

9.766 eV の広い範囲に存在したため、これらの範囲は PAHQ 全体の部分電荷の範囲とほとんど変わらなかった。

4. 双極子モーメントと結合親和性との関係

述べたように、ER のリガンドである E2 の分子内には水酸基の寄与による電子密度の偏りが存在する。フェノール性水酸基の酸素原子は電気陰性度が大きく、そのため酸素原子に負の電荷が偏ることが予想される。従って、分子内の電子密度の偏りが活性及び結合親和性に及ぼす影響を検討する一つの指標として、双極子モーメントとの関係性を評価し、その結果を Fig. 7 に示した。結合親和性を示した PAHQ では、1.085~5.556 debye の広い範囲に存在し、活性発現の要因は得られなかった。

5. 分子の疎水性 (log P) と結合親和性との関係

これまでに、hER α に対する結合親和性とフェノール類の疎水性 (log P 値; 水/オクタノール分配係数) との間にある一定範囲内において比例関係の成立が報告されている (Fang *et al.*, 2001)。従って、PAHQ も同様の傾向を示す可能性が考えられたため、各化合物の log P 値と活性の強さとの関係性を評価した (Fig. 8)。結合親和性を示した PAHQ の log P 値は 1.457~3.782 の広い範囲に存在しており、明確な活性発現要因は得られなかった。

6. ER に対する PAHQ の結合活性の酵母 two-hybrid アッセイ法と受容体結合試験法の比較

抗エストロゲン活性を評価できなかった 9,10-PQ、BcP-1,4-Q、1,4-AQ の 3 種を除いた 17 種の PAHQ のうち、酵母 two-hybrid アッセイ法と受容体結合試験法のいずれかで活性または

結合親和性を有し、さらに、受容体結合試験法によって得られた結合親和性の RBA 値が 0.4 以上と限定すると、共通する PAHQ は 1,2-CQ、1,4-CQ、BaP-7,8-Q、BaP-7、10-Q の 4 種であった。この 4 種の PAHQ は四環性の chrysenequinone (CQ) 骨格を共通構造として持ち、さらに 2 つのケトン基が末端の環に存在するという構造的特徴を持つ。つまり、CQ であれば 1, 2, 3, 4 位、BaP であれば 7, 8, 9, 10 位のいずれか 2 つにケトン基が存在している。一方、ER のリガンドである E₂ の構造は四環性構造を持ち、官能基は両末端の A 環および D 環に存在する。このことから、1) CQ 型四環性構造を共通構造とする、2) 官能基を持つ環は末端に存在する、という 2 つの構造的特徴があることがわかった (Fig. 9)。

また、chrysene (Chr) 骨格を持つ 3 種の PAHQ と BaP 骨格を持つ 6 種の PAHQ を同じ母核構造の PAHQ 同士で比較したところ、酵母 two-hybrid アッセイ法においても受容体結合試験法においてもそれぞれ *o*-PAHQ である 1,2-CQ、BaP-7,8-Q が最も強い活性を示した。理由として、この 2 つの PAHQ が Fig. 10 の様な結合様式をとることが考えられる。2 つのケトン基がオルト位に存在することで Arg 394 と水分子の水素原子に対して 1 つのケトン基が作用するよりも 2 倍の相互作用で水素結合を作ることができ、同じ母核構造を持つほかの PAHQ よりも活性及び結合親和性が強くなることが推定される。

E. 結論

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。受容体結合試験法で、多環芳香族炭化水素の水酸化体 (OHPAH) 以外の酸化体で結合親和性が見られたキノン体 (PAHQ) についても同様に構造活性相関の

有無を検討したところ、強い結合親和性を示した PAHQ では、O-H distance、第一イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P でそれぞれ 7.434~ 11.519 Å、8.526 ~ 9.766 eV、1.085 ~ 5.556 debye、1.457 ~ 3.782 の幾分広い範囲に存在した。さらに、受容体結合試験法によって得られた結合親和性の RBA 値が 0.4 以上と限定すると、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という構造的特徴をもつことが分かった。また、その構造は E₂ 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 E₂ and PAHQ

Compound	L/B ratio	O-H distance (Å)
E ₂	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

