

が上昇傾向、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 10-OHBeP があった。

$E_2$  とは逆の挙動、即ち抗エストロゲン作用を示す傾向であった物質は、2 環では、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 2-OHNp があった。3 環では、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 2-OHFl があった。4 環では、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHBaA、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 10-OHBaA、全濃度で破骨細胞活性が減少傾向を示した 4-OHBcP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向、及び  $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少した 2-OHCh、全濃度で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHCh、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-8}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 4-OHCh があった。5 環では、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 6-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 8-OHBbFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 11-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHBkFR、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 8-OHBaP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-8}$  M 及び  $10^{-6}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 11-OHBgCh があった。6 環では、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 6-OHIDP、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で減少傾向、及び  $10^{-6}$  M で有意に減少した 8-OHIDP があった。

骨芽細胞及び破骨細胞において、作用が一致しない、また濃度の違いによっても作用に違いが認められた物質は、3 環では、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で有意に低下し、 $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 2-OHPh があった。4 環では、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で低下傾向を示し、 $10^{-8}$  M 及び  $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 3-OHFR、骨芽細胞活性が  $10^{-10}$  M で低下傾向を示し、 $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 1-OHPy、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が上

昇傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-6}$  M で低下傾向を示した 11-OHBaA、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で上昇傾向を示した 5-OHBcP、 $10^{-10}$  M 及び  $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-6}$  M で破骨細胞活性が有意に上昇した 6-OHCh があった。5 環では、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少したが、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M 及び  $10^{-8}$  M で有意に上昇した 1-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少したが、破骨細胞活性が  $10^{-8}$  M で上昇傾向を示した 8-OHBkFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が有意に上昇したが、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で有意に減少、 $10^{-8}$  M で減少傾向を示した 9-OHBkFR、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が低下傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で上昇傾向、 $10^{-6}$  M で減少傾向を示した 6-OHBaP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少傾向を示したが、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 13-OHBgCh があった。

## 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ー遺伝子の変化

4-OHBaA の作用をリアルタイム PCR により詳細に解析した結果、骨芽細胞のマーカーでは I 型コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致した (図 17 及び 18)。

さらに、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンと破骨細胞のマーカーであるカテプシン K は上昇傾向にあった (図 17 及び 18)。これらの結果は、骨芽細胞及び破骨細胞の活性が上昇するというエストロゲンの作用と一致していた。

## 3. キンギョへの PAH の投与実験

回収率は、2 時間インキュベーションしたものが、最も高い回収率 (67.34 %) であった。し

たがって、2時間のインキュベーションでサンプルを処理した(図19)。

各個体の採取した胆汁 5  $\mu\text{L}$  に  $\beta$ -グルクロニダーゼ・アシルスルファターゼ 5  $\mu\text{L}$ 、0.4 M アセテートバッファー (90  $\mu\text{L}$ ) を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベーションした後、アセトニトリル (395  $\mu\text{L}$ )、内標準物質として $10^{-7}$  M 4-OHChr (5  $\mu\text{L}$ ) を加えて除タンパクした。これを 10000 G で遠心し、0.22  $\mu\text{m}$  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、1-OH Pyr グルクロニドの分解・回収率で補正し、胆汁 1 mL あたりの 4-OHBaA 量を求めた。クロマトグラムを 図20に示す。胆汁中の 4-OHBaA 濃度は、腹腔内投与から 12 時間 (9.78 M)、24 時間 (15.88 M)、48 時間 (16.96 M) と経つにつれて上昇し、72 時間 (12.99 M) では少し低下し始めた。一方コントロールの胆汁からは 4-OHBaA のピークが確認されなかった(図21及び22)。

#### D. 考察

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

4 環の 1-OHBaA、2-OHBaA、4-OHBaA、5-OHBaA、9-OHBaA、1-OHBcP、2-OHBcP、及び 3-OHBcP と、5 環の 2-OHBbFR、3-OHBbFR、9-OHBbFR、10-OHBbFR、12-OHBbFR、4-OHBeP、9-OHBeP 及び 10-OHBeP の計 16 物質はエストロゲン様作用を示す傾向が認められた。また、今回の試験では 2 環、3 環及び 6 環ではエストロゲン様作用を示す物質はみられなかった。

一方抗エストロゲン作用を示す傾向がみられた物質は、2 環の 2-OHNp、3 環の 2-OHf1、4 環の 3-OHBaA、10-OHBaA、4-OHBcP、2-OHCh、3-OHCh 及び 4-OHCh、5 環の 6-OHBbFR、7-OHBbFR、8-OHBbFR、11-OHBbFR、3-OHBkFR、8-OHBaP、11-OHBgCh、6 環の 6-OHIDP 及び 8-OHIDP の計 17 物質であった。

この中で、酵母 two-hybrid 法と関連する傾向がみられた物質は、エストロゲン様作用では 12-OHBbFR、4-OHBeP があり、抗エストロゲン作用を示した物質としては 4-OHBcP、3-OHCh、6-OHBbFR、8-OHBaP、11-OHBgCh であった。また、今回試験した中では、5 環の OHPAH 類に骨芽細胞及び破骨細胞活性に有意に作用するものが多いようにみられた。ウロコ培養アッセイ法を用いた解析において、一部の OHPAH 類ではエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を示すことが判明した。しかしながら、ほとんどの OHPAH 類は、酵母 two-hybrid 法とは関連がみられなかった。

キンギョの ER は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類が存在し、 $\gamma$  は  $\beta$  のサブタイプであり、キンギョの場合は、 $\beta 2$  が  $\beta$ 、 $\beta 1$  は  $\gamma$  のことを示している (Yoshikubo et al., 2005)。キンギョの普通ウロコにおける ER は  $\beta$  タイプが最も多く発現しており、 $\alpha$  タイプの発現量は少ないことが報告されている。また再生 14 日目の再生ウロコでも  $\beta$  タイプが最も多く発現している (未発表データ)。一方、 $\alpha$  タイプの発現は非常に低く、 $\alpha$  タイプがメインで発現しているヒトとは異なっていることが判明した (Yoshikubo et al., 2005)。酵母 two-hybrid 法で使用しているものは hER であるが、 $\alpha$  タイプのみでなく、 $\beta$  タイプも発現させている。したがって、酵母 two-hybrid 法との関連がほとんどみられなかったのは、ウロコでは  $\alpha$  タイプの発現量が少なく、 $\beta$  タイプがメインで発現していることが原因かもしれない。

また、OHPAH 類の曝露する濃度が低濃度及び高濃度で骨芽細胞と破骨細胞の活性に違いが認められた。上記で述べたように、魚類のウロコには 3 種類の ER があり、これはそれぞれに対する結合性の相違である可能性がある (Yoshikubo et al., 2005)。例えば、低濃度では、ER  $\alpha$  が応答し、高濃度では、ER  $\beta$  が応答することが考えられる。一例として、ビスフェノール A の場合は、ER  $\alpha$  と ER  $\beta$  に対する応答性が

異なることが報告されている (Matsushima *et al.*, 2010)。また、ビスフェノール A はエストロゲン関連受容体 (Estrogen related receptor : ERR) とも結合する (Liu *et al.*, 2010)。魚類にも ERR が存在している可能性があり、この受容体とも結合して影響を与えたとも考えられる。

また、酵母 two-hybrid 法は ER 単独の系であるのに対し、ウロコ培養アッセイ系は骨組織の器官培養系である為、酵母 two-hybrid 法に比べて、より脊椎動物の骨代謝に近いモデルである。したがって、OHPAH 類が ER を介しての作用に加えて、その他の受容体もしくは受容体を介さず働いた可能性も考えられる。

## 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ー遺伝子の変化

昨年度の結果では、6 時間の培養で、骨芽細胞及び破骨細胞の活性が有意に上昇したのに対し、今回の結果では両活性ともに上昇する傾向を示したのみであった。しかしながら、リアルタイム PCR を用いて骨芽細胞と破骨細胞の 1. マーカーを解析した結果、骨芽細胞のマーカーではタイプ I コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは TRAP mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致していた。したがって、4-OHBaA はエストロゲン様作用を示すことがわかった。

