

Table 2 Structures, activities and parameters

No	Structure	ID	Ring No.	RD <sub>1</sub> -V10 *	RD <sub>2</sub> %	RSA	delta moment (kcal)	electron affinity (eV)	heat of formation (kcal/mol)	ionization potential (eV)	log P	polarizability (Å <sup>3</sup> )	stiffness and volume (Å <sup>3</sup> )	charge density (kcal/mol Å <sup>3</sup> )	density (g/cm <sup>3</sup> )	density (L/mol)	electrostatic potential (kcal/mol)	molar weight (g/mol)	radius (Å)	L/S ratio	Q-11 Distance		
1		12-HO	2	<0.01	0	0.94	6.957	-0.416	10.398	-9.921	1.457	18.485	C9	0.384	0	0.114	0.047	0.225	0.138	1.246	7.354	O12-H14	
2		4-AG	3	<0.01	0	0.11	6.746	-0.568	10.885	-9.581	1.761	21.68	C11	0.404	0.001	0.022	0.041	0.141	0.091	1.064	6.926	O14-H16	
3		14-PO	3	<0.01	0.65	0.78	2.393	-0.228	24.334	-9.285	2.459	25.356	C11	0.506	0.002	0.109	0.004	0.216	0.11	1.367	8.398	O15-H17	
4		8-10-PO	3	<0.01	0	0.01	6.883	-0.573	20.297	-9.587	2.459	25.286	C9	0.384	0	0.12	0.028	0.235	0.131	1.367	7.351	O16-H19	
5		14-AG	3	<0.01	0	0.72	3.331	-0.341	22.137	-9.368	2.459	25.602	C11	0.504	0.001	0.113	0.002	0.211	0.106	1.425	8.066	O15-H18	
6		8-10-AG	3	<0.01	0	0.14	0	-0.819	9.42	-10.272	2.459	24.76	O7	0.509	0	0.112	0.004	0.218	0.111	1.439	6.024	O15-H18	
7		13-AG	4	<0.01	0	0.13	0.703	-0.593	31.467	-9.151	3.462	32.412	C10	0.516	0.002	0.103	0.003	0.199	0.101	1.652	8.343	O20-H28	
8		8aH-14-O	4	<0.01	0	1.07	2.652	-0.415	51.197	-8.969	3.462	32.544	C18	0.499	0.001	0.106	0.001	0.205	0.104	1.126	9.981	O19-H26	
9		8aH9-O	4	<0.01	0.75	0.33	7.273	-0.534	47.25	-9.975	3.462	32.79	C12	0.384	0	0.09	0.007	0.178	0.092	1.108	8.296	O20-H24	
10		13-CO	4	<0.01	0	0.93	8.018	-0.44	48.589	-9.043	3.462	34.270	C17	0.385	0	0.092	0.006	0.179	0.093	1.805	11.693	O20-H22	
11		14-CO	4	<0.01	0.87	1.03	3.022	-0.257	41.083	-9.027	3.462	33.094	C15	0.509	0.002	0.11	0.003	0.214	0.108	1.624	10.259	O19-H22	
12		38-CO	4	<0.01	0.87	0.81	6.681	-0.569	41.938	-9.076	3.462	33.086	C8	0.392	0.003	0.105	0.012	0.204	0.108	1.661	8.51	O19-H29	
13		8aH-18-O	5	<0.01	0.65	0.56	1.968	2.735	44.968	-9.185	3.782	37.547	C20	0.535	0.002	0.046	0.004	0.091	0.047	1.517	10.286	O21-H24	
14		8aH-28-O	5	<0.01	2.5	0	8.64	7.119	-0.559	45.938	-9.086	3.782	37.732	C18	0.53	0.002	0.046	0.004	0.092	0.048	1.549	10.765	O22-H24
15		8aH-45-O	5	<0.01	0.63	0.21	7.436	-0.685	48.218	-9.587	3.782	36.914	C19	0.39	0.001	0.118	0.007	0.178	0.093	1.465	9.678	O22-H23	
16		8aH-9-18-O	5	<0.01	0	-	1.372	-0.578	46.523	-9.25	3.782	36.609	C13	0.537	0.002	0.054	0.004	0.107	0.056	1.429	8.408	O21-H24	
17		8aH-18-O	5	0.2	0.6	0.66	8.53	-0.484	60.102	-8.531	3.782	39.554	C19	0.39	0.001	0.072	0.004	0.137	0.07	1.577	11.563	O22-H29	
18		8aH-11-18-O	5	<0.01	0.5	0.35	4.073	-0.315	51.682	-8.608	3.782	37.521	C17	0.518	0.003	0.097	0.006	0.178	0.092	1.472	10.192	O22-H29	
19		8aH-11-18-O	5	<0.01	0.45	0.18	6.955	-0.614	53.676	-8.717	3.782	37.307	C20	0.398	0.003	0.004	0.009	0.169	0.089	1.479	8.52	O22-H24	
20		8-Ph	3	<0.01	0	0.29	3.775	-0.655	32.465	-9.377	2.906	22.743	C7	0.553	0	0.136	0.004	0.247	0.125	1.449	6.228	O8-H16	
21		4-Ph	3	<0.01	0	0.26	4.039	-0.853	10.729	-9.593	3.302	24.043	C10	0.571	0	0.162	0.006	0.286	0.146	1.510	6.072	O15-H17	
22		1-OH-Ph-8-10-Ph	3	<0.01	0	-	4.216	-0.728	-7.369	-9.345	2.621	23.68	C7	0.585	0	0.098	0.003	0.193	0.093	1.442	8.098	O15-H18	
23		2-OH-Ph-8-10-Ph	3	<0.01	0.05	-	4.915	-0.78	-8.144	-9.067	2.621	24.076	C7	0.541	0	0.151	0.001	0.27	0.138	1.549	9.366	O15-H17	
24		8aH	4	<0.01	0	0.25	4.573	-0.214	48.824	-8.794	3.918	30.336	C7	0.557	0.002	0.085	0.004	0.128	0.066	1.229	7.346	O15-H27	
25		8aH-11-10-Ph	4	<0.01	0	0.48	3.073	-0.797	44.896	-8.119	3.691	33.54	C18	0.583	0.003	0.032	0.006	0.086	0.036	1.590	7.921	O19-H21	
26		8aH-11-10-Ph	4	<0.01	0	-	4.456	-0.977	-11.507	-8.765	4.061	31.921	C6	0.578	0	0.123	0.002	0.185	0.093	1.494	8.531	O19-H22	
27		8aH-7-10-Ph	5	<0.01	0	0.02	3.136	-0.881	49.464	-8.052	4.011	38.105	C3	0.576	0	0.001	0	0.033	0.017	1.494	10.222	O21-H32	
28		8aH-11-10-Ph	57	<0.01	0	0.17	3.528	-0.885	52.651	-8.64	3.908	30.392	C7	0.563	0.001	0.099	0.002	0.194	0.093	1.598	6.566	O8-H25	
29		8aH-11-10-Ph	57	<0.01	0	0.33	3.809	-0.898	52.22	-8.885	3.908	30.887	C7	0.556	0	0.141	0.002	0.157	0.079	1.702	8.354	O8-H26	