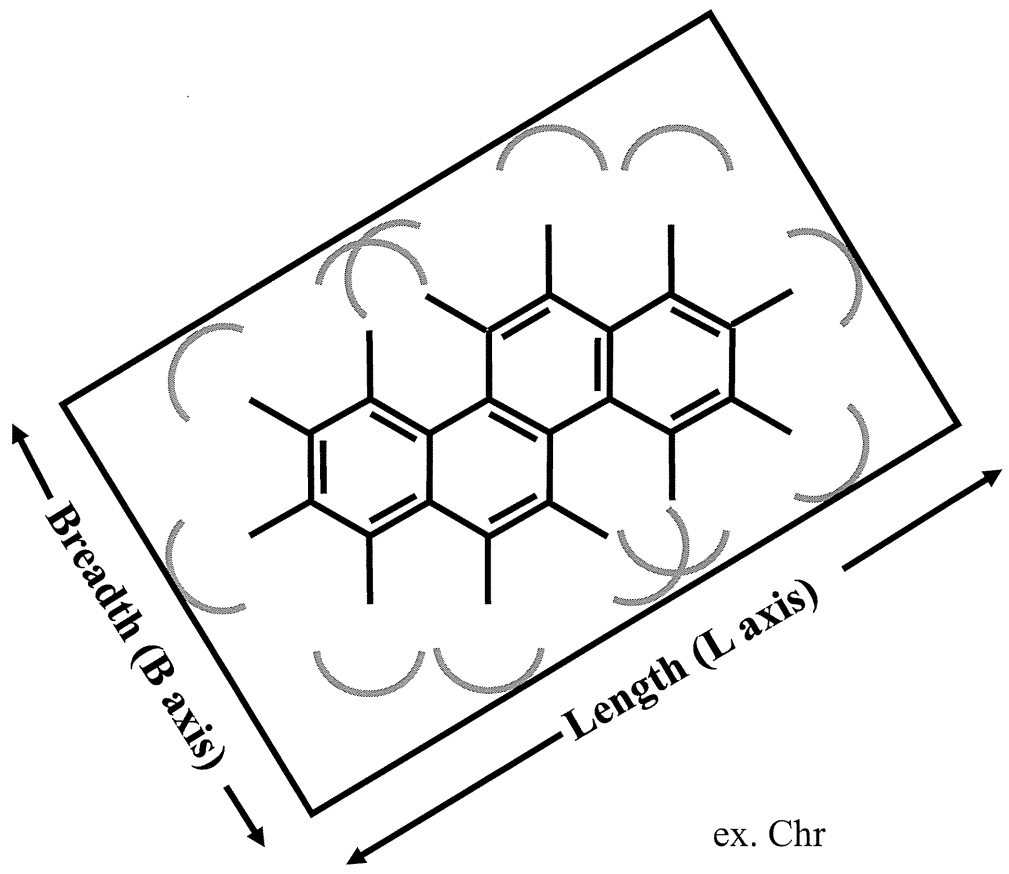


Fig. 1 Length-to-breadth ratio (L/B) of planar PAHs

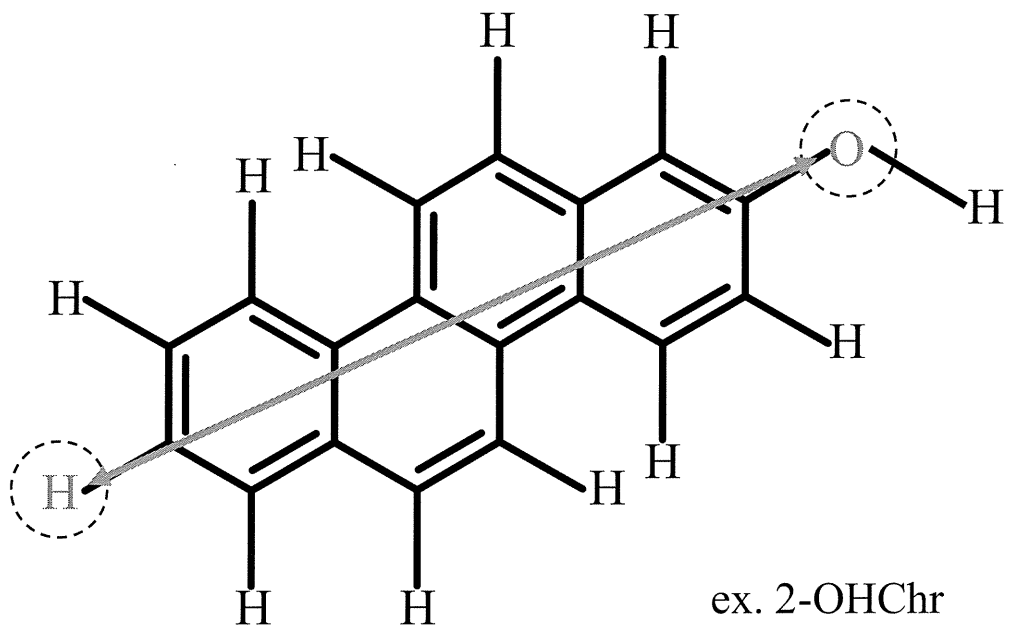


Fig. 2 Farthest distance between oxygen of hydroxygroup and hydrogen (O-H distance)

Table 2 Physicochemical properties of E₂ and PAHQ

	Partial charge	Ionization potential (eV)	Dipole moment (debye)	Log P
E ₂	-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