## 3. キンギョへの PAH の投与実験

キンギョに BaA を投与した結果、投与しない個体と比べて胆汁量の増加が見られた。これは体内の異物の排泄速くするための防御機能の一つではないかと考えられる。

また、目的の 4-OHBaA を測定するための基礎検討として、まず 4-OHBaA の保持時間を確認した。4-OHBaA のピークはその他の BaA のモノヒドロキシ体のピークから分離しており同定が可能であると判断した。次に、1-OH

Pyr グルクロニドを  $\beta$ -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、その分解・回収率を求めた。これは PAH 代謝物が通常、グルクロン酸抱体あるいは硫酸抱合体として存在しており、HPLC で測定するためには酵素で加水分解するが、その操作過程でのロスを補正するためである (Jongeneelen *et al.*, 1984, 1987)。その結果、2 時間インキュベーションしたものが、最も高い回収率 (67.3 %) であり、実際の試料も 4-OHBaA があらかじめ 67.3 % の回収率であると仮定して補正することとした。

この基礎検討をもとに、胆汁中の 4-OHBaA 濃度を測定したところ、腹腔内投与から 48 時間をピークにして 4-OHBaA を確認することができた。また 72 時間では少し低下し始めたことから、一般的な薬物の代謝曲線のように、以降徐々に低下していくことが予想される。

## E. 結論

2~6 環の合計 48 種類の OHPAH 類について、ウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性に及ぼす影響を評価した。その結果、48 物質の中でエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を示すものがあることが判明した。その中でも 4-OHBaA は当研究室のこれまでの研究結果と同様に、エストロゲン様作用を示した。

2. 4-OHBaA の作用を詳細に解析した結果、骨芽細胞のマーカーでは I 型コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致した。したがって、4-OHBaA はエストロゲン様作用を示すことがわかった。
3. PAH をキンギョに投与後、胆汁中の水酸化 PAH を分析した結果、実際に水酸化 PAH が生じることを証明した。

## 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  $\square$ -receptor and ARNT mRNAs, *Nucleic. Acid. Res.*, **22**, 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 anestrogen receptor- $\alpha$  reporter geneassay, *Toxicol. Sci.*, **55**, 320-326 (2000).
6. 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 exprresssion assays, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1853-1860 (1998).
7. Hankinson O., The aryl hydrocarbon receptor complex, *Annu. Rev. Pharmacol.*, **35**, 307-40 (1995).
8. Hayakawa K., Nomura M., Nakagawa T., Oguri S., Kawanishi T., Toriba A., Kizu R., Sakaguchi T., Tamiya E., Damage to and recovery of coastlines pollutedwith C-heavyoil spilled from the Nakhodka, *Water Res.*, **40**, 981-989 (2006).
9. Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Chung SW., Kizu R., Toriba A., Kameda T., Tang N., Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeasttwo-hybrid assay, *J. Health Sci.*, **53**, 562-570 (2007).
10. 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).
11. 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).
12. Jaruchotikamol, A., Jarukamjorn K., Sirisangtrakul W., Sakuma T., Kawasaki, Y., NemotoN., Strongsynergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **224**, 156-162 (2007).
13. Jongeneelen F.J., Leijdekkers, C. and P.T. Henderson, P.T., Urinary excretion of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene after percutaneous penetration and oral absorption of benzo[a]pyrene in rats, *Cancer Lett.*, **25**, 195-201 (1984).
14. Jongeneelen F.J., Amzion, R.B.M. and Henderson, P.T., Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J. Chromatogr.*, **413**, 227-232 (1987).
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. Li D., Daler D., Ocean pollution from land-based sources: East China Sea, China, *Ambio*, **33**, 107-113 (2004).
17. 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).
18. Liu, Y., Zhu, L., Shen, X., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 840-844 (2001).
19. Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., Shimohigashi, Y. : Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ER $\alpha$  between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen, *J. Biochem*, **148**, 247-254 (2010).
20. Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., Shimohigashi, Y. : Bisphenol A is a full agonist for the estrogen receptor ER $\alpha$  but a highly specific antagonist for ER $\beta$ , *Environ. Health Perspect.*, **118**, 1267-1272 (2010).
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., Somei, M., Seki, A., Reiter, R.J. and Hattori, A., Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J. Pineal Res.*, **45**, 229-234 (2008)
25. Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N., and Hattori, A.: Expression of osteoblast-specific genes during spontaneous goldfish scale regeneration and role of cell-to-cell contact in controlling the onset of resorption/regeneration process found in intra-scale pocket autotransplantation of modified scales. *Bone*, **50**, 1240-1249 (2012)
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

### 論文発表

- 1) Kobayashi, Y., Chiba, H., Mizusawa, K., Suzuki, N., Cerdá-Reverter, J.M. and Takahashi, A.: Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in

- xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **173**: 438-446 (2011).
- 2) 鈴木信雄, 関 あずさ, 染井正徳, 中村正久, 矢野幸子, 大森克徳, 池亀美華, 三島弘幸, 早川和一, 服部淳彦: メラトニンの新規作用: 骨に対する作用とその誘導体を用いた骨疾患治療薬の開発. *比較内分泌学*, **37**, 194-203(2011).
- 3) Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Katoc, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Danks, J.A., Martin, T.J., Hattori, A., Nakano, M., Kakikawa, M., Yamada, S., Ogoshi, M., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Sasayama, Y.: Cloning of two members of the calcitonin receptor family from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, **499**, 326-331 (2012).
- 4) Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A.: Expression of osteoblast-specific genes during spontaneous goldfish scale regeneration and role of cell-to-cell contact in controlling the onset of resorption/regeneration process found in intra-scale pocket autotransplantation of modified scales. *Bone*, **50**, 1240-1249 (2012).
- 5) Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kitamura, K., Sato, Y., Nara, M., Funahashi, H., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Endo, M., Kusakari, R., Yano, S., Srivastav, A.K., Kusui, T., Ejiri, S., Chen, W., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Kondo, T., Sasayama, Y. Nishiuchi, T., Nakano, M., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Prostaglandin E2 increases both osteoblastic and osteoclastic activities in the scales of goldfish and participates in the calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.*, in press.
- 6) 鈴木信雄, 舟橋久幸, 耿 啓達, 柿川真紀子, 山田外史, 廣田憲之, 北村敬一郎, 清水宣明, 早川和一, 三島弘幸, 岩坂正和, 上野照剛, 大森克徳, 矢野幸子, 池亀美華, 田淵圭章, 和田重人, 近藤 隆, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた評価系の開発と骨代謝研究への応用. まぐね, 印刷中.
2. 著書
- 1) Suzuki, N. and Sakamoto, T., Comparative and general aspects of calcium homeostasis and its hormonal regulations. In "Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates". Suzuki, N. and Sakamoto, T., eds. Virtual special issues in Zoological Science, in press.
3. 学会発表
- 1) Kawabe, K., Suzuki, N., Hayakawa, K.: *in vivo* study of the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the regenerating scales in goldfish. The 52<sup>nd</sup> Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 2) Hayakawa, K., Bekki, K., Kameda, T., Tang, N., Toriba, A., Endocrine disruption and active oxygen species overproduction by oxidative metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons. The 52<sup>nd</sup> Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 3) 池亀美華, 服部淳彦, 矢野幸子, 山本敏男, 鈴木信雄: 微小重力に対する破骨細胞の応答: 魚のウロコを用いた形態学的解析. 第31回日本骨形態計測学会, 2011. 5. 21-22, 岐阜.
- 4) 関あずさ, 鈴木信雄, 池亀美華, 染井正徳, 服部淳彦: 新規プロモメラトニン誘導体の