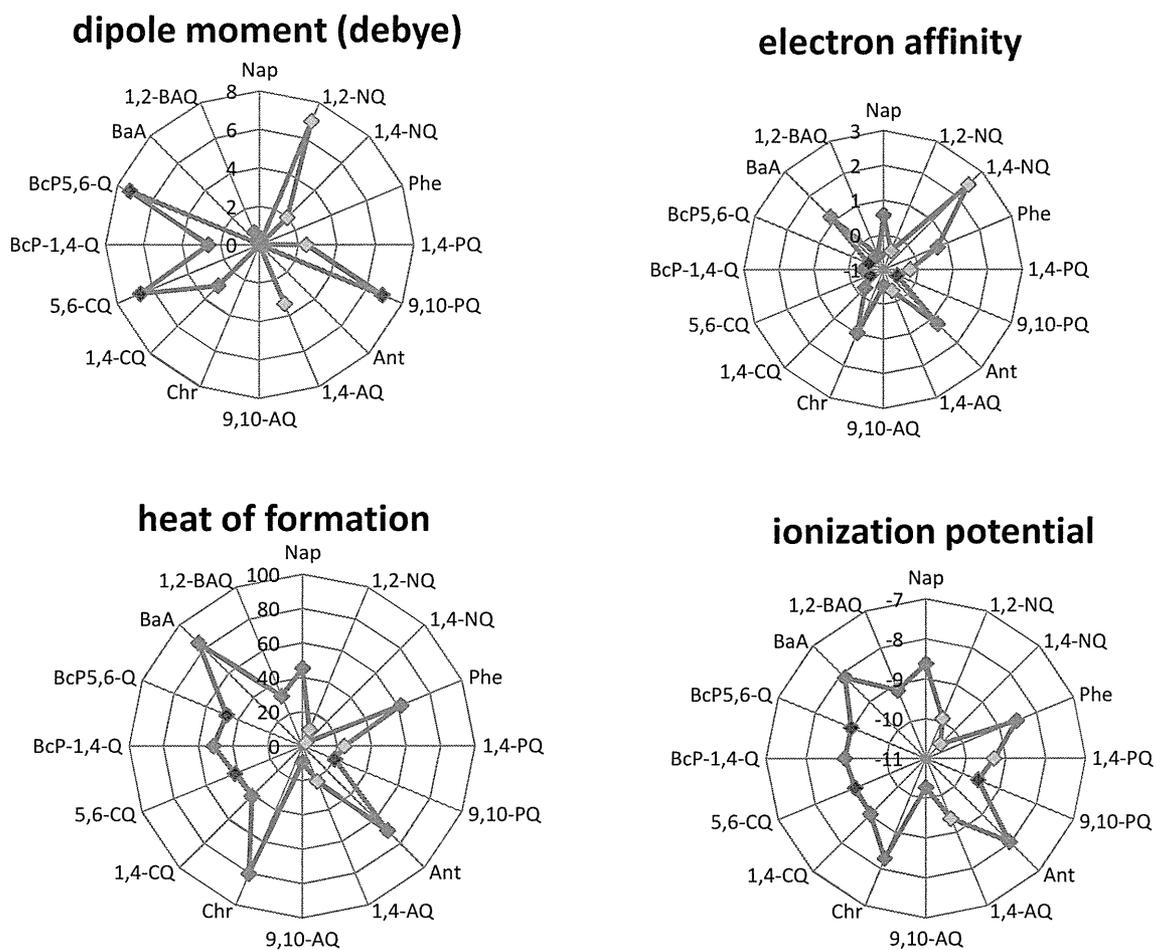


Fig . 1 Relationship between activities and parameters

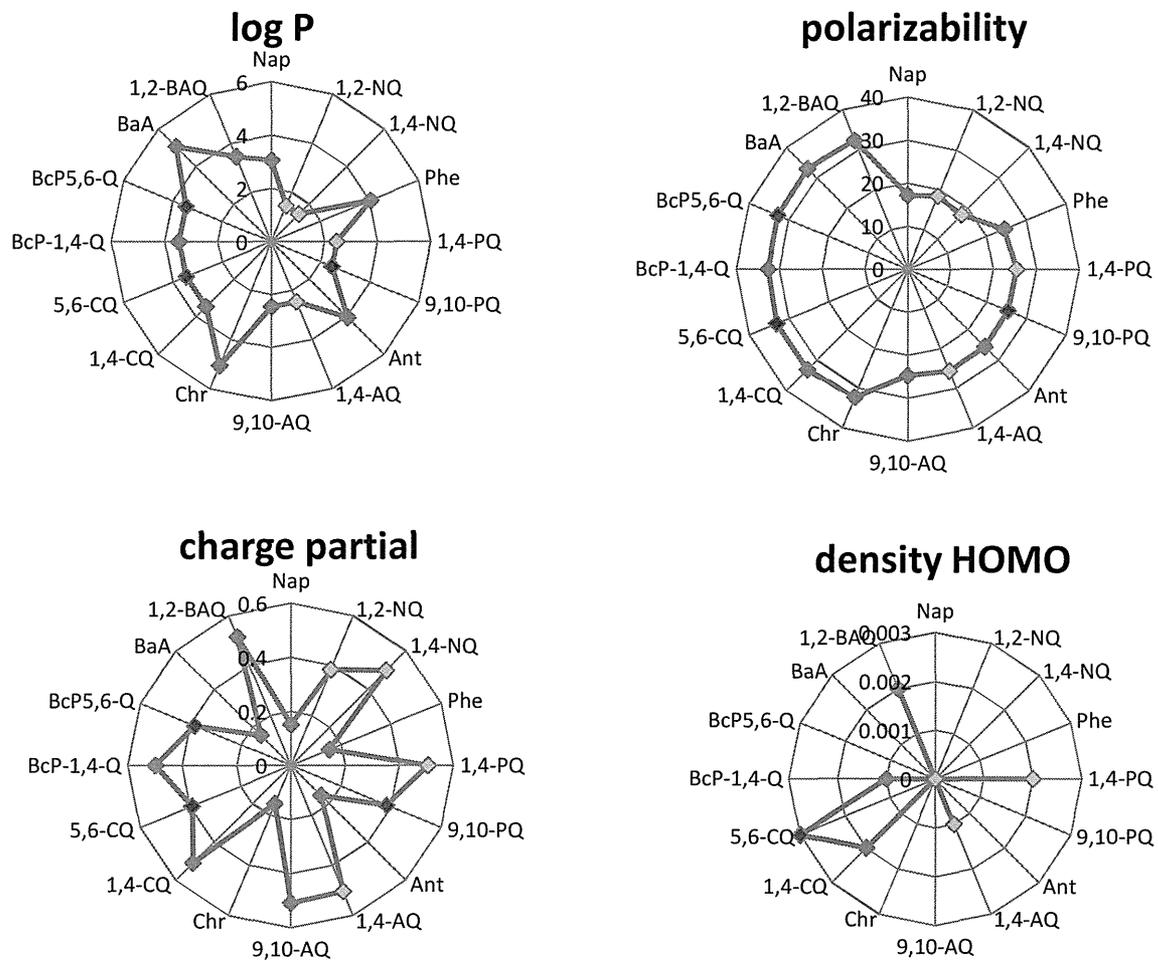


