

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。ウエル内をピペッティングで攪拌後、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。

1-5. 破骨細胞活性の吸光度の測定

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。

1-6. 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 (mm^2) に換算した。

1-7. ウロコの骨芽細胞および破骨細胞活性

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標準曲線を用いて 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 (mm^2 scale) で生じた p-ニトロフェノール量を単位時間 (h) \cdot 単位面積 (mm^2) で除して、酵素活性 (nmol pNP produced / (mm^2 scale \times h)) とした。

1-8. ウロコの再生率算出法

ウロコの再生率は、上記した方法で再生ウロコ一枚当りの面積を測定した後、再生前のウロコと比較して再生率を算出した。さらに、再生前のウロコ及び再生ウロコの骨芽及び破骨細胞活性を測定して、BaA 及び BcP の影響を比較した。

1-9. 統計処理

ウロコの再生率は、再生前のウロコの面積に対する再生後のウロコの面積の割合 (%) \pm 標準誤差 (Standard Error of Mean : SEM) の形で表した。また、骨芽細胞及び破骨細胞活性は、再生前のウロコの細胞活性に対する再生後のウロコの細胞活性の割合 (%) \pm SEM の形で表した。対照群と実験群のウロコの影響比較は、まず等分散であるか否かを調べる為、F 検定を行った後、平均値の差の検定を t 検定で行った。なお危険率 5 % 未満を統計学的有意水準とした。

1-10. 胆汁の分析 (試料調整)

採取したキンギョ 2 匹分の胆のうをすりつぶし、それを Acetate buffer (0.5 M, pH5) で懸濁し、その後、1,4-ジチオエリトリール

(1,4-Dithioerythritol : DTE) (5×10^{-3} M, 60 μ l)、 β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ (130200/709 unit/ml) 20 μ l を添加し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。その後、内部標準物質 (6-Hydroxychrysene-13C6 : 6-OHCh-13C6) 10 μ l を添加した。次に、ブルーレイオン (BR) を 15 mg 加え、3 時間インキュベートした。その後、マニーホールド上で、BR を 3 ml の水で洗浄し、BR を乾燥させ、その上にメタノール (MeOH) /アンモニア (NH₃) を 50:1 の量で加え、30 分間超音波抽出を行った後、BR から抽出液を絞り、他の遠沈管に移した。さらに BR を 5 ml の MeOH/NH₃ (50:1) で洗いこみ、DTE (10^{-6} M, 10 μ l) を添加後、遠心エバポレーターで乾固させ、900 μ l MeOH/NH₃ (50:1) に再溶解しバイアル瓶に移し、遠心エバポレーターで再び乾固させた。

1-11. 誘導体化

前項で調製した試料をトルエン 100 μ l に再溶解し、N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% Trimethylchlorosilane (TMCS) 試薬 20 μ l を添加した後、ピリジン 5 μ l を添加し、80 $^{\circ}$ C、30 分間誘導体化し、GC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

2. PAH 類と OHPAH 類のメダカの受精卵に対する影響

2-1. 試験物質

試験物質は、キンギョの *in vivo* 解析で得られた作用と比較する為、4-OHBaA 及び 3-OHBcP 及びそれらの親化合物である BaA 及び BcP とした。

各々の試薬はアセトンに溶かし、 10^{-8} M まで希釈した後、トリオレインを等量加え、よく攪拌した。次に、窒素ガスでアセトンを完全に乾固させた後、トリオレインで 10^{-8} M から 10^{-10} M まで段階的に希釈し、実験するまで -20 $^{\circ}$ C で

保存した。

2-2. メダカとその卵の回収

メダカは縦 30 cm \times 横 60 cm \times 高さ 36 cm の水槽で飼育し、ヒーターを用いて水温を 22 ± 1 $^{\circ}$ C に保ち、産卵期には水温を 25 $^{\circ}$ C に上げた。飼育水は 0.1%の人工海水を用いた。連続した 16:8 h (明 : 暗) の光周期下で、餌として孵化して 24 時間以内のブラインシュリンプ幼生 (*Artemia nauplii*) を 1 日 2 回与えて飼育した。

メダカの卵はメスの腹部から取り外し、実体顕微鏡で観察して正常な受精卵だけを選び、0.9%過酸化水素水で簡単に消毒をした後、ERM (人工培地) におき、インジェクションするまで 3 時間 25 $^{\circ}$ C で保存した。