- 骨折治癒モデルラットの骨代謝に及ぼす影響. 第31回日本骨形態計測学会, 2011. 5. 21-22, 岐阜.
- 5) 関あずさ, 鈴木信雄, 染井正徳, 矢野幸子, 服部淳彦: 新規プロモメラトニン誘導体の骨折治癒モデルラットの骨代謝に及ぼす影響. 第29回日本骨代謝学会, 2011. 7. 28-30, 大阪.
  - 6) 池亀美華, 服部淳彦, 北村敬一郎, 田畑 純, 矢野幸子, 山本敏男, 鈴木信雄: キンギョのウロコに存在する破骨細胞は微小重力下で活性化する. 第29回日本骨代謝学会, 2011. 7. 28-30, 大阪.
  - 7) 中野 淳, 川部季美, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 笹山雄一, 服部淳彦, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用: 魚類のウロコを用いたバイオアッセイによる解析. 平成23年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 8) 鈴木信雄, 池亀美華, 田畑 純, 北村敬一郎, 矢野幸子, 山本敏男, 服部淳彦: 宇宙におけるウロコの破骨細胞の形態及び細胞活性の変化. 平成23年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 9) 福島綾香, 古澤之裕, 田淵圭章, 高崎一朗, 近藤 隆, 和田重人, 服部淳彦, 早川和一, 北村敬一郎, 笹山雄一, 鈴木信雄: キンギョの鰓後腺におけるカルシトニン I 及び II mRNA の検出. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 10) 谷内口孝治, 鈴木信雄, 服部淳彦, 早川和一: キンギョのウロコにおける無機水銀の作用: *in vitro*のアッセイによる解析. 平成23年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 11) 松本典子, 川部季美, 中野 淳, 早川和一, 鳥羽 陽, 北村敬一郎, 服部淳彦, 笹山雄一, 鈴木信雄: エストロゲン及び多環芳香族炭化水素類のキンギョの骨代謝に及ぼす影響評価. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 12) 川部季美, Mohamed Nassef, 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 鳥羽 陽, 早川和一: メダカの胚発生における多環芳香族炭化水素の影響: ナノインジェクション法による解析. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
  - 13) 服部淳彦, 池亀美華, 矢野幸子, 鈴木信雄: 骨とメラトニン. 第3回抗加齢内分泌研究会学術集会, 2011. 9. 4, 神奈川.
  - 14) 矢野幸子, 大森克徳, 佐藤雄亮, 北村敬一郎, 丸山雄介, 中野真樹, 服部淳彦, 池亀美華, 鈴木信雄: 物理的刺激に対するメダカのウロコの骨芽及び破骨細胞の応答. 第25回日本宇宙生物科学学会, 2011. 9. 30-10. 1, 神奈川.
  - 15) 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦, 北村敬一郎: 魚類の再生ウロコの骨代謝に及ぼす機械的刺激の影響: *in vivo* および *in vitro* のアッセイによる解析. 第25回日本宇宙生物科学学会, 2011. 9. 30-10. 1, 神奈川.
  - 16) 鈴木信雄: 魚類のウロコにおけるホルモン及び物理的刺激 (磁場刺激) の応答. 日本歯科基礎医学会, 2011.9.30-10.2, 岐阜.
  - 17) 川部季美, Nassar, H. F., 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 中野 淳, 鳥羽陽, 亀田貴之, 早川和一, 多環芳香族炭化水素類のメダカの胚発生に及ぼす影響, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
  - 18) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一: 赤外・ラマン分光によるキンギョのウロコの状態分析. 医用分光学研究会, 2011. 11. 13, 島根.
  - 19) 川部季美, Mohamed Nassef, 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 中野 淳, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: 水酸化多環芳香族炭化水素のメダカとウニの胚発生に及ぼす影響. 日本薬学会北陸支部第123回

例会, 2011, 11. 27, 石川.

- 20) 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦, 北村敬一郎: キンギョの再生ウロコの*in vivo* および*in vitro* 系による機械的刺激の骨代謝への影響. 平成23年度生体医工学会北陸支部大会, 2011. 12. 10, 石川.
- 21) 鈴木信雄, 矢野幸子, 古澤之裕, 池亀美華, 田渕圭章, 北村敬一郎, 和田重人, 高崎一朗, 清水宣明, 近藤 隆, 服部淳彦: LIPUSの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用: 魚の培養ウロコを骨のモデルとした解析. 第15回超音波骨折治療研究会, 2012. 1. 21, 東京.
- 22) Maruyama, Y., Suzuki, N., Hattori, A.: Activation of osteoclasts in female goldfish during the reproductive stage. 7<sup>th</sup> Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. 3. 3-7. 2012, Penang, Malaysia.
- 23) 谷内口孝治, 松本典子, 鈴木信雄, 羽賀雄紀, 鈴木元治, 松村千里, 鶴川正寛, 中野 武, 川部季美, 鳥羽 陽, 早川和一, 服部淳彦: 魚類の骨代謝に対するポリ塩化ビフェニルの作用. 第45回日本水環境学会, 2012. 3. 14-16, 東京.
- 24) 鈴木信雄, 松本典子, 川部季美, 中野 淳, 鳥羽 陽, 早川和一, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦: 魚類の骨代謝に及ぼす多環芳香族炭化水素類の作用. 第45回日本水環境学会, 2012. 3. 14-16, 東京.



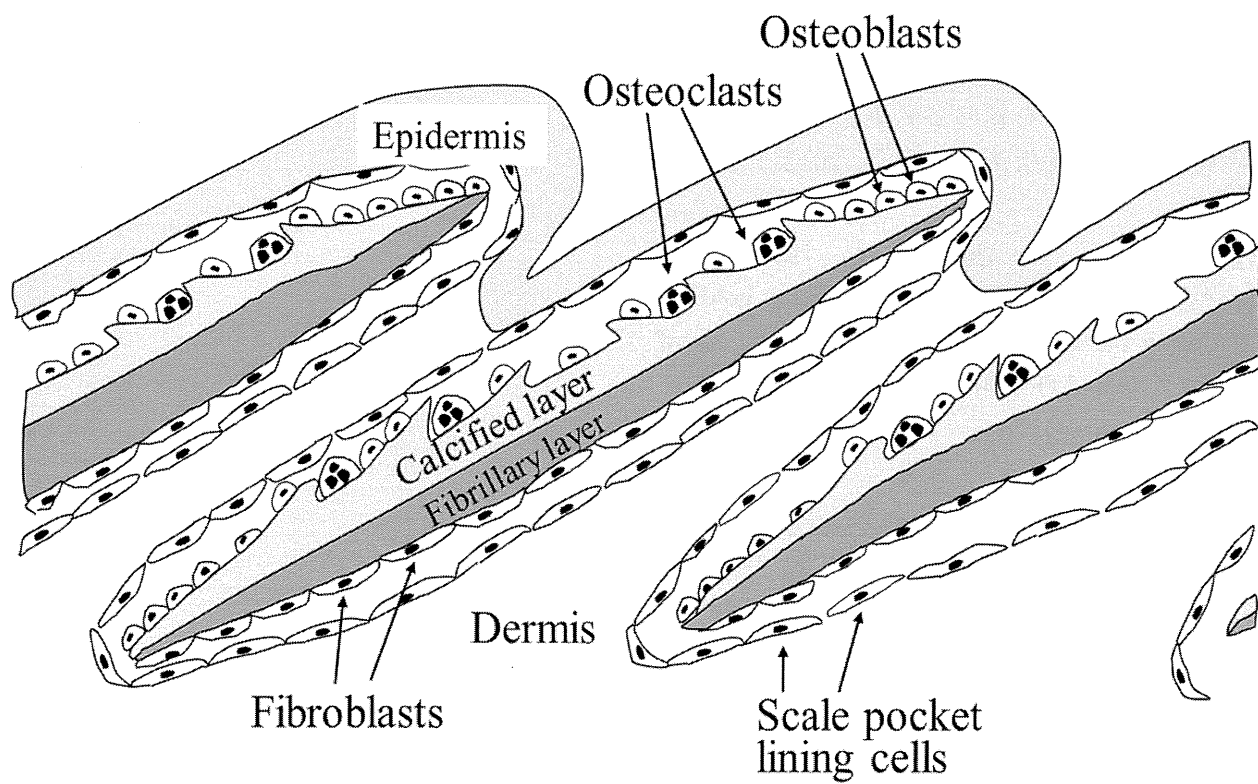


Fig. 1 Schema of a transverse section of teleost skin with scales.  
 The teleost scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix and is similar to that found in mammalian membrane bone.