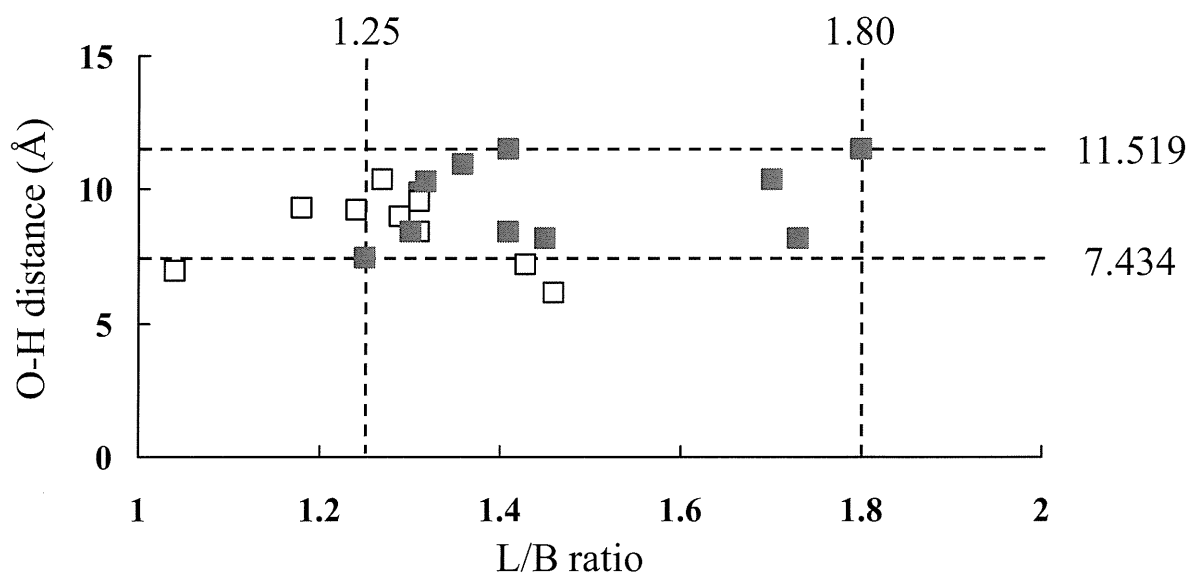


Fig. 3 Relationship between L/B ratio, O-H distance and binding affinity

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

Compound	induction (%)	Inhibition (%)	Binding affinity(%)
1,2-NQ	n	n	94.4
AcQ	n	n	10.5
1,4-AQ	n	—	71.5
9,10-AQ	n	n	14.2
1,4-PQ	n	37	78.1
9,10-PQ	n	—	0.5
Frt-2,3-Q	n	n	37.2
1,2-BAQ	n	n	13.0
1,2-CQ	25	59	93.2
1,4-CQ	n	50	103.4
5,6-CQ	n	50	81.1
BcP-1,4-Q	—	—	106.5
BcP-5,6-Q	n	44	32.8
BeP-4,5-Q	n	30	11.2
BaP-1,6-Q	n	40	56.2
BaP-3,6-Q	48	n	83.8
BaP-4,5-Q	n	47	21.3
BaP-7,8-Q	12	56	95.9
BaP-7,10-Q	n	24	85.4
BaP-11,12-Q	n	43	78.1