Fig . 2 Relationship between activities and parameters

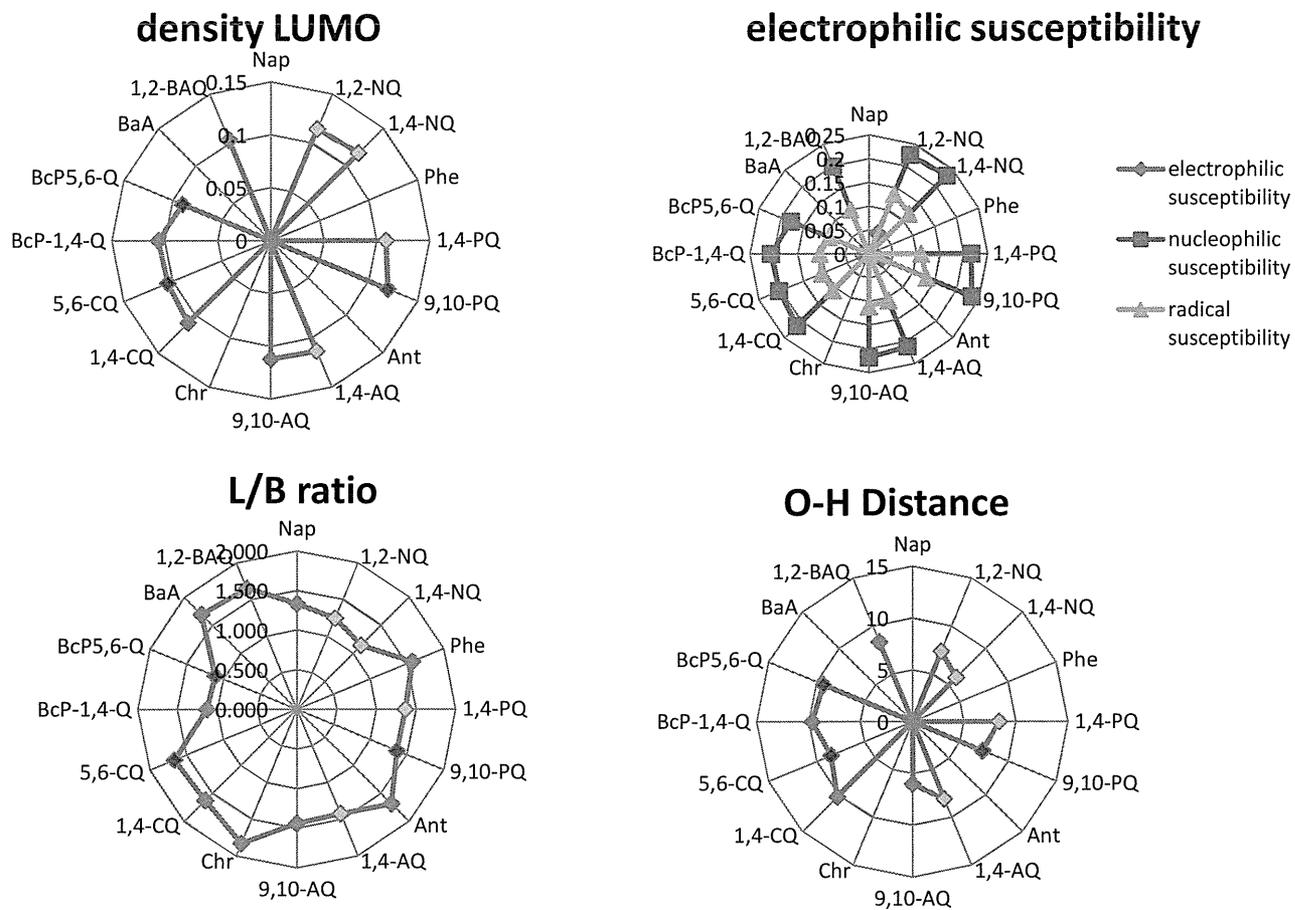
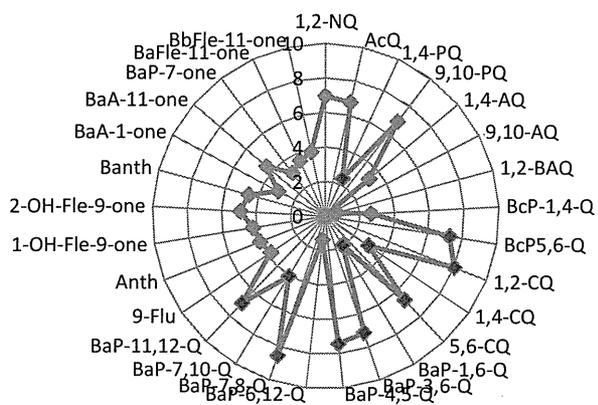
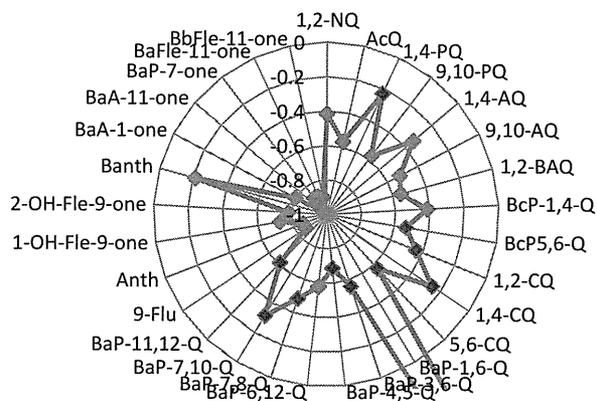