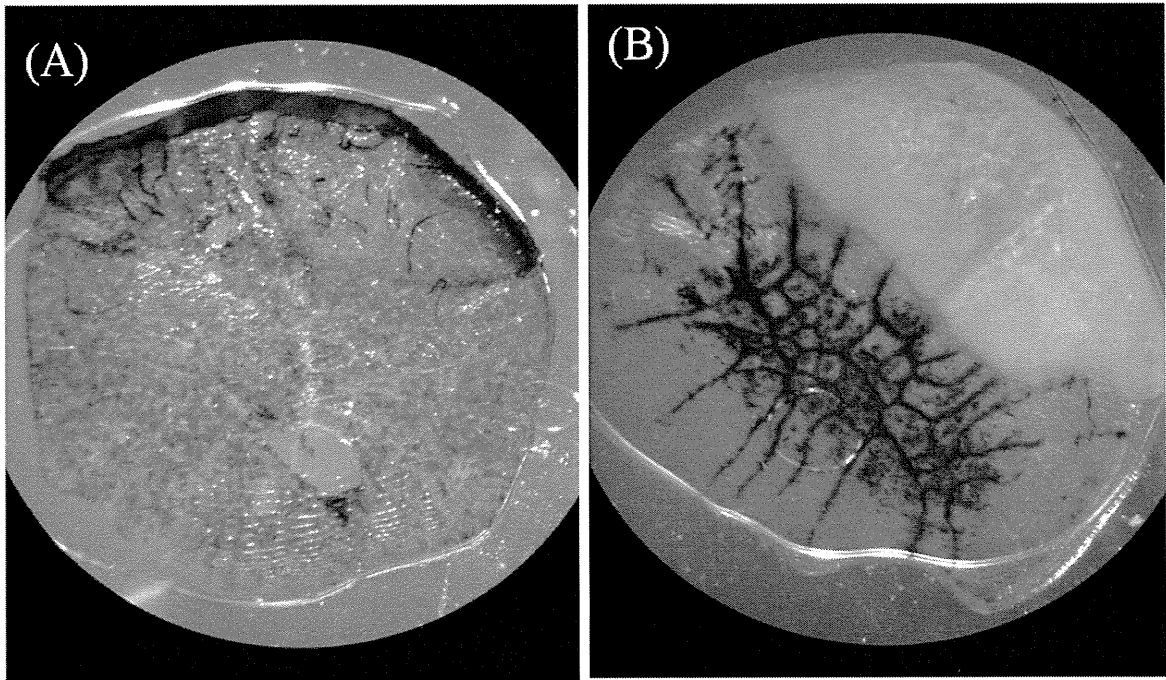


Fig. 2 (A) ALP staining and (B) TRAP staining in the regenerating scales of goldfish.  
(ALP : Alkaline phosphatase, TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase).

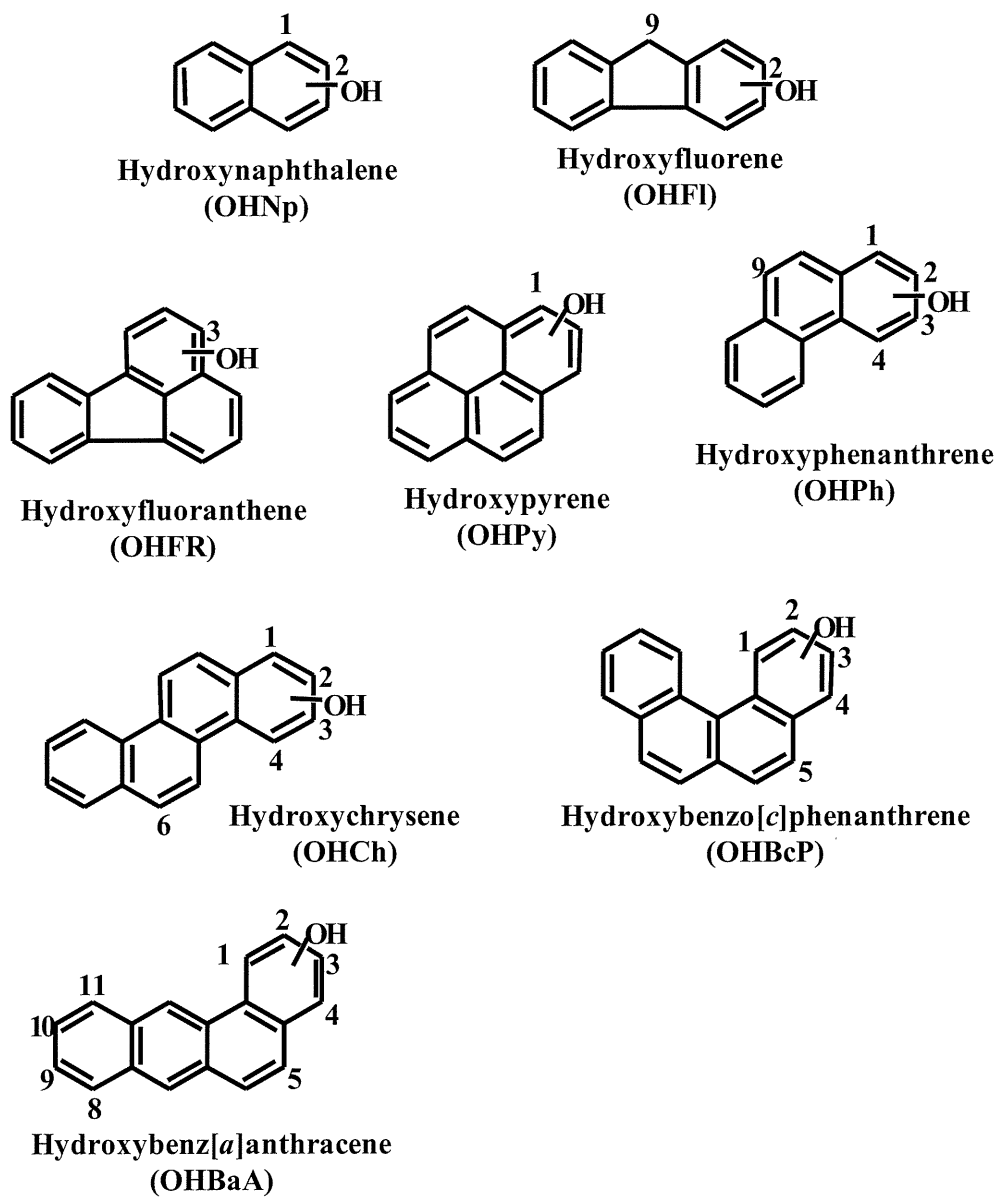


Fig. 3 Chemical structures of PAHs and OHPAHs tested in the present study.

