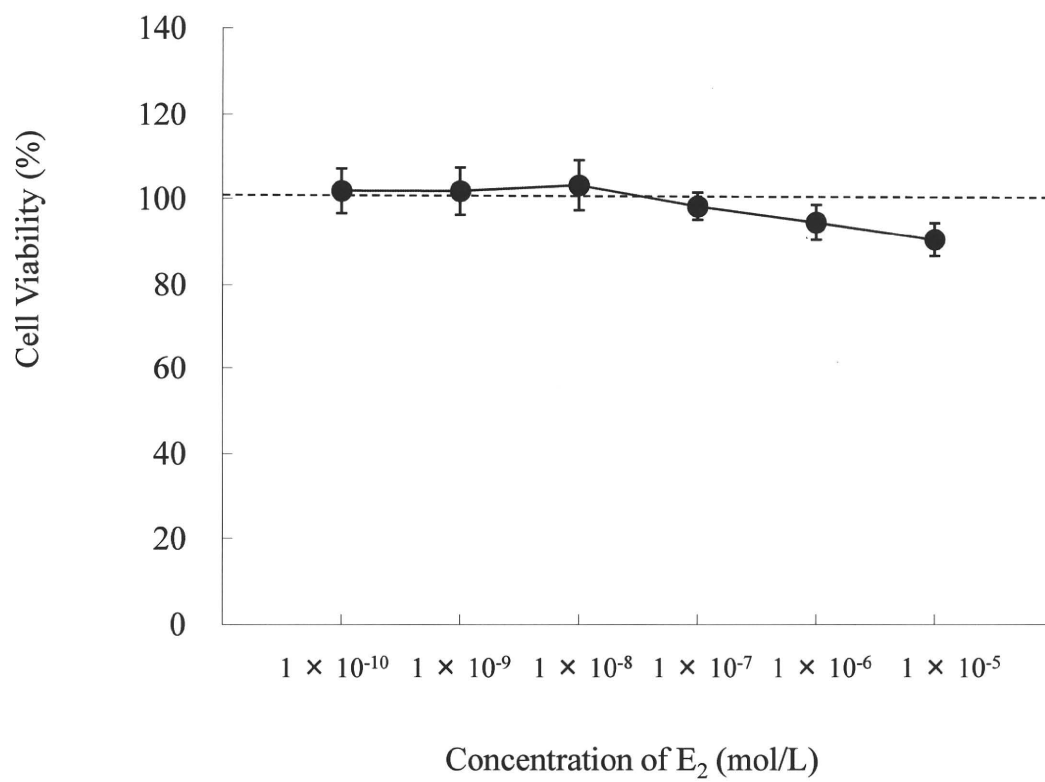


Fig. 12 Ratio of living cells by E₂ treatment.

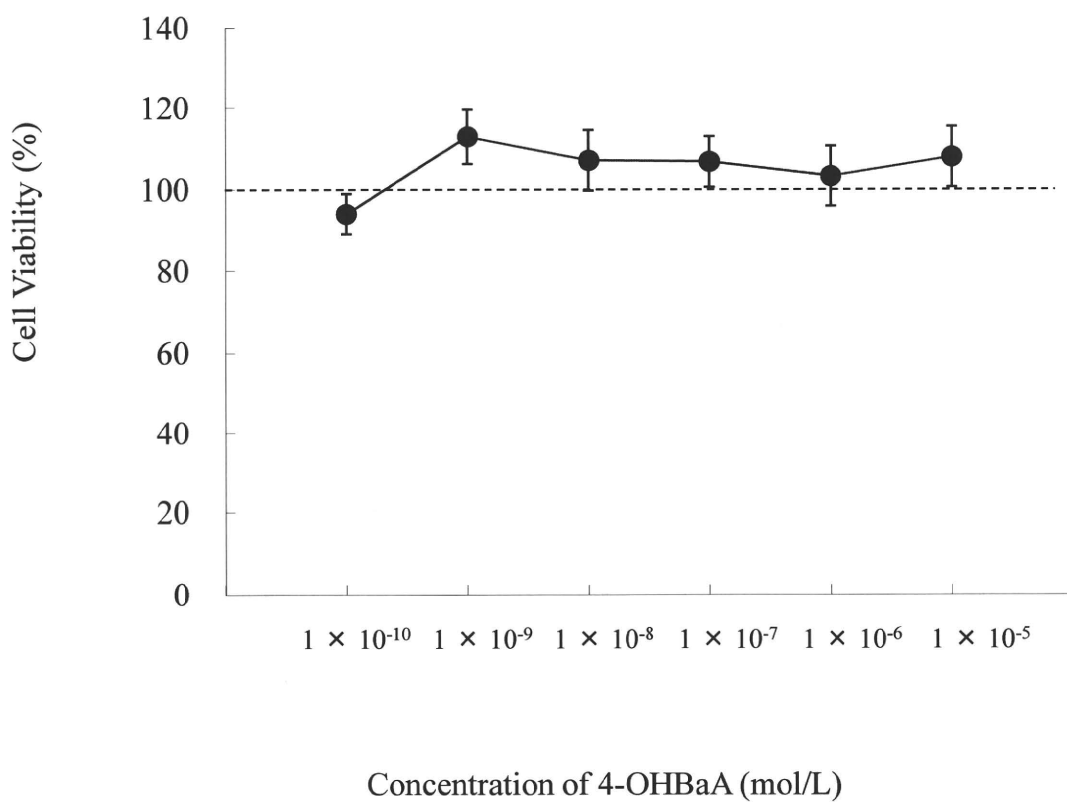


Fig. 13 Ratio of living cells by 4-OHBaA treatment.