Fig . 3 Relationship between activities and parameters

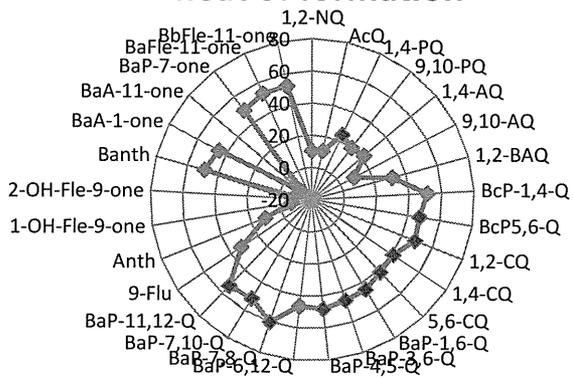
**dipole moment (debye)**



**electron affinity**



**heat of formation**



**ionization potential**

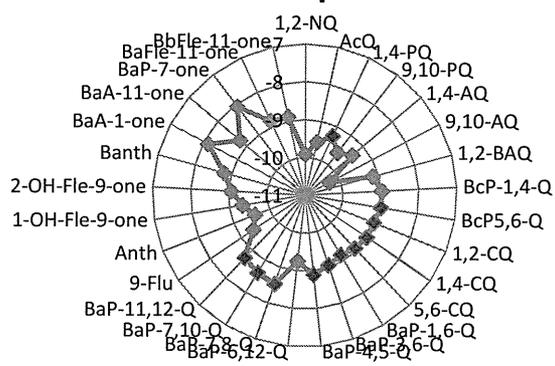


Fig . 4 Relationship between activities and parameters

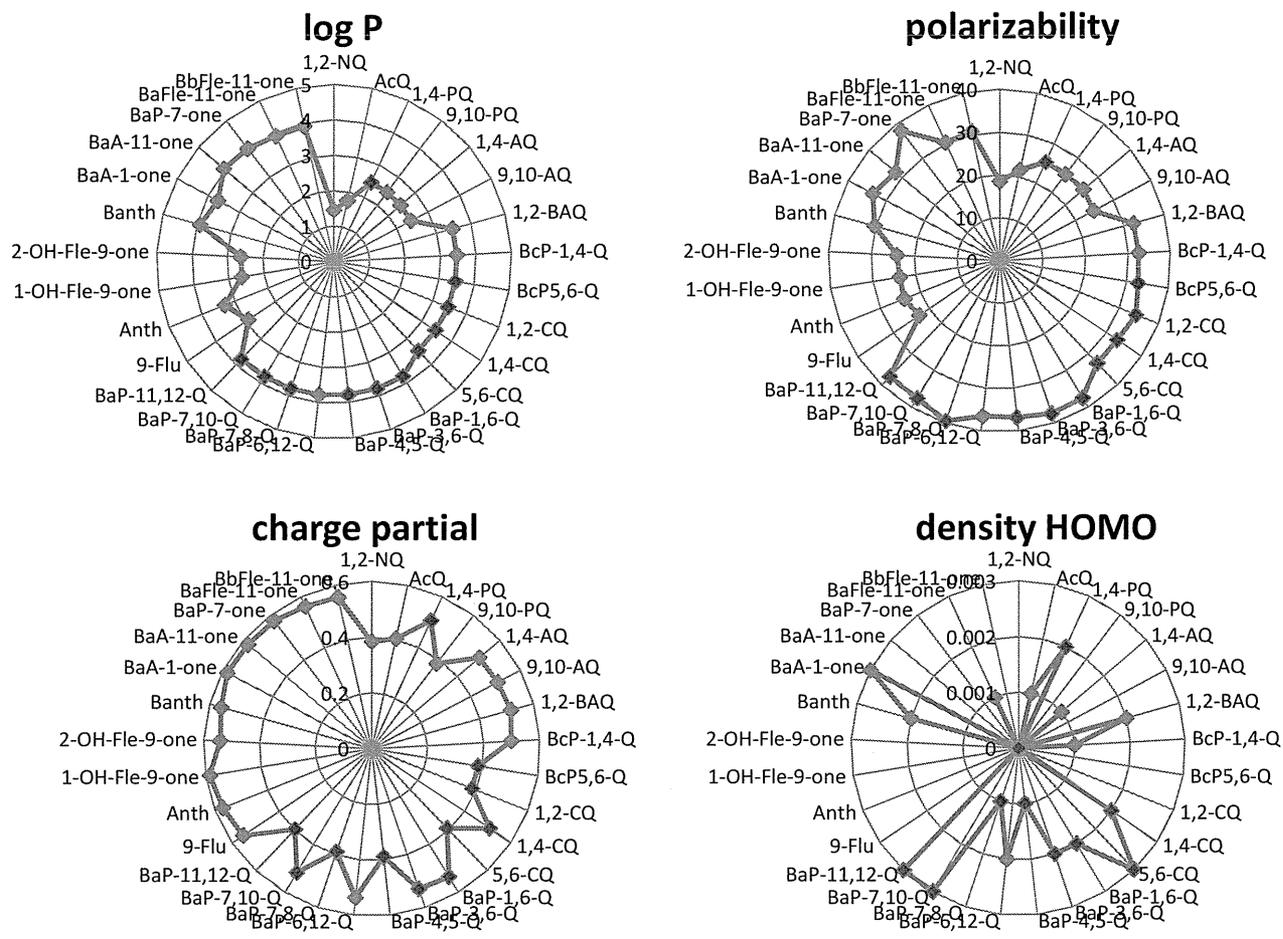


Fig . 5 Relationship between activities and parameters

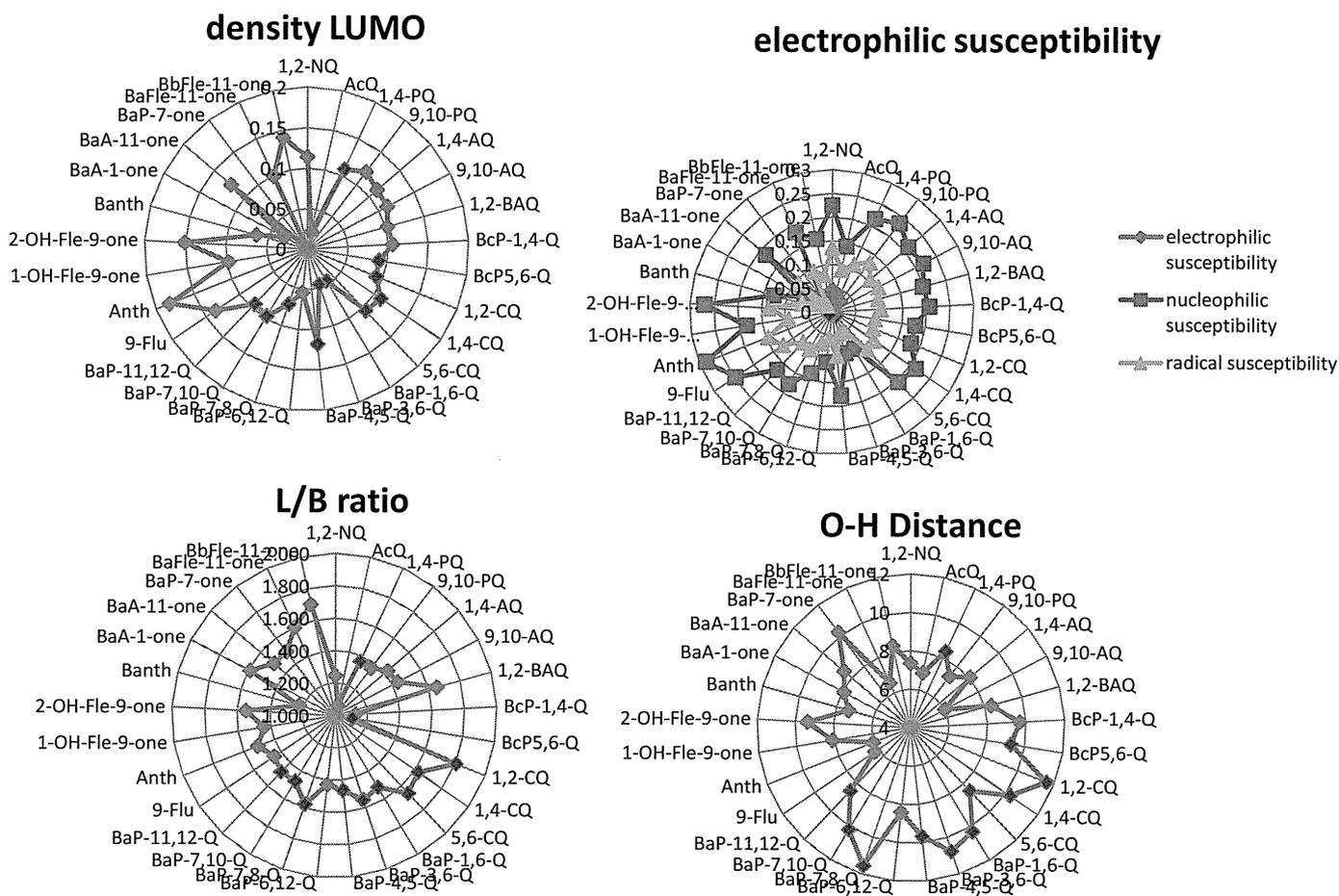


Fig . 6 Relationship between activities and parameters

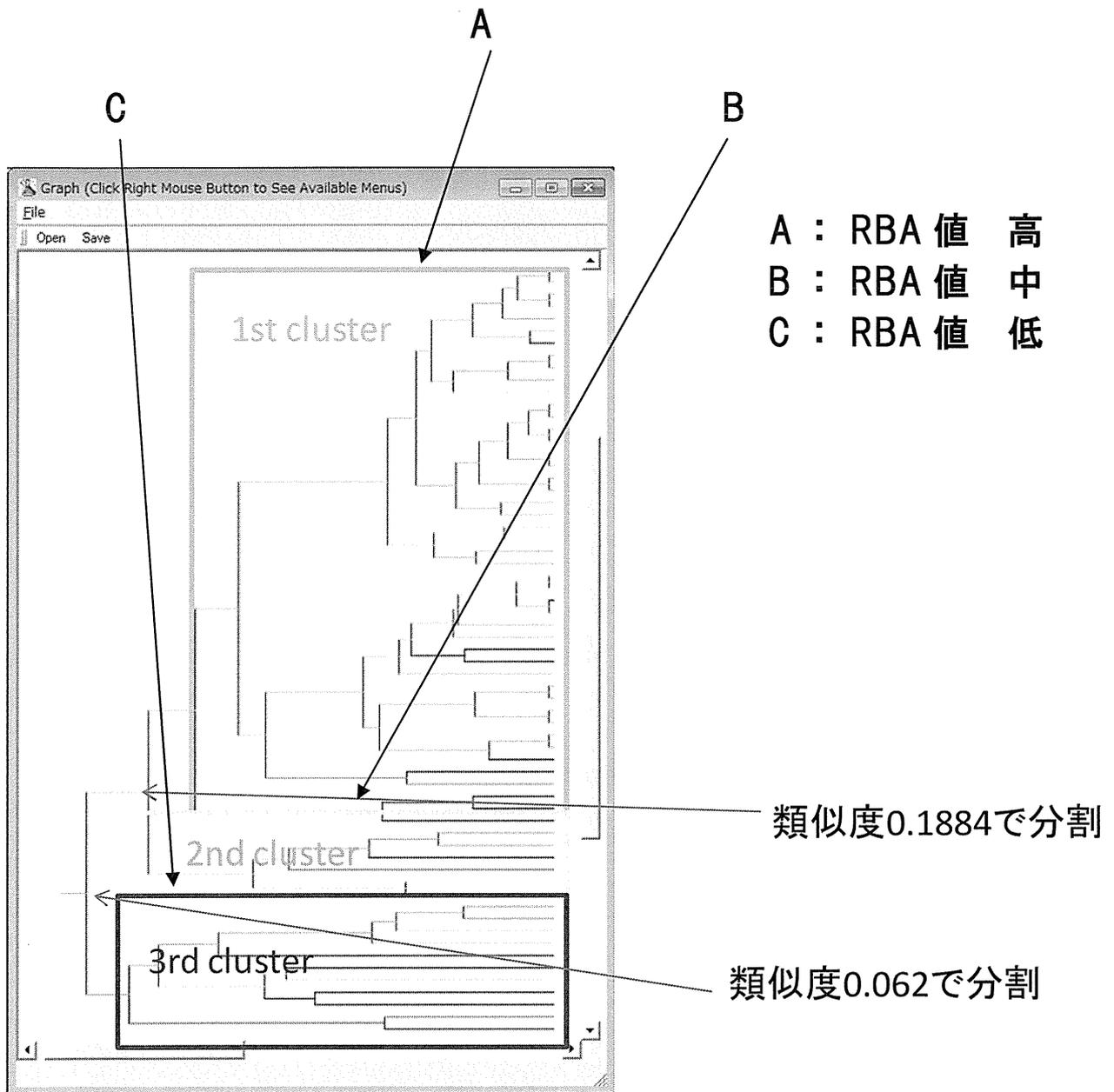
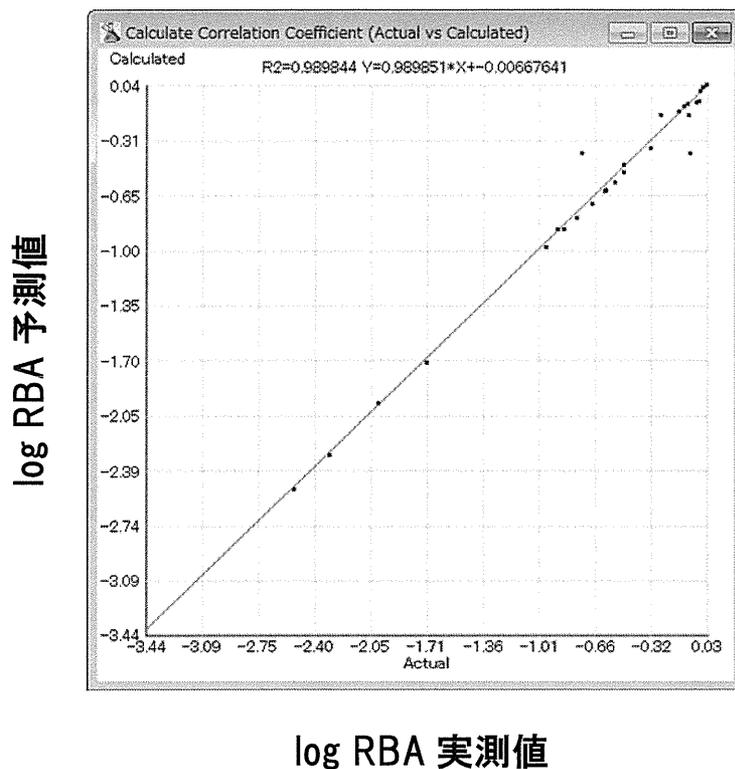


Fig. 7 Clustering of PHA compounds

Contribution は log RBA に対する係数  
 a)は係数が大きく、RBA 値を上げる方向  
 b)は係数が小さく、RBA 値を下げる方向に働く

	x-variable	structure	contribution	4	5
a)	1 #ac11		0.7285	str_12	str_24
	2 #ac5		0.7067	str_11	str_27
	3 #ac25		0.6868	str_2	str_17
	4 #ac3		0.5224	str_23	
	5 #ac6		0.6136	str_26	
	6 #ac8		0.6074	str_12	str_28
	7 #ac23		0.5975	str_5	str_19
	8 #ac24		0.5577	str_8	str_21
	9 #ac1		0.5229	str_23	str_30
	10 #ac16		0.2287	str_41	
	30 #ac30		-0.2061	str_53	
	21 #ac7		-1.0267	str_42	
	32 #ac18		-1.2895	str_6	str_20
	33 #ac15		-1.5160	str_15	
	24 #ac14		-1.8221	str_10	