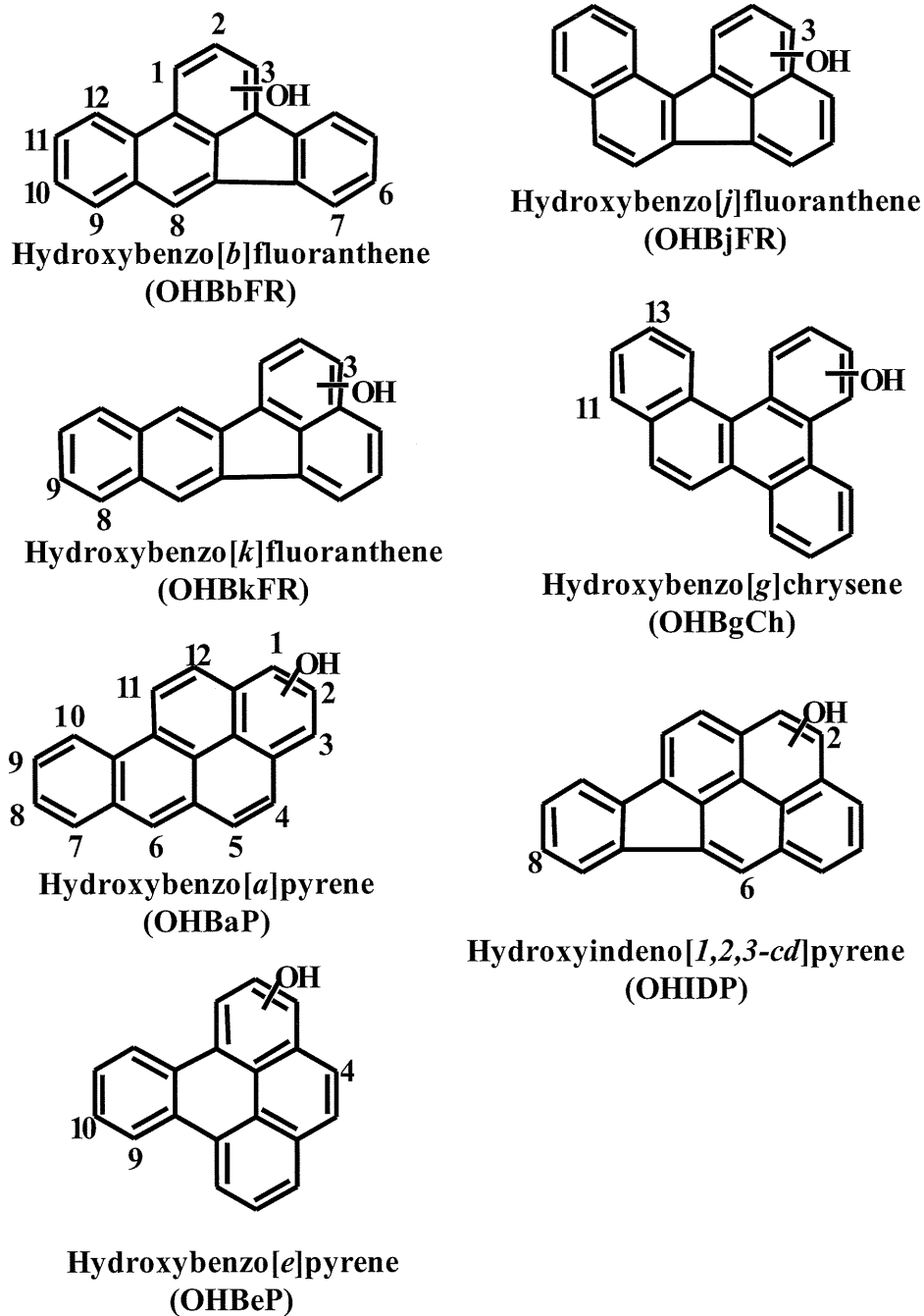


Fig. 4 Chemical structures of PAHs and OHPAHs tested in the present study.

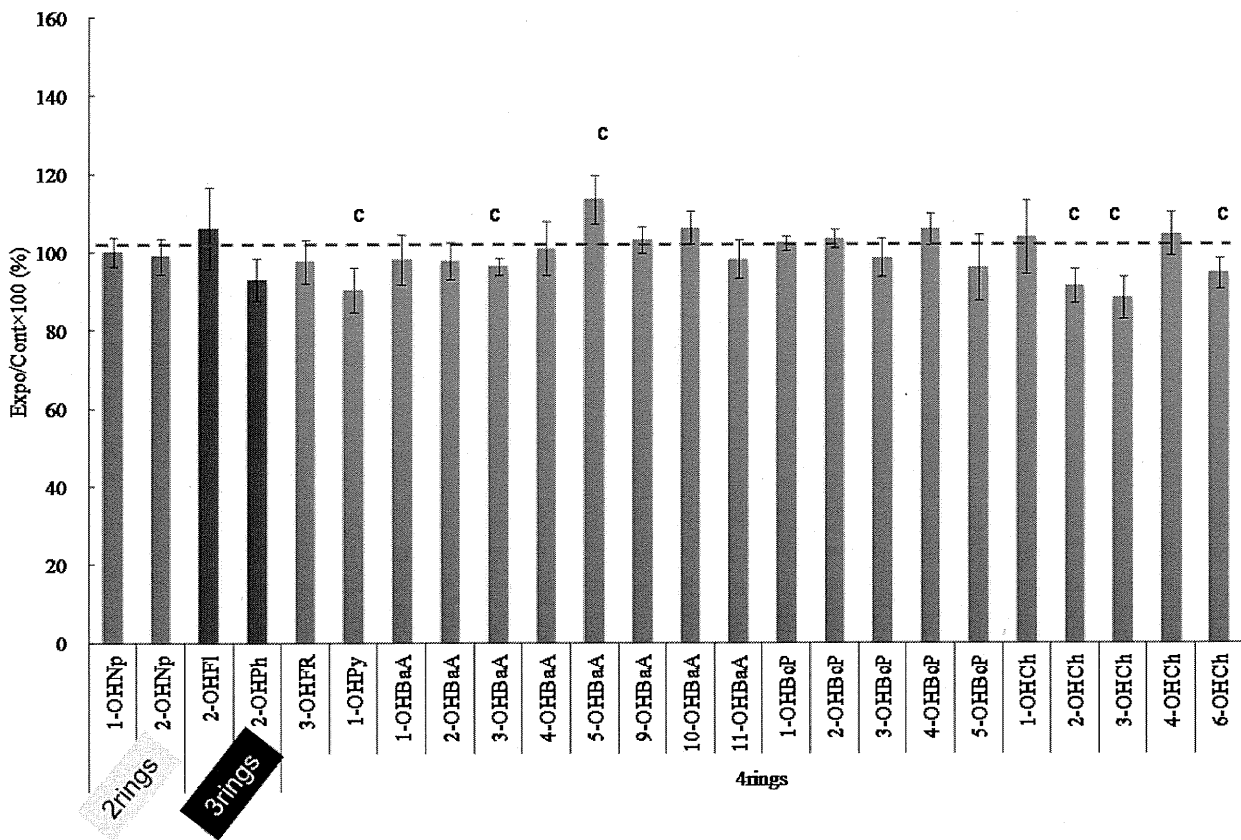


Fig.5 Effect of 2-, 3- and 4-OHPAHs ( $1 \times 10^{-10}$  M) on ALP activity.  
(c :  $P < 0.20$ )