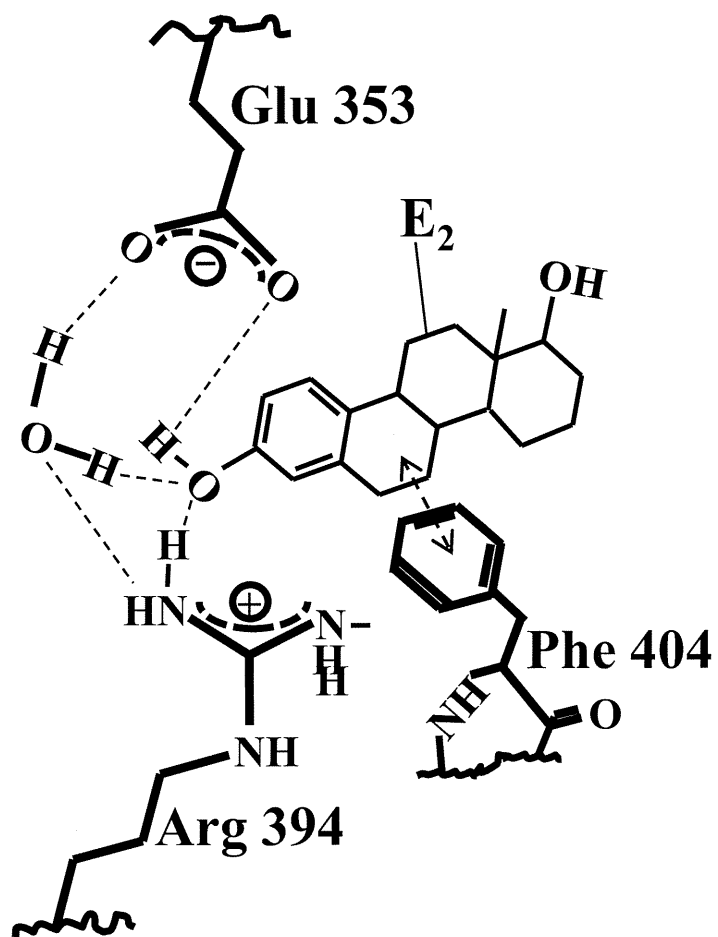


Fig. 4 Speculation of ER- E2 binding mode

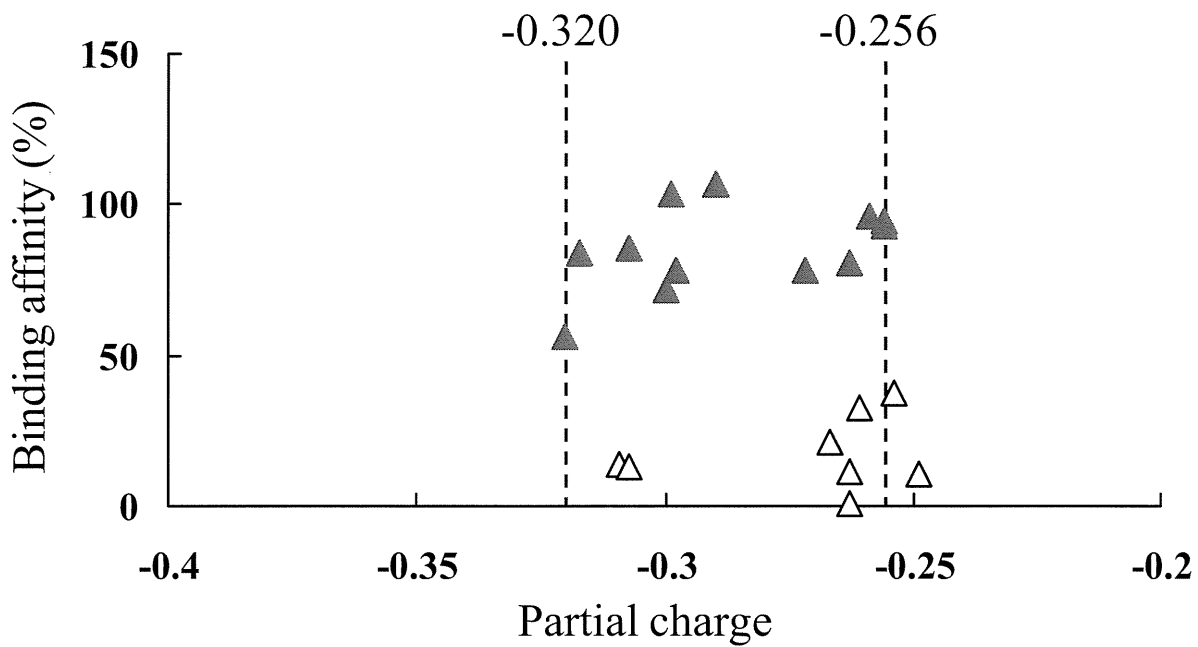


Fig. 5 Partial charge vs binding affinity

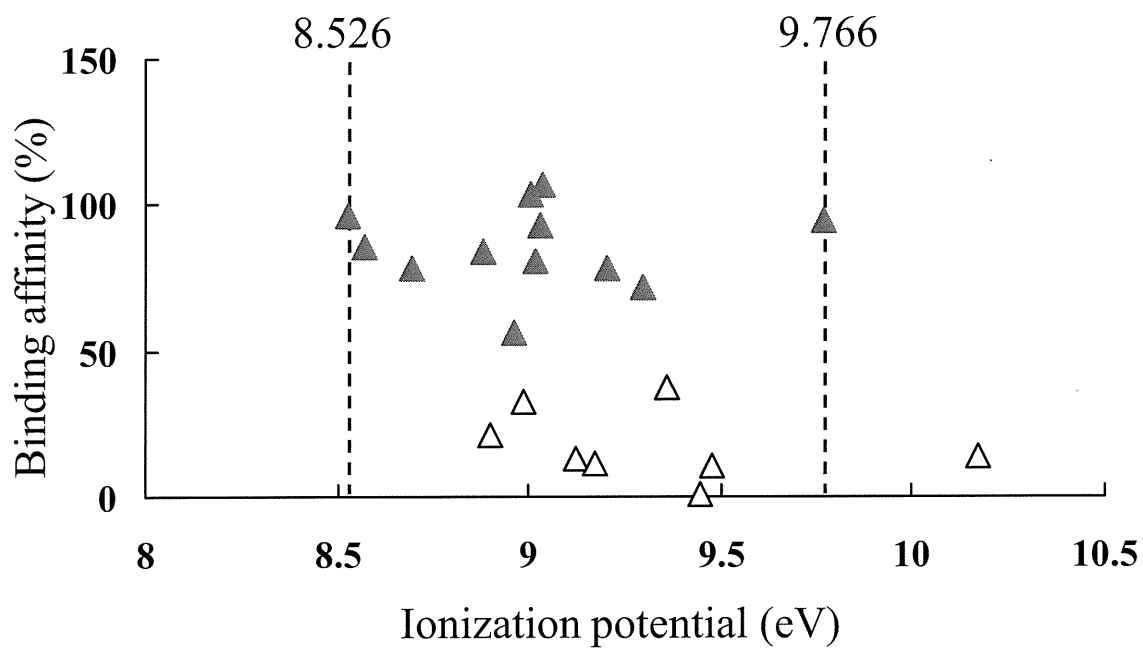


Fig. 6 Ionization potential vs binding affinity

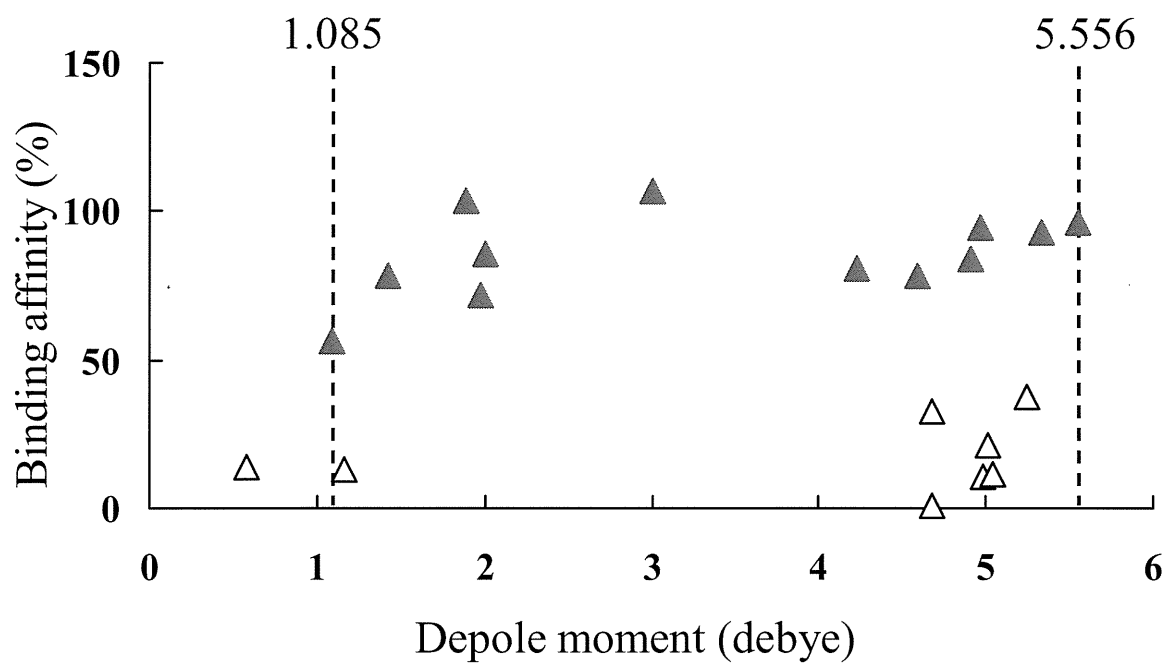


Fig. 7 Dipole moment vs binding affinity

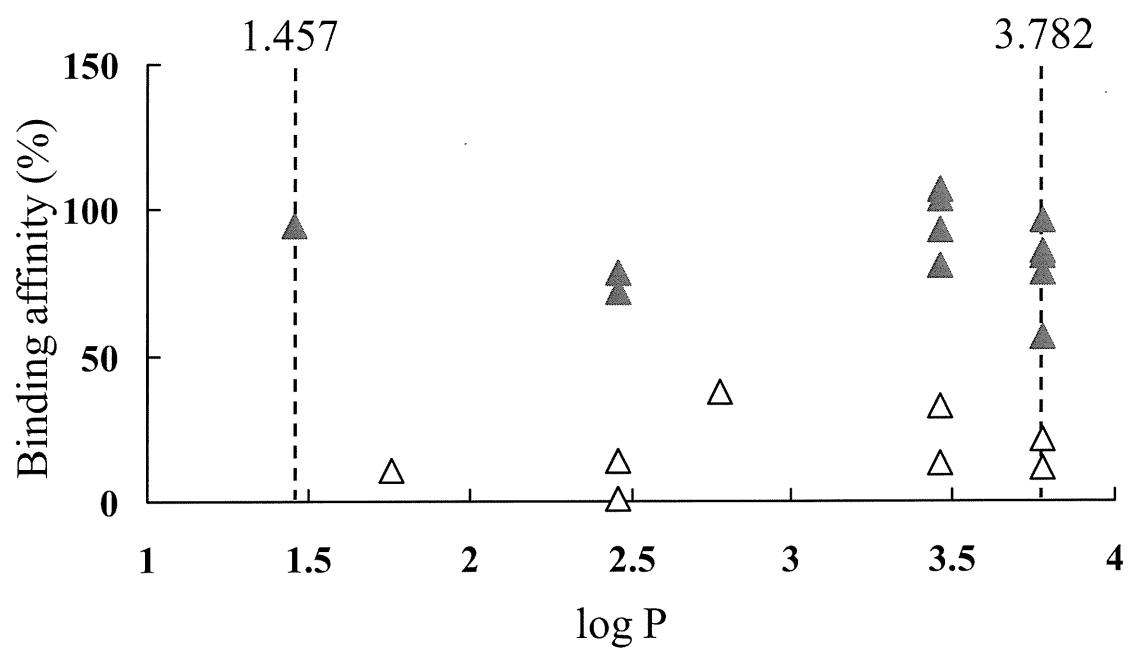


Fig. 8 log P vs binding affinity

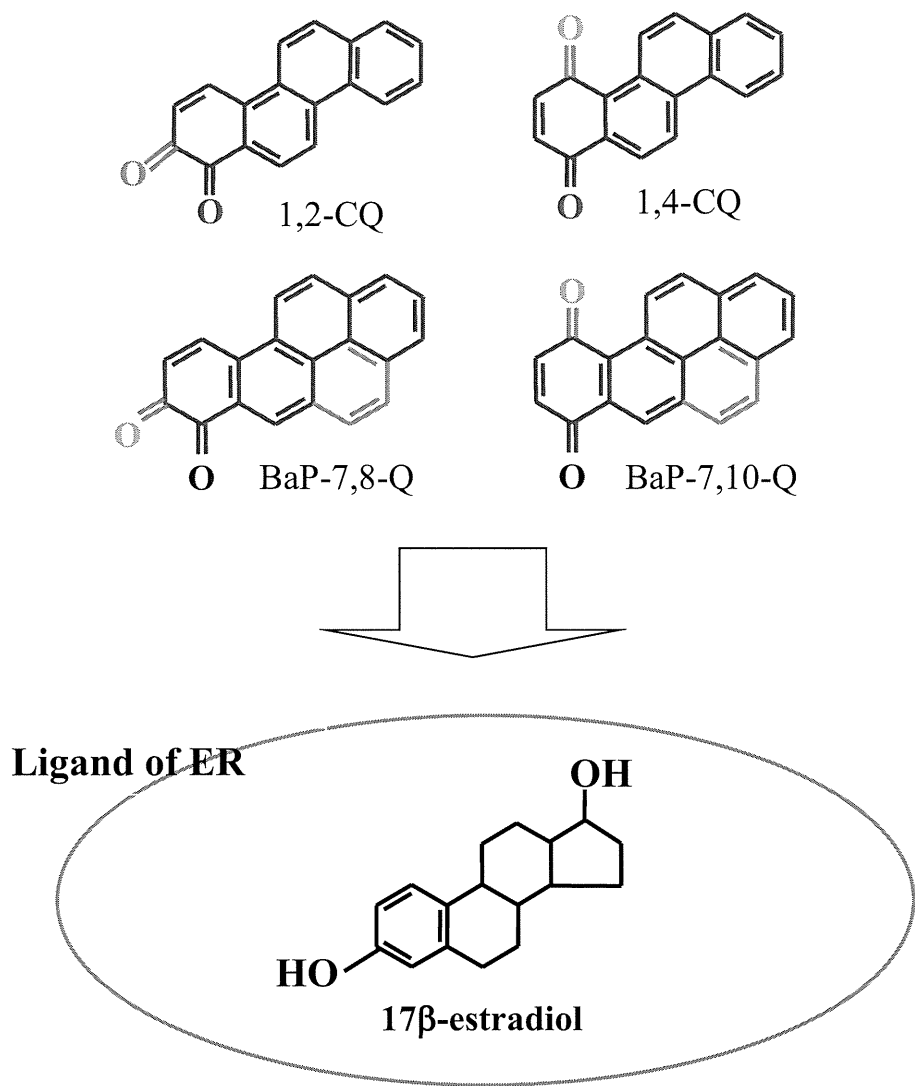