Fig. 8 Fragment QSAR analysis



RBA 値が高く、数も多い最初のクラスターの分子群についてフラグメント QSAR 解析を行った。

log RBA 実測値に対して  
相関係数二乗  
 $R_2 = 0.990$   
の式を構築

Fig. 9 Fragment QSAR analysis

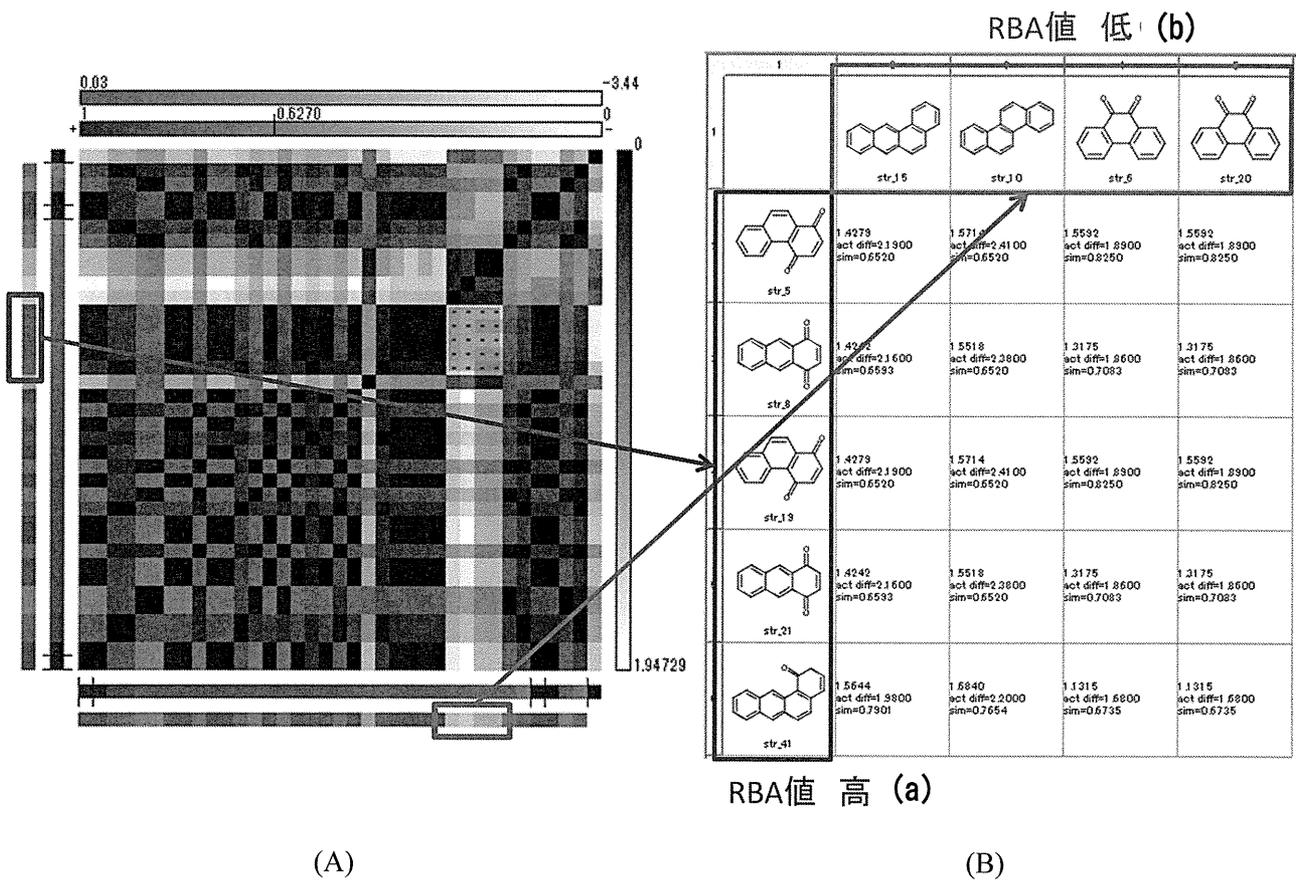


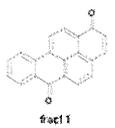
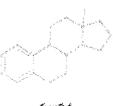
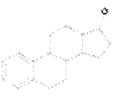
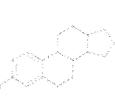
Fig. 10 Activity-Cliff analysis

Contribution は  $\log \text{REP}_E$  に対する係数

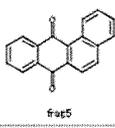
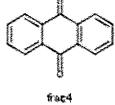
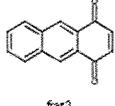
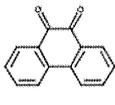
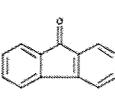
a) は係数が大きく、 $\text{REP}_E$  値を上げる方向

b) は係数が小さく、 $\text{REP}_E$  値を下げる方向に働く

a) ↑

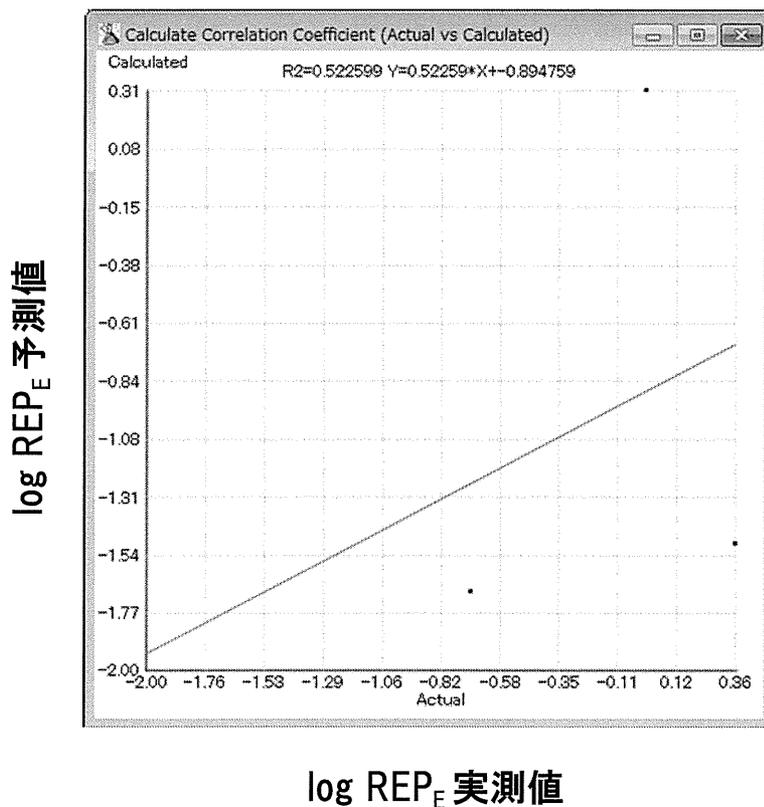
x-variable	structure	contribution	4	5
1 frac11	 frac11	0.4287	str_29	str_30
2 frac35	 frac35	0.3810	str_46	
3 frac34	 frac34	0.3810	str_46	
4 frac33	 frac33	0.3810	str_46	
5 frac32	 frac32	0.3810	str_46	

x-variable	structure	contribution	4	5
32 frac5	 frac5	-0.0511	str_23	str_16
33 frac4	 frac4	-0.0511	str_22	str_9
34 frac3	 frac3	-0.0511	str_21	str_8
35 frac2	 frac2	-0.0511	str_20	str_5
36 frac17	 frac17	-0.0767	str_36	str_38