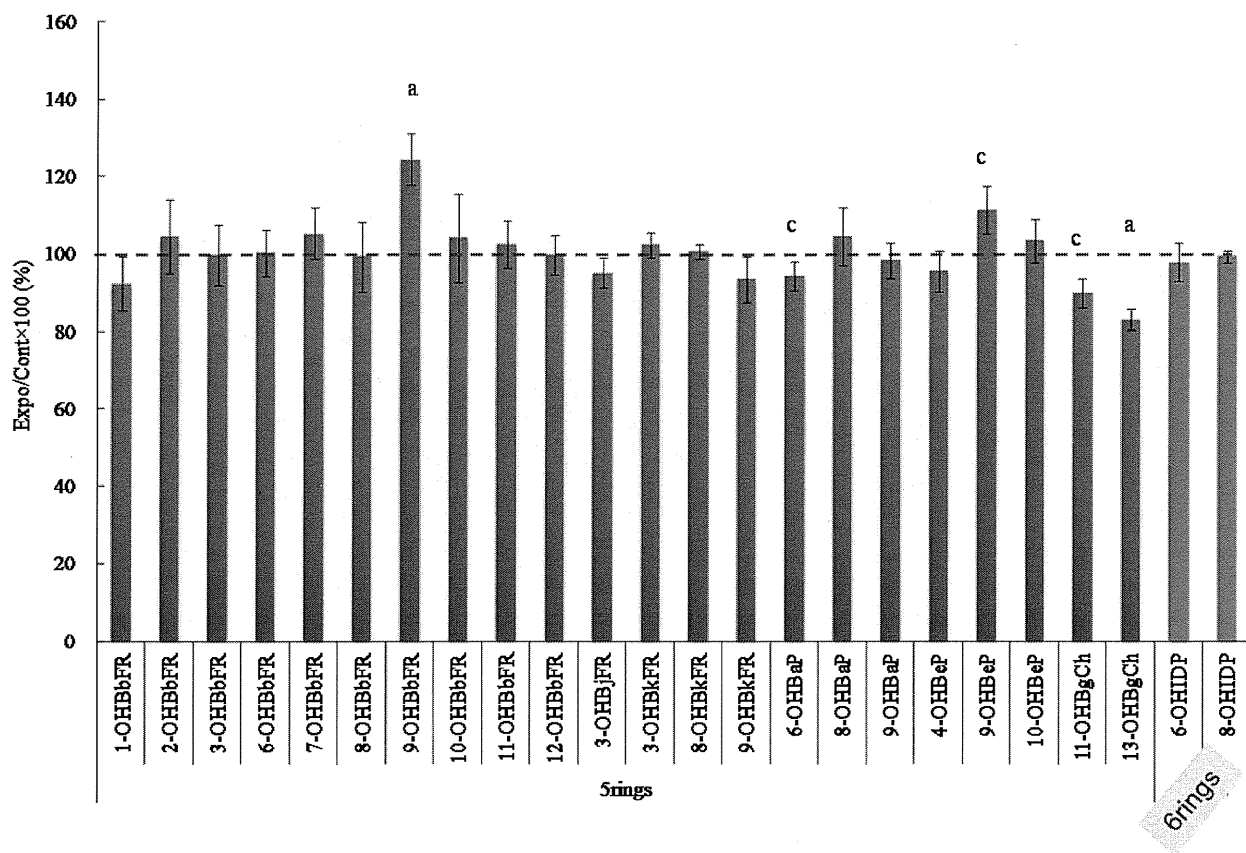


Fig.6 Effect of 2-, 3- and 4-OHPAHs ( $1 \times 10^{-10}$  M) on ALP activity.  
(a :  $P < 0.01$ , c :  $P < 0.20$ )

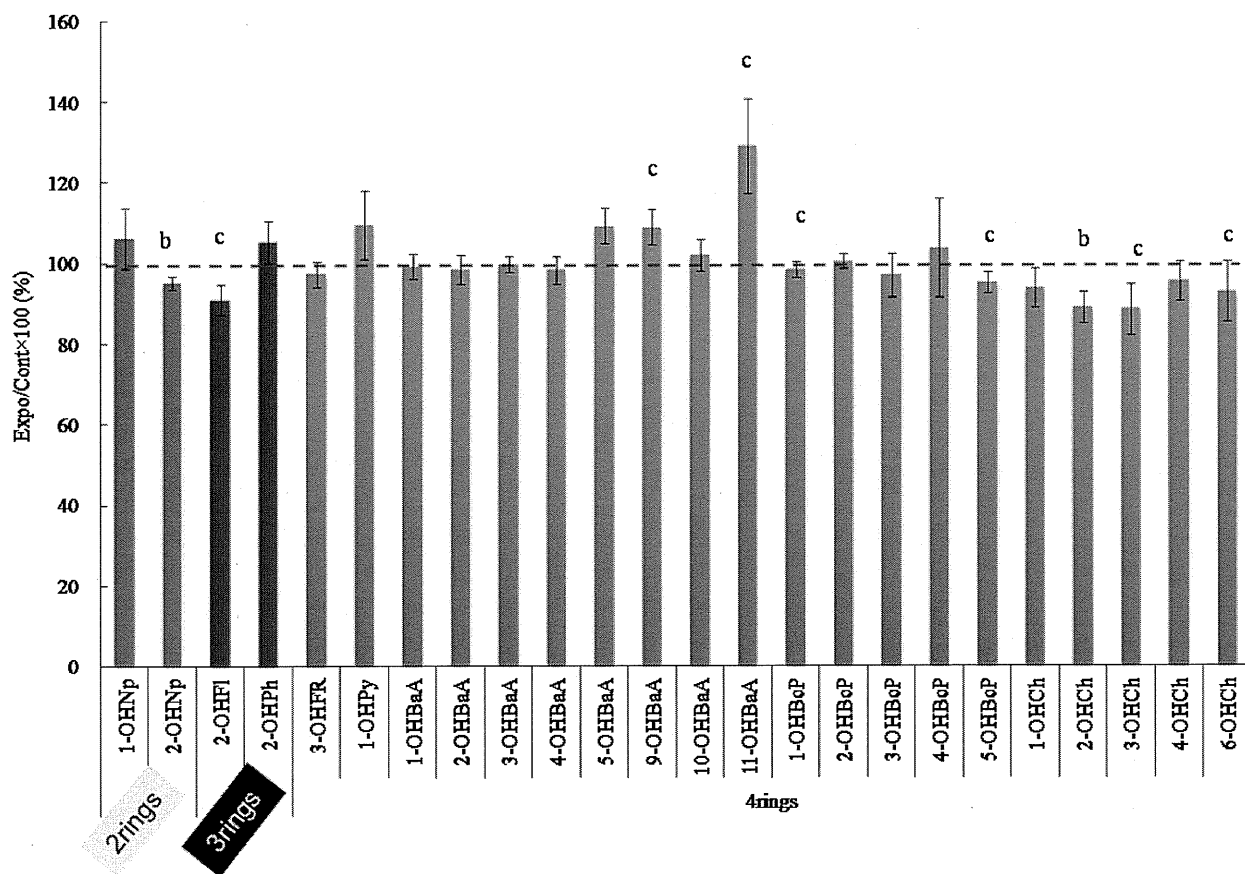


Fig.7 Effect of 2-, 3- and 4-OHPAHs ( $1 \times 10^{-10}$  M) on ALP activity.  
 (b:  $P < 0.05$ , c :  $P < 0.20$ )