Fig. 9 Comparison of common structures (1,2-CQ, 1,4-CQ, BaP-7,8-Q, BaP-7,10-Q) and E₂

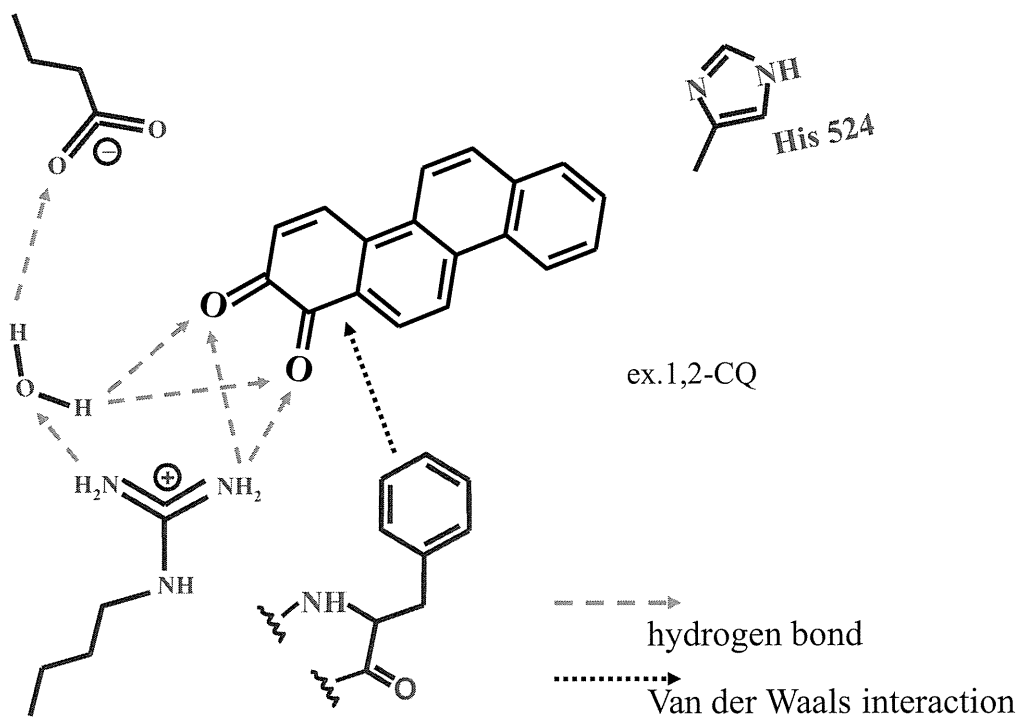


Fig. 10 Speculation of ER - *o*-PAHQ binding mode

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 23 年度分担研究報告書

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

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。またウロコは再生するという特徴を持ち、通常のウロコと比較すると細胞活性が高いことから、昨年度は再生ウロコを用いた高感度な評価システムを構築した。そこで本年度は、昨年開発した評価システムを用いて、①2～6環の合計48種類のOHPAH類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析し、②OHPAH添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子の変化を調べ、さらに③キンギョへのPAHの投与実験を行い、実際にPAHがOHPAHに代謝されるか否かについても解析した。本稿では、以上の3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、あるいは行動に参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類が内分泌かくらん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 (Cerver 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。