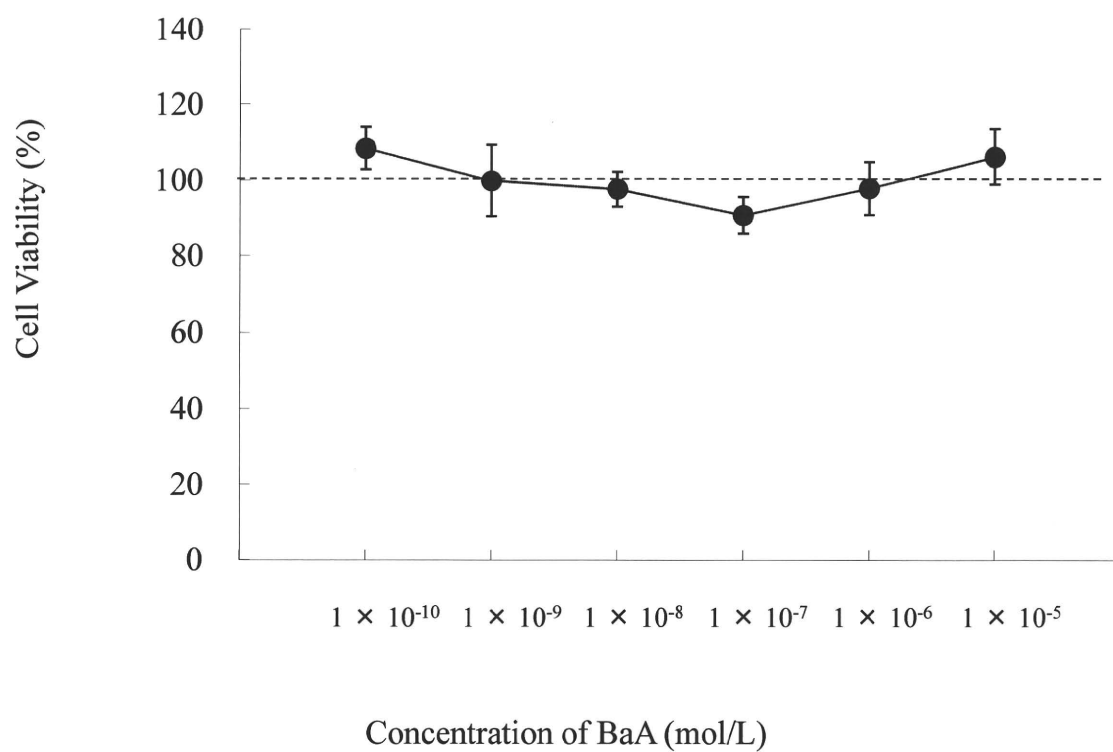


Fig. 14 Ratio of living cells by BaA treatment.

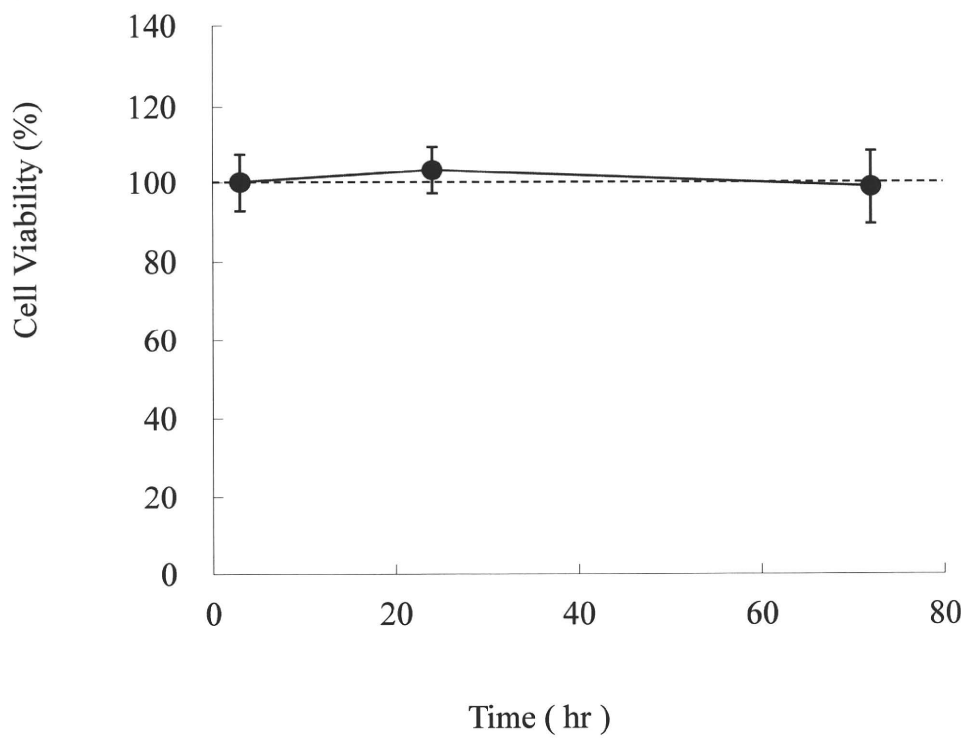


Fig. 15 Ratio of living cells by 4-OHBaA treatment.