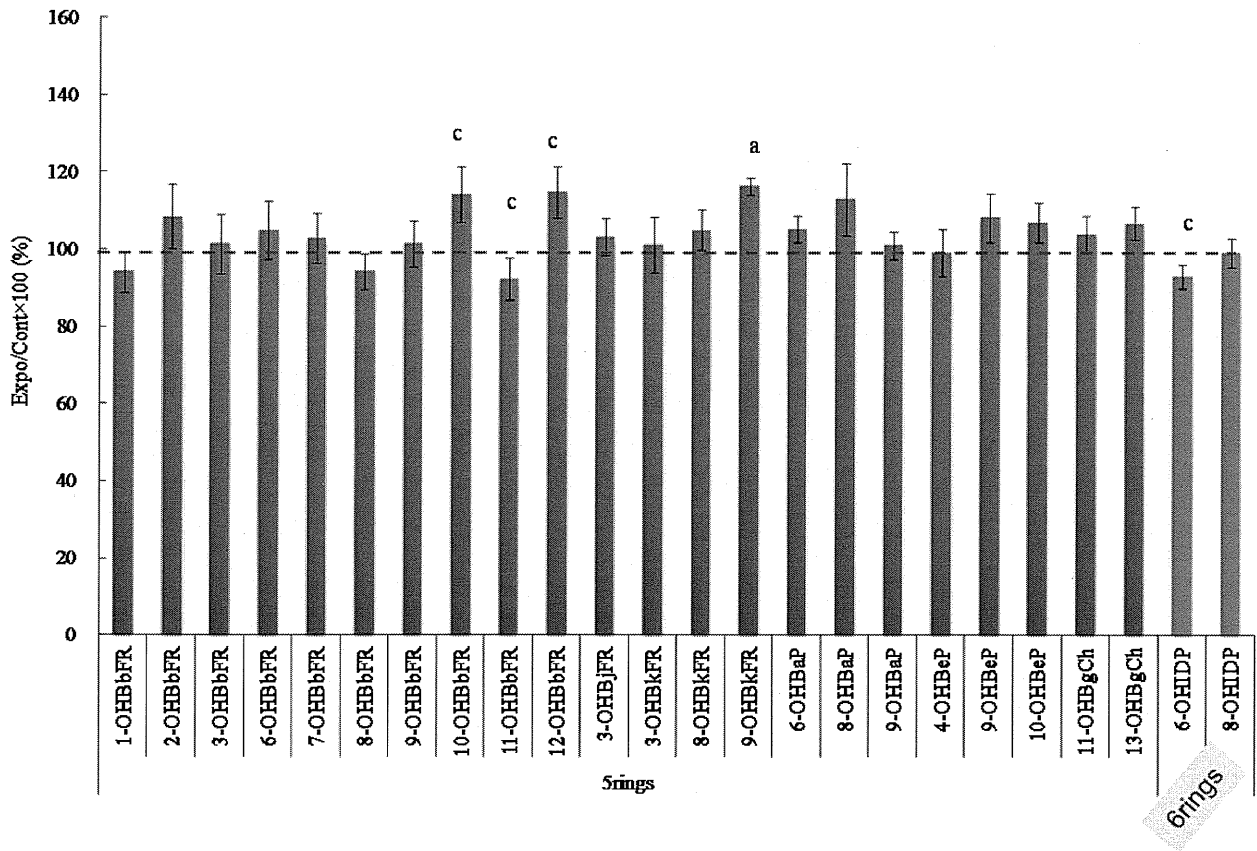


Fig.8 Effect of 5- and 6-OHPAHs ( $1 \times 10^{-10}$  M) on ALP activity.  
(a :  $P < 0.01$ , c :  $P < 0.20$ )



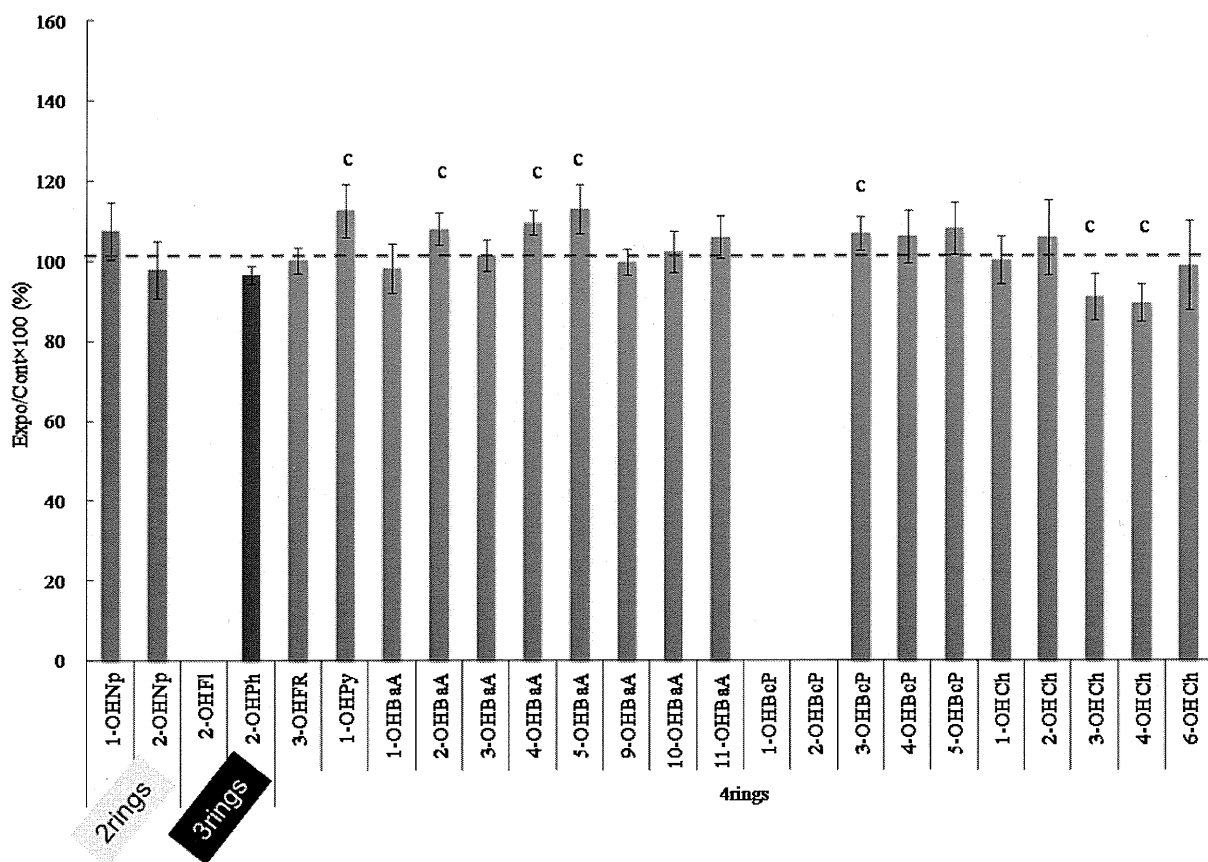


Fig.9 Effect of 2-, 3- and 4-OHPAHs ( $1 \times 10^{-8}$  M) on ALP activity.  
(c :  $P < 0.20$ )

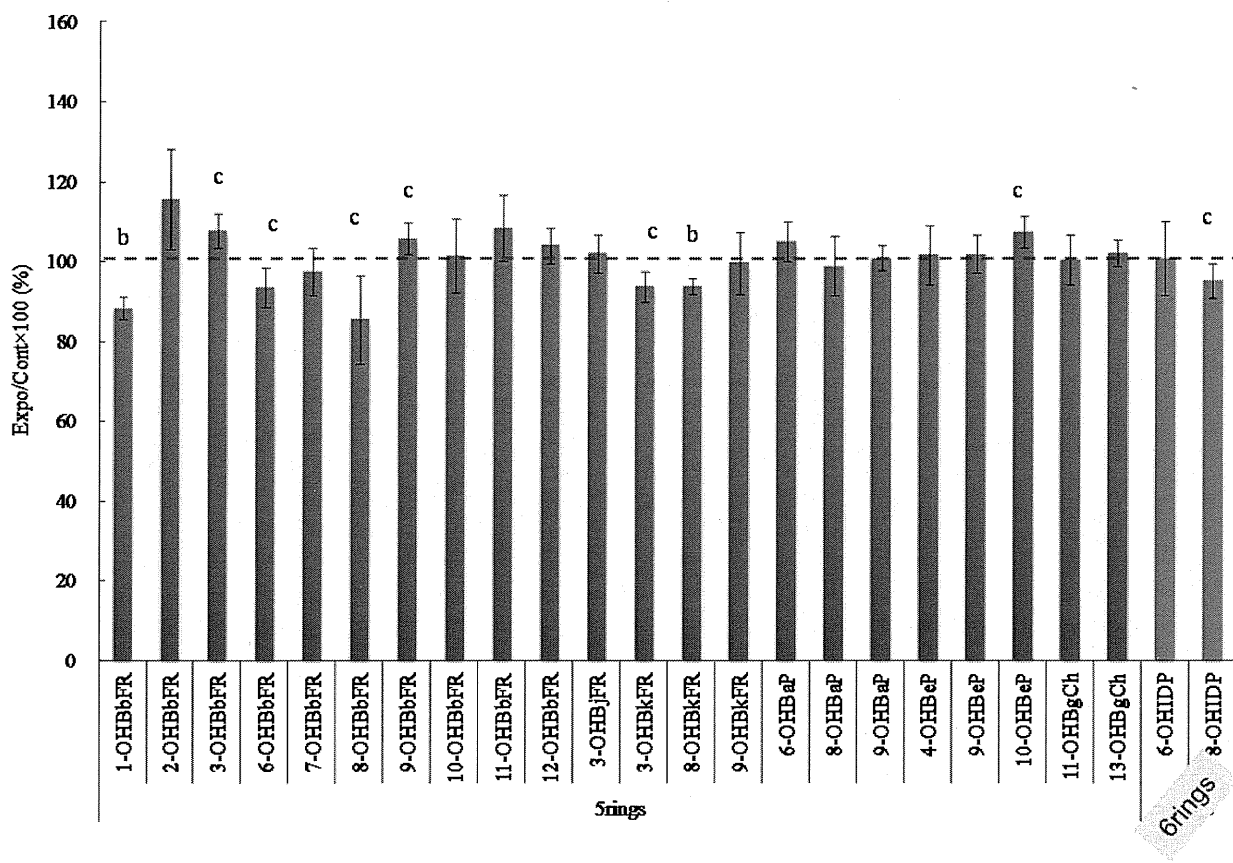


Fig.10 Effect of 5- and 6-OHPAHs ( $1 \times 10^{-8}$  M) on ALP activity.  
 (b:  $P < 0.05$ , c :  $P < 0.20$ )