硬骨魚のウロコの基本構造は、I 型コラーゲンからなる線維層と I 型コラーゲンとハイドロキシアパタイトからなる骨質層 (石灰化層) の二層からなる (図 1)。そして、骨質層の表面に破骨細胞と骨芽細胞が共存しており、添加的石灰化・直接骨化・骨代謝を行っている。また、ウロコに存在する破骨細胞は、多核で波状縁も観察され (Azuma et al., 2007; Suzuki et al., 2008)、ヒトの破骨細胞と同様の組織構造と生理活性を持つことが示されている。したがって、ウロコは①シンプルな構造と石灰化様式を示す、②破骨細胞はヒトと同様の細胞構造と活性を持つ、といった利点がある。

さらにウロコは再生するという特徴を持ち、再生ウロコの骨芽細胞の活性が高く、さらに破骨細胞の活性も高い (図 2)。再生ウロコは骨代謝が亢進している骨モデルである。そこで昨年度は、この再生ウロコを用いた評価システムを開発した。そこで本研究では、この評価システムを用いて、①2~6 環の合計 48 種類の OHPAH 類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析、②OHPAH 添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子の変化、さらに③キンギョへの PAH の投与実験を行い、実際に PAH が OHPAH に代謝されるか否かについても解析した。

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. 魚類のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する OHPAH 類の影響

1-1. 試験物質

2~6 環の合計 48 物質の OHPAH 類を用いて、ウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性に対する影響を評価した。なお、本研究で用いたすべての試験物質の構造式と略称を 図 3 及び 4 に示す。

1-2. 再生ウロコの作成

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水溶液に入れて麻酔後、ピンセットを用いて側線鱗の上および下の各 3 行より左右対称に各列 (No. 1-18) 18 枚ずつウロコを抜去した。その後麻酔が覚めたら、前日から十分にエアレーションした 0.5% 食塩水の入った水槽に移して飼育した。14 日後、再びキンギョを麻酔して、14 日前に抜去した部位から再生してきたウロコを採取した。この時、頭側と尾側の両側 2 列の再生ウロコは、他の部位の再生ウロコに比べて骨芽細胞活性及び破骨細胞活性が低くなるのが予備実験で分かっていた為、両側 2 列については左右側面ともあらかじめ除去して使用しないこととした。

1-3. 培養

採取した再生ウロコは乾燥によるダメージから保護するため、抗生物質が入った L-15 培地 50 μ l ずつを各ウエルにあらかじめ入れてある 96 穴マイクロプレートを用意し、その中に再生ウロコを入れた。その後、実験群にはエタノールに溶解させた 2~6 環の合計 48 物質の OHPAH 類をそれぞれ L-15 培地に、エタノール含量 1% になるように溶解させた後、各々、 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M になるように希釈し、それを実験群の再生ウロコが入っている各ウエルに 50 μ l 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、加えた。その後、両群とも 15 $^{\circ}$ C のインキュベーターで 6 時間培養した。培養終了後、L-15 培地を除去して、各ウエルに生食水 100 μ l ずつを加えて洗浄した。骨芽細胞活性測定用のウロコにはアルカリ緩衝液 (pH 9.5) を、破骨細胞活性測定用には酸性酒石酸緩衝液 (pH 5.3) を、各ウエルにそれぞれ 100 μ l ずつ加えて、96 穴マイクロプレートを -80 $^{\circ}$ C で測定まで凍結・保存した。

1-4. 骨芽細胞及び破骨細胞活性の吸光度測定

-80 $^{\circ}$ C で凍結・保存したマイクロプレートを室温で解凍後、20 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含むアルカリ緩衝液 (pH 9.5) を 100 μ l ずつ各ウエルへ加えて、室温で 30 分間反応させた後、3 M NaOH を 50 μ l ずつ各ウエルへ加えて反応を止めた。ウエル内をピペティングで攪拌後、180 μ 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エルの溶液も同様に新しい 96 穴マイクロプレートへ移してブランクとして、405 nm で吸光度を測定した。

破骨細胞活性の吸光度測定は、アルカリ緩衝液 (pH 9.5) を酸性酒石酸緩衝液 (pH 5.3) に換えて使用し、その他の条件は、骨芽細胞活性測定と同様の条件で行った。

1-5. ウロコの面積の測定

吸光度測定後、残った反応液を取り除き、蒸留水でウロコを洗浄後、0.4% のメチレンブルー液を各ウエルへ 50 μ l ずつ加え、10 分以上染色した。その後、染色液を取り除き、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、余分な水分を除去した。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により解像度 300 ドット/インチ (dpi) の JPEG 画像としてウロコの画像を取り込んだ。

アメリカ国立衛生研究所 (National institutes of health : 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、ウロコの画像のコントラストを最大化 (Brightness/contrast) 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) 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、個々のウロコの面積 (mm²) に換算した。

1-6. ウロコの骨芽細胞および破骨細胞活性

測定した 405 nm の吸光度からブランク値を差し引いて吸光度を求めた。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て 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) を調べた。その後、反応時間 (h) とウロコ 1 枚の面積 (mm² scale) で生じた p-ニトロフェノール量を単位時間 (h)・単位面積 (mm²) で除して、酵素活性 (nmol pNP produced / (mm² scale × h)) とした。

1-7. 統計処理

結果はすべて、対照群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性に対する実験群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性の割合 (%) ± SEM の形で表した。48 物質の OHPAH で処理した時の実験群と対照群のウロコに対する影響の比較は、一対の標本による平均の検定 (paired t-test) で行った。なお危険率 5%未満を統計学的有意水準とした。また、20%以下を傾向があると定義した。