↓ b)

Fig. 11 Fragment QSAR analysis



REP<sub>E</sub> の活性値を有する  
45 分子についてフラグメント QSAR 解析を行った。

log REP<sub>E</sub> 実測値に対して  
相関係数二乗  
 $R_2 = 0.523$   
の式を構築  
(実測値が少なく精度低)

Fig. 12 Fragment QSAR analysis

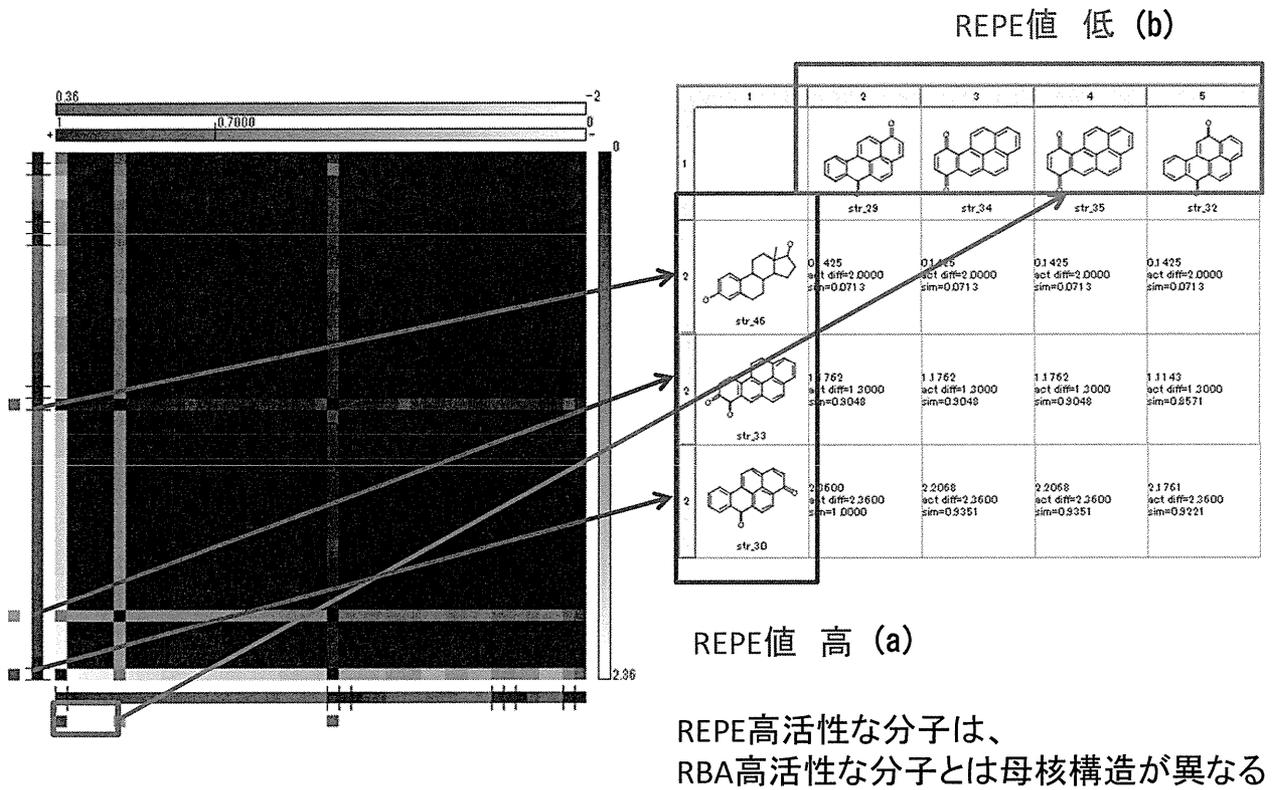


Fig. 13 Activity-Cliff analysis

Contribution は  $\log \text{REP}_{\text{EA}}$  に対する係数  
 a)は係数が大きく、 $\text{REP}_{\text{EA}}$  値を上げる方向  
 b)は係数が小さく、 $\text{REP}_{\text{EA}}$  値を下げる方向に働く

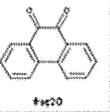
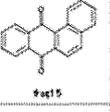
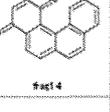
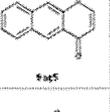
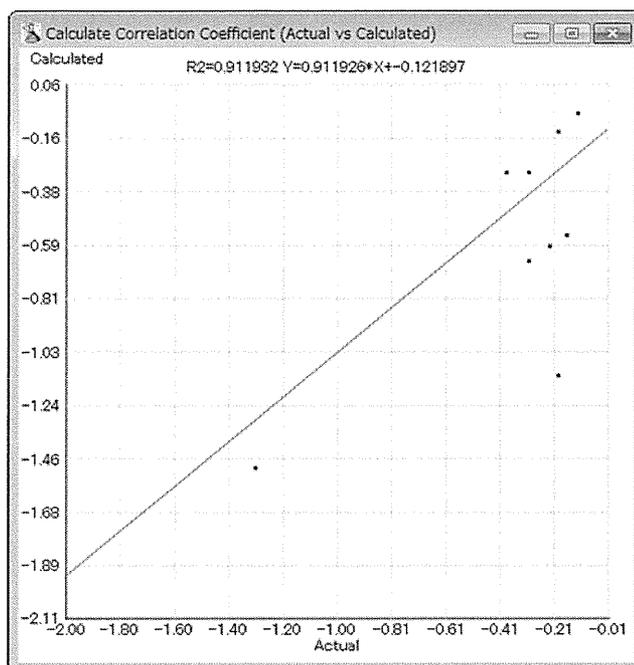
	x-variable	structure	contribution	4	5
a)	1 #ac20		1.5124	str,28	str,12
	2 #ac23		1.5124	str,11	str,27
	3 #ac28		1.0579	str,14	str,25
	4 #ac26		1.3223	str,13	str,5
	5 #ac22		1.1505	str,25	str,24
b)	26 #ac20		-0.6514	str,6	str,20
	27 #ac15		-0.6514	str,16	str,23
	28 #ac14		-0.6514	str,13	str,24
	29 #ac5		-0.6514	str,21	str,8
	30 #ac4		-0.6514	str,17	str,2