2-3 マイクロキャピラリーの作製

まず、長さ 10 cm, 外径 1.0 mm, 内径 0.58 mm のアルミノシリケートキャピラリーカラム (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) を微小電極プラー (PN-30; Narishige, Tokyo, Japan) を用いて切断した。切断したキャピラリーカラムは、先端が折れやすい為、ニードルホルダーに装着し、実体顕微鏡で観察しながら、先端径 8 ~ 10 μ m になるように、ピンセットを用いて調節した。次に、耐久性を上げて目づまりを減らすため、シリコン処理を施し、一晚乾燥させた後、傾斜機 (EG-40; Narishige, Tokyo, Japan) を用いてキャピラリーカラムの先端に 30 $^{\circ}$ の斜角をつけた。このキャピラリーカラムにマイクロローディングフェムトチップ (Eppendorf, Madison, WI, USA) で蒸留水を注入して洗浄し、一晚乾燥させた。その後、再度マイクロローディングフェムトチップ (Eppendorf, Madison, WI, USA) を用いて PAH をキャピラリーカラムに付加した後、使用するまで保存した。

2-4. メダカの卵へのナノインジェクション法

受精後 8 時間の卵を、固化している 2%のアガロースの 3~4 mm の厚い層に移し、油滴がある植物極側を上にして、卵の油滴にフェムトジェット (Eppendorf, Netheler, Hinz, Hamburg, Germany) と、マイクロマニピュレーター (MN-151; Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、 10^{-10} M、 10^{-9} M、 10^{-8} M の BaA 及び BcP を各々 0.5 nl ずつ投与した。一方対照群には、PAH 無添加のトリオレイン (vehicle control) を投与した。投与後の卵は ERM (人工培地) に入れ、27°C で培養し、定期的に実体顕微鏡で卵を観察した。

C. 結果

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

1-1. 各投与群の 12 日目のウロコの再生率と骨芽細胞及び破骨細胞活性

BaA 及び BcP を投与後 12 日目の再生ウロコを再生前のウロコと比較した結果を Fig. 4 (A) に示す。12 日目の再生ウロコが、両投与群ともに対照群と比較して、ウロコの再生が抑制される傾向を示し、特に、BcP 投与がウロコの再生を有意に抑制した。さらに、12 日目の再生ウロコの骨芽細胞活性を再生前のウロコと比較した結果を Fig. 4 (B) に、破骨細胞活性を測定した結果を Fig. 4 (C) に示す。骨芽細胞活性は両投与群共に対照群と比較して変化がみられなかったのに対し、破骨細胞活性は両投与群ともに対照群と比較して、活性が有意に上昇した。

1-2. 各投与群の 18 日目のウロコの再生率と骨芽細胞及び破骨細胞活性

BaA 及び BcP を投与後 18 日目の再生ウロコを再生前のウロコと比較した結果を Fig. 5 (A) に示す。18 日目の再生ウロコの再生率は、両投与群ともに対照群と比較して、変化がみられなかった。さらに、18 日目の再生ウロコの骨芽細胞

活性を再生前のウロコと比較した結果を Fig. 5 (B) に、破骨細胞活性を測定した結果を Fig. 5 (C) に示す。骨芽細胞活性は両投与群共に対照群と比較して上昇傾向を示した。一方、破骨細胞活性は BaA 投与群は対照群と比較して変化がみられなかったが、BcP 投与群は上昇傾向を示した。

1-2. キンギョの腹腔内に BaA 及び BcP を投与した時の胆汁中の代謝物の測定

BaA を投与したキンギョの胆汁中から検出された代謝物のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。この図から明らかなように、4-OHBaA を同定することが出来た。一方、BcP を投与したキンギョの胆汁中からも、3-OHBcP、4-Hydroxybenzo[c]phenanthrene (4-OHBcP)、5-Hydroxybenzo[c]phenanthrene (5-OHBcP) が検出され、定量することが出来た (Fig. 7)。それぞれの定量値は、3-OHBcP が 7.4×10^{-10} M、4-OHBcP が 5.8×10^{-10} M、5-OHBcP が 8.9×10^{-10} M となった。

2. PAH 類と OHPAH 類のメダカの受精卵に対する影響

2-1. 致死率

卵の致死率は、親化合物及び水酸化体の両投与群共に対照群と比べ致死率が高く、特に 4-OHBaA は 10^{-10} M という低い濃度でも影響を及ぼした (Fig. 8)。

2.2. 孵化率

卵の孵化率は、PAH 及び OHPAH 両投与群共に対照群と比べ、孵化率は悪く、特に 4-OHBaA は BaA 投与群よりも孵化率は高かった (Fig. 9)。さらに、孵化するまでの日数を調べると、対照群よりも親化合物および水酸化体投与群のほうが共に長く、いずれの物質も孵化遅延を起こ