2. OHPAH 添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカ―遺伝子の変化

2-1. ウロコからの RNA の抽出及び cDNA 合成

麻酔したキンギョ (メス 5 匹、体重 40g 前後) のウロコを取り、2 週間後に再生ウロコを採取して、1-3 と同様な方法で培養した。試験物質としては、酵母 two-hybrid 法で最もエストロゲン活性が強く、昨年度タイムコース等を詳しく調べた 4-hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) を用いて、10⁻⁶ M で実験した。

再生ウロコを培養後、キアゲンのキットを用いて RNA を調整して、タカラバイオのキットを用いて cDNA 合成をおこなった。

2-2. リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

骨芽細胞のマーカ―として ALP、I 型コラーゲン、オステオカルシン、破骨細胞のマーカ―として TRAP、カテプシン K、nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATC1) を持っていた。プライマーの配列は、Thamamonggood et al. (2012) に示してある。

2-3. 統計処理

結果はすべて、対照群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性に対する実験群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性の割合 (%) ± SEM の形で表した。遺伝子発現の変化は、一対の標本による平均の検定 (paired t-test) で行った。

3. キンギョへの PAH の投与実験

3-1. 胆汁の採取

実験群のキンギョに、benz[a]anthracene (BaA) をエタノールに溶かしてキンギョの腹腔内に、5 µg/g BW 投与して、水温 25°C で飼育した後、解剖して胆汁を採取した。飼育時間は 12, 24, 48 及び 72 時間で、タイムコースごとに 5 匹のキンギョを用いた。対照群のキンギョは BaA

無添加のエタノールを投与したキンギョを同条件で飼育した後、解剖してそれぞれ胆汁を採取した。

3-2. 抱合体の分解及び HPLC による胆汁の分析

採取した胆汁中の PAH 類は、グルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体として存在しており、それぞれに対応する酵素で加水分解した後、HPLC による分離が可能となる (Jongeneelen, et al, 1984, 1987)。

したがって、あらかじめグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体を分解し、その分解率と回収率を求める必要がある。そこで 1-Hydroxypyrene (1-OH Pyr) グルクロニドを β -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼを用いて分解して、その回収率を求めた。

10^{-7} M 1-OH Pyr グルクロニドを β -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼ (5 μ L), 0.4 M アセテートバッファー (90 μ L) を加えて、37 $^{\circ}$ C で 0.1, 0.5, 2, 4 及び 8 時間インキュベーションした後、アセトニトリル (395 μ L)、内標準物質として 10^{-7} M 4-Hydroxychrysene (4-OHChr) 5 μ L を加えて除タンパクした。これを 10000 G で遠心し、0.22 μ m フィルターで濾過した。HPLC で測定して、あらかじめ作成した検量線を用いて、ピーク高さから濃度を求めた。その後 4-OHChr の回収率で補正して、1-OH Pyr グルクロニドの分解・回収率を求めた。

C. 結果

1. 魚類のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する OHPAH 類の影響

結果を表 1 及び図 5 ~16 に示す。図 5~16 においては、対照群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性に対する実験群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性の割合 (%) の形で表した。また、表 1 においては酵母 two-hybrid 法

でエストロゲン様作用及び抗エストロゲン様作用を示した OHPAH 類の結果、及び図 5~16 を簡潔にまとめた結果である。

本研究の結果から、OHPAH 類の大部分が骨芽細胞及び破骨細胞活性を上昇もしくは低下させる等の影響を与えることがわかった。酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様作用を示した 4-OHBaA は、昨年度の実験においてもエストロゲン様作用を示し、今回の解析でも、 10^{-6} M で骨芽細胞の活性に上昇がみられ、同様の作用を示す結果が得られた。しかしながら、その他のほとんどの OHPAH 類は、酵母 two-hybrid 法とは相関がみられなかった。

キンギョのウロコを E_2 で処理した際には、6 時間培養で骨芽細胞及び破骨細胞の両活性ともに上昇する (昨年度、研究報告参照)。したがって、今回調査した 48 物質の OHPAH 類の中で E_2 と同じ挙動、即ちエストロゲン様作用を示す傾向にあったものは 4-OHBaA に加えて、4 環では、 10^{-8} M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 1-OHBaA、 10^{-6} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 2-OHBaA、 10^{-10} M 及び 10^{-6} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 5-OHBaA、 10^{-8} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 9-OHBaA、 10^{-8} M で骨芽細胞活性が上昇傾向、及び 10^{-10} M で破骨細胞活性が有意に上昇した 1-OHBcP、 10^{-8} M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 2-OHBcP、 10^{-6} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 3-OHBcP があつた。

また、5 環では、 10^{-10} M で破骨細胞活性が有意に上昇した 2-OHBbFR、 10^{-6} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 3-OHBbFR、 10^{-10} M で骨芽細胞活性が有意に上昇、及び 10^{-6} M で上昇傾向を示した 9-OHBbFR、 10^{-8} M で骨芽細胞活性及び破骨細胞活性が上昇傾向を示した 10-OHBbFR、 10^{-8} M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 12-OHBbFR、 10^{-6} M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 4-OHBcP、 10^{-10} M で骨芽細胞活性が上昇傾向、 10^{-8} M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 9-OHBcP、 10^{-6} M で骨芽細胞活性