Fig. 14 Fragment QSAR analysis

log REP<sub>AE</sub> 予測値



log REP<sub>AE</sub> 実測値

数が多い最初のクラスターの分子群についてフラグメント QSAR 解析を行った。

log REP<sub>AE</sub> 実測値に対して、相関係数二乗  $R_2 = 0.912$  の式を構築

Fig. 15 Fragment QSAR analysis

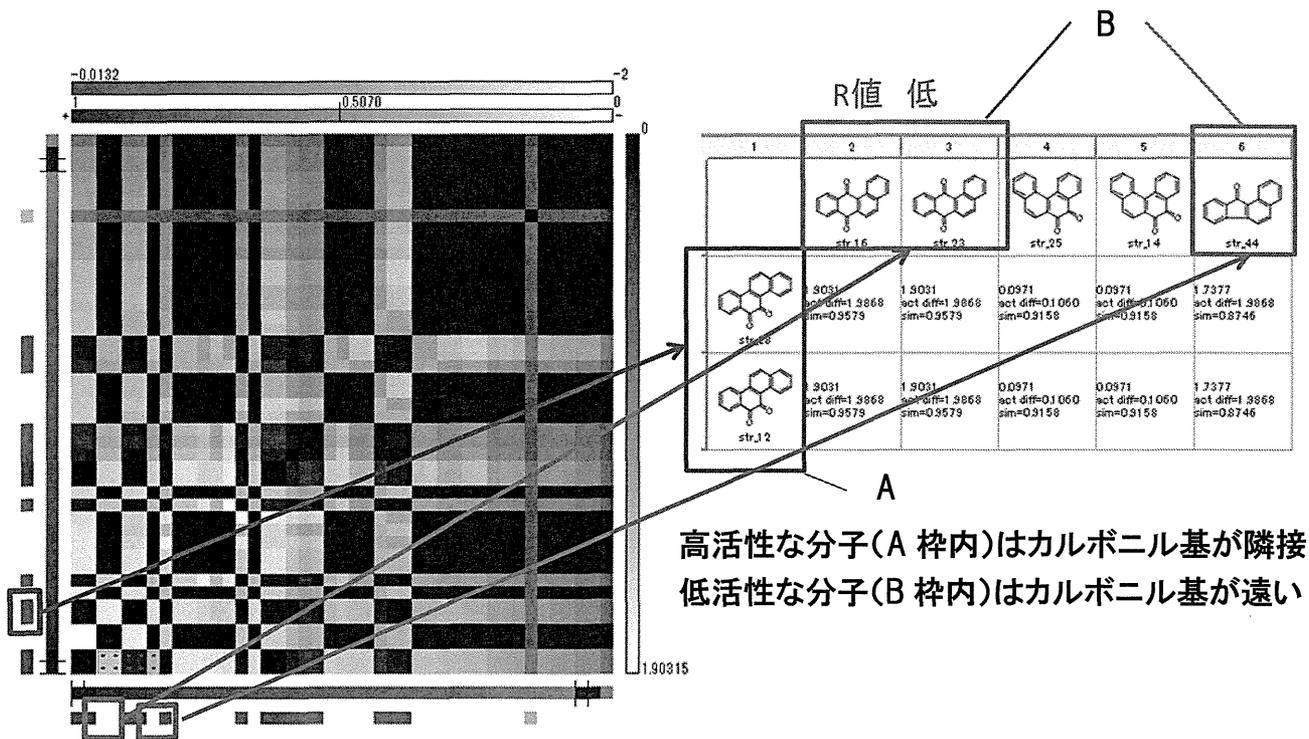


Fig. 16 Activity-Cliff analysis

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 24 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、初年度は再生ウロコを用いた高感度な *in vitro* 評価システムを構築した。続いて昨年度は、初年度開発した再生ウロコの高感度な評価システムを用いて、OHPAH 類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した結果、OHPAH 類が毒性の本体である可能性が高いことが示された。

以上のことから、最終年度は、*in vivo* における作用に注目して *in vitro* の評価系の再現性を確認した。①PAH 類をキンギョの腹腔内に投与して、ウロコの再生（骨形成）に対する影響を評価した。さらに OHPAH 類の毒性作用の再現性を他の魚類でも確認するために、②メダカの胚に PAH 類及び OHPAH 類を投与して、PAH 類と水酸化体との作用を比較した。その結果、*in vivo* においても *in vitro* の結果が再現され、OHPAH 類が毒性の本体である可能性が高いことが判明した。

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）。

内分泌かく乱化学物質 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リル炭化水素受容体 (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た。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と考えられた。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。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 (Yoshikubo et al., 2005; Thamamongood et al., 2012)、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 (Fig. 1)。再生ウロコは骨代謝が亢進している骨モデルである。そこで初年度は、この再生ウロコを用いた評価システムを開発した。続いて昨年度は、初年度開発した再生ウロコの高感度な評価システムを用いて、OHPAH 類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した結果、OHPAH 類が毒性の本体である可能性が高いことが示された。

以上のことから、最終年度は、*in vivo* における作用に注目して *in vitro* の評価系の再現性を確認した。①PAH 類をキンギョの腹腔内に投与して、ウロコの再生 (骨形成) に対する影響を

評価した。さらに OHPAH 類の毒性作用の再現性を他の魚類でも確認するために、②メダカの胚に PAH 類及び OHPAH 類を投与して、水酸化体との作用を比較した。

## B. 研究方法

### 1. 魚類のウロコの再生に対する OHPAH 類の影響 (*in vivo*)

#### 1-1. 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、体長約 8 cm の未成熟なキンギョ (8-10 g) を 12 個体 (東川養魚場、奈良県大和群山市より購入) 使用した。全ての実験内容は、金沢大学動物実験倫理規定に従った。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。

#### 1-2. 試験物質

昨年度、エストロゲン様活性を示した 4-Hydroxybenz[*a*]anthracene (4-OHBaA) の親化合物である Benz[*a*]anthracene (BaA) (Fig. 2) を試験物質として用いた。また、BaA の比較対象として、酵母 two-hybrid 法において強い抗エストロゲン作用を示した 3-Hydroxybenzo[*c*]phenanthrene (3-OHBcP) の親化合物である Benzo[*c*]phenanthrene (BcP) (Fig. 2) も試験物質として用いて、キンギョに投与した。

また、試験物質の濃度は、日本海重油汚染事故に伴う海洋中の BaP 濃度が約  $10^{-11}$  M であったこと、またアイナメの可食組織の BaP 濃度が 0.13 ng/g であったこと (Hayakawa et al., 2006) を参考として、キンギョの体内濃度が 0.1 ng/g body weight (BW) となるように BaA および BcP を投与した。

#### 1-3. ウロコの抜去と採取及びキンギョの腹腔

#### 内への投与

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で麻酔後、ピンセットを用いて側線鱗の上及び下 2 行 (lineB-C) より左右対称に各列 (No. 1-18) 18 枚ずつ普通ウロコを抜去した (Fig. 3)。このとき、頭側と尾側の両側 2 列 (No. 1 and 18 in Fig. 3) 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可能性があることが予備実験で分かっていたため、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。

採取したウロコは乾燥を防ぐ為、抗生剤入り L-15 培地 50  $\mu$ l ずつをあらかじめ各ウエルに入れてある 96 穴マイクロプレートに入れた。その後、L-15 培地を除去して、各ウエルに生食水 100  $\mu$ l ずつ加えて洗浄した。ウエルの生食水を除去し、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  $\mu$ l ずつ加えて、96 穴マイクロプレートを  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結・保存した。

次に、ウロコを抜いたキンギョの腹腔内に BaA 及び BcP をそれぞれ 0.1 ng/g、3 日おきに投与し、 $25^{\circ}\text{C}$  でキンギョを飼育して、ウロコ再生段階で一番細胞活性が盛んな時期である 12 日目と、ウロコの石灰化が進んで、骨芽細胞の活性が低下する 18 日目に再生ウロコを採取した。対照群として vehicle control (エタノール) をキンギョに投与して同様に再生ウロコを採取した。

18 日目の再生ウロコを採取した後、BaA および BcP が代謝され、4-OHBaA、3-OHBcP 等の代謝物がキンギョの体内で生じているかを調べるため、胆汁も採取した。

#### 1-4. 骨芽細胞活性の吸光度の測定

$-80^{\circ}\text{C}$  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