した (Fig. 10)。

2-3. 胚発達

メダカの胚発達は対照群と比較して、どちらの化合物投与群も眼の発達異常や、卵黄の委縮などの発達障害を引き起こしていることがわかった (Fig. 11)。

D. 考察

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

キンギョの腹腔内に BaA 及び BcP をそれぞれ投与した結果、12 日目の再生ウロコが両投与群ともに対照群と比較して、ウロコの破骨細胞の活性が上昇し、ウロコの再生を抑制する傾向を示した。特に BcP 投与群がウロコの再生を顕著に抑制した。したがって、PAH 類若しくはその代謝物が破骨細胞を活性化して、ウロコの再生をかく乱する可能性が示唆された。*in vitro* の評価系において、骨芽細胞で発現して、破骨細胞を活性化する遺伝子が、4-OHBaA により活性化することが、昨年度分かった。したがって、水酸化体が毒物の本体であり、骨の細胞に作用して魚の骨代謝を攪乱している可能性が高い。またこの時の胆汁中の代謝物の濃度を測定した結果、BaA を投与したキンギョの胆汁中から、4-OHBaA、さらに、BcP を投与したキンギョの胆汁中から 3-OHBcP、4-OHBcP、5-OHBcP が検出された。したがって、CYP によって、PAH から代謝された OHPAH が破骨細胞を活性化して、ウロコの再生 (骨形成) をかく乱する可能性が示された。

一方、18 日目に採取した再生ウロコの再生率は、対照群と比較して、BaA 及び BcP 両投与群共に差がみられなかった。この理由は不明であるが、再生のステージにおいて、化合物が作用しやすいステージと作用しにくいステージがある可能性がある。今後詳細を調べていく予定

である。

2. PAH 類と OHPAH 類のメダカの受精卵に対する影響

卵の致死率は、親化合物及び水酸化体の両投与群共に対照群と比べ致死率が高く、特に 4-OHBaA は 10^{-10} M という低い濃度でも影響を及ぼした。一方卵の孵化率は、PAH 及び OHPAH 両投与群共に対照群と比べ、孵化率は悪く、特に 4-OHBaA は BaA 投与群よりも孵化率は高かった。さらに、孵化するまでの日数を調べると、対照群よりも親化合物および水酸化体投与群のほうが共に長く、いずれの物質も孵化遅延を起こした。また、メダカの胚発達は対照群と比較して、どちらの化合物投与群も眼の発達異常や、卵黄の委縮などの発達障害を引き起こしていることがわかった。

メダカの胚には代謝酵素である CYP が存在していることが報告されている (Dong et al., 2010)。さらに、メダカの胚にはエストロゲン受容体が存在しており、エストロゲンに応答することも報告されている (Chakraborty et al., 2011)。これらの事実に基づくと、水酸化体がメダカの体内で生じ、これがエストロゲン受容体を通して、胚発生を攪乱させた可能性がある。今後、詳細に解析していく予定である。

E. 結論

最終年度は、*in vivo* における作用に注目してこれまで得られた *in vitro* の評価系の再現性を確認した。BaA 及び BcP をキンギョの腹腔内にそれぞれ 0.1 ng/g、3 日おきに投与してウロコの再生を解析した結果、破骨細胞の活性が上昇して、ウロコの再生率が低下した。さらに BaA 及び BcP を投与したキンギョの胆汁に水酸化体 (BaA に対して 4-OHBaA、BcP に対して 3-OHBcP、4-OHBcP 及び 5-OHBcP) が検出された。したがって、PAH 類がキンギョの体内で

OHPAH 類になり、キンギョの骨形成をかく乱している可能性が高い。

さらにメダカの胚に PAH 類 (BaA、BcP) 及び OHPAH 類を投与した場合も OHPAH 類に毒性がみられ、キンギョで得られた結果が再現できた。

以上のことから、キンギョ及びメダカの *in vivo* の実験結果においても、OHPAH が毒物の本体であり、骨代謝をかく乱している可能性が高いことがわかった。