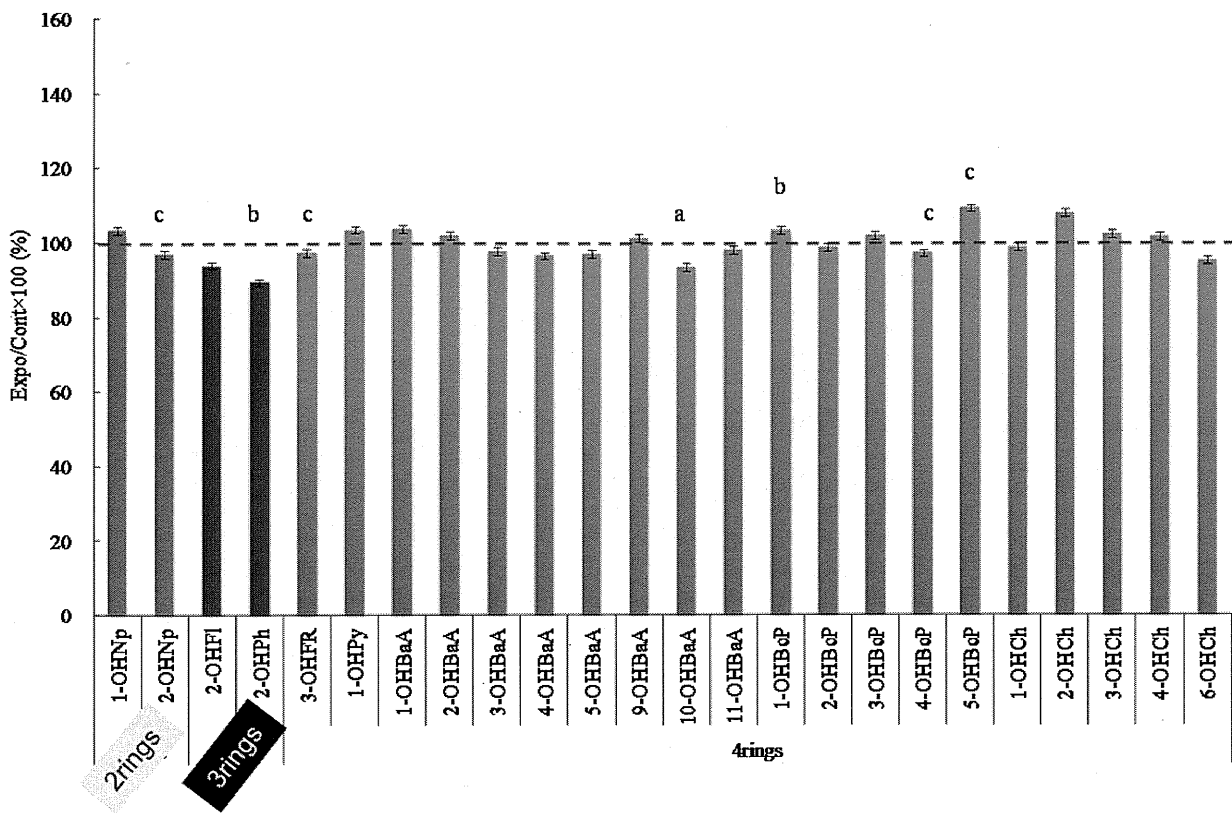


Fig.11 Effect of 2-, 3- and 4-OHPAHs ( $1 \times 10^{-6}$  M) on ALP activity.  
(a :  $P < 0.01$ , b :  $P < 0.05$ , c :  $P < 0.20$ )

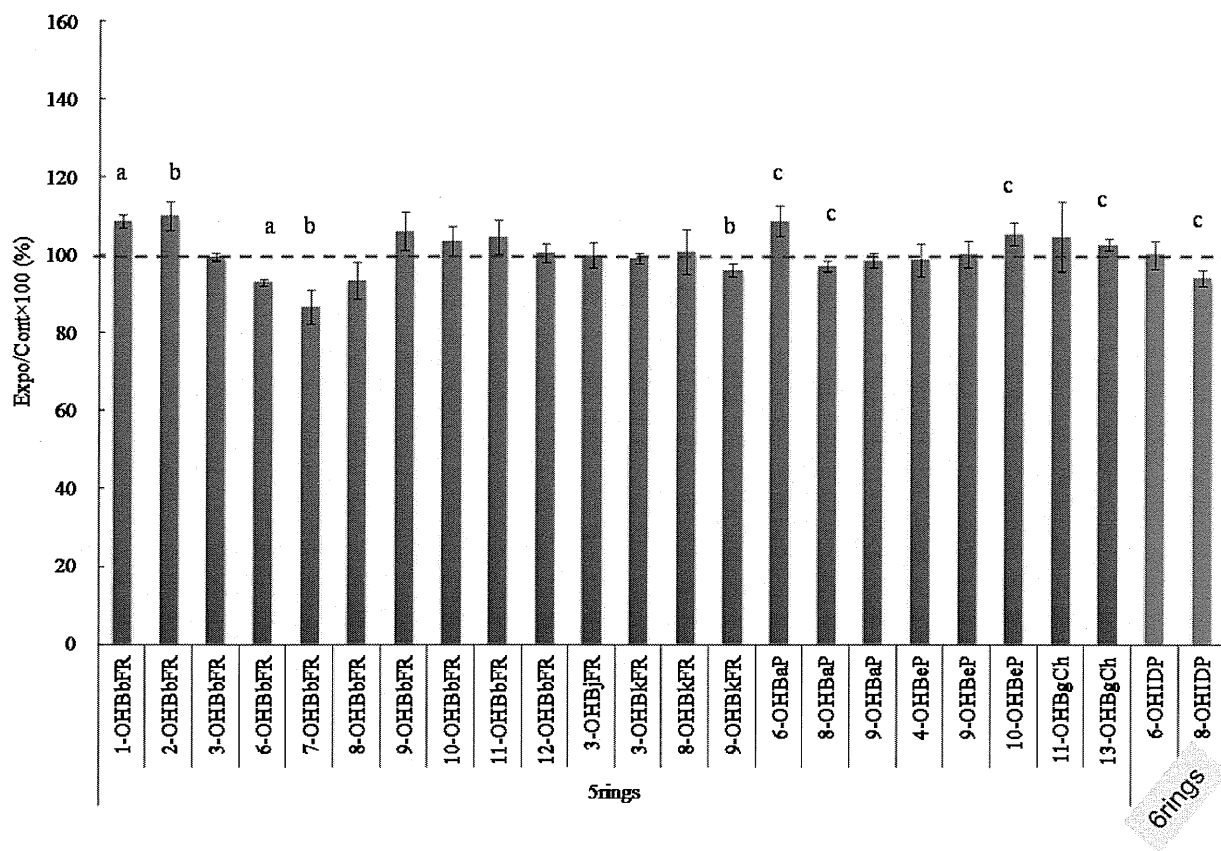


Fig.12 Effect of 5- and 6-OHPAHs ( $1 \times 10^{-6}$  M) on ALP activity.  
(a :  $P < 0.01$ , b :  $P < 0.05$ , c :  $P < 0.20$ )