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 α -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 an estrogen receptor- α reporter gene assay, *Toxicol. Sci.*, **55**, 320-326 (2000).
6. Chakraborty T., Shibata Y., Zhou L.Y., Katsu Y., Iguchi T., Nagahama, Y., Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **333**, 47-54 (2011).
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. Dong W., Matsumura F., Kullman S.W., TCDD Induced Pericardial Edema and Relative COX-2 Expression in Medaka (*Oryzias Latipes*) Embryos, *Toxicol. Sci.*, **118**, 213-223 (2010).
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. 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. 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).
 20. 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).
 21. Smith, C.J., Hansch, C., The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate, *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 637-646 (2001).
 22. 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)
 23. 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)
 24. 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).
 25. 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).
 26. 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) Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Kato, 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., 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**: 90-95 (2012).
- 2) 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., 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.*, **29**: 499-504 (2012).
- 3) Kakikawa, M., Yamamoto, T., Chowdhury, V. S., Satoh, Y., Kitamura, K., Sekiguchi, T., Funahashi, H., Omori, K., Endo, M., Yano, S., Yamada, S., Hayakawa, K., Chiba, A., Srivastav, A. K., Ijiri, K., Seki, A., Hattori, A., Suzuki, N.: Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading. *Biol. Sci. Space*, **26**, 26-31 (2012).
- 4) 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, 田渕圭章, 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/*Magnetics Jpn*, **7**: 174-178 (2012).
- 5) Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., Hattori, A., Sekiguchi, T., Ikegame, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagaki, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T., Suzuki, N.: Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zool. Sci.*, **30**: 217-223 (2013).
- 6) Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, in press
3. 学会発表
- 1) Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Hattori, A., Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl disrupts bone metabolism in goldfish. 7th International PCB Workshop (Palais des Congrès of Arcachon, France), May 27-31, 2012
- 2) 鈴木信雄: 油流出事故が海洋動物に及ぼす影響. 東アジアの大気・海洋汚染と健康影響に関するワークショップ, 2012. 10. 13, 石川.
- 3) 鈴木信雄, 川部季美, 中野 淳, 赤塚涼佑, 北村敬一郎, 服部淳彦, 田渕圭章, 高崎一朗, 近藤隆, 鳥羽 陽, 早川和一: 魚類の骨代謝に対する多環芳香族炭化水素類の影響評価: 再生ウロコを用いた解析. 平成24年度日本動物学会中部支部例会, 2012. 11. 17-18, 長野.
- 4) 上西篤志, 丸山雄介, 中野真樹, 松本謙一

- 郎, 大森克徳, 田淵圭章, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 北村敬一郎, 早川和一, 清水宣明, 関口俊男, 服部淳彦, 鈴木信雄: 骨モデル(魚のウロコ)に対する宇宙放射線(重粒子線)の影響. 平成24年度日本動物学会中部支部例会, 2012. 11. 17-18, 長野.
- 5) 山本 樹, 池亀美華, 田淵圭章, 矢野幸子, 遠藤雅人, 近藤 隆, 中野真樹, 北村敬一郎, 関口俊男, 関 あずさ, 清水宣明, 服部淳彦, 鈴木信雄: 過重力及び擬似微小重力に対する破骨細胞及び骨芽細胞の応答解析. 平成24年度日本動物学会中部支部例会, 2012. 11. 17-18, 長野.
- 6) 谷内口孝治, 松本典子, 関口俊男, 羽賀雄紀, 鈴木元治, 松村千里, 鶴川正寛, 奥野俊博, 中野武, 北村敬一郎, 川部季美, 鳥羽陽, 早川和一, 服部淳彦, 鈴木信雄: ポリ塩化ビフェニル(PCB-118)は魚の破骨細胞を活性化させ骨吸収を誘起する. 第37回日本比較内分泌学会大会, 2012. 11. 29-12. 1, 福井.
- 7) 黒田美翔, 舟橋久幸, 鬼木弘明, 宇都理佳, 筒井和義, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョの再生ウロコにおける隆起線形成リズム. 第37回日本比較内分泌学会大会, 2012. 11. 29-12. 1, 福井.

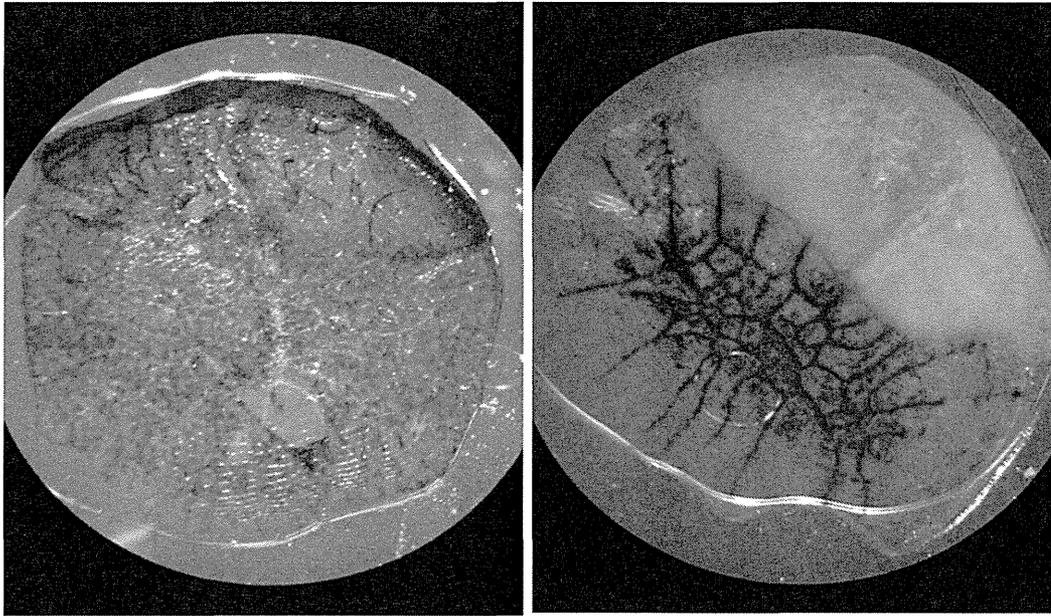
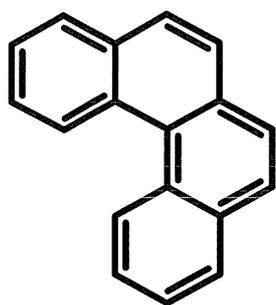
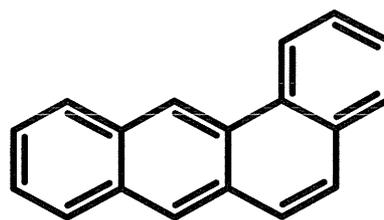


Fig. 1 (A) ALP staining and (B) TRAP staining in the regenerating scales of goldfish.
(ALP : Alkaline phosphatase, TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase)



Benzo[*c*]phenanthrene
(BcP)



Benz[*a*]anthracene
(BaA)

Fig. 2 Chemical structures of PAHs tested in the present study

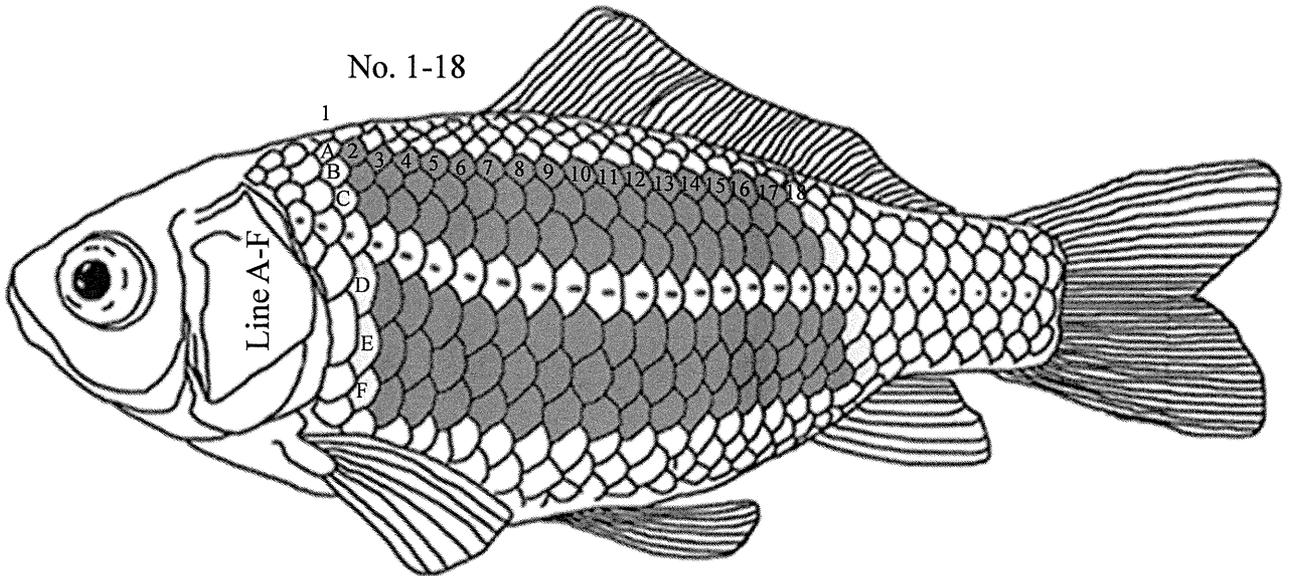


Fig. 3 Positions of regenerating scales (orange color) used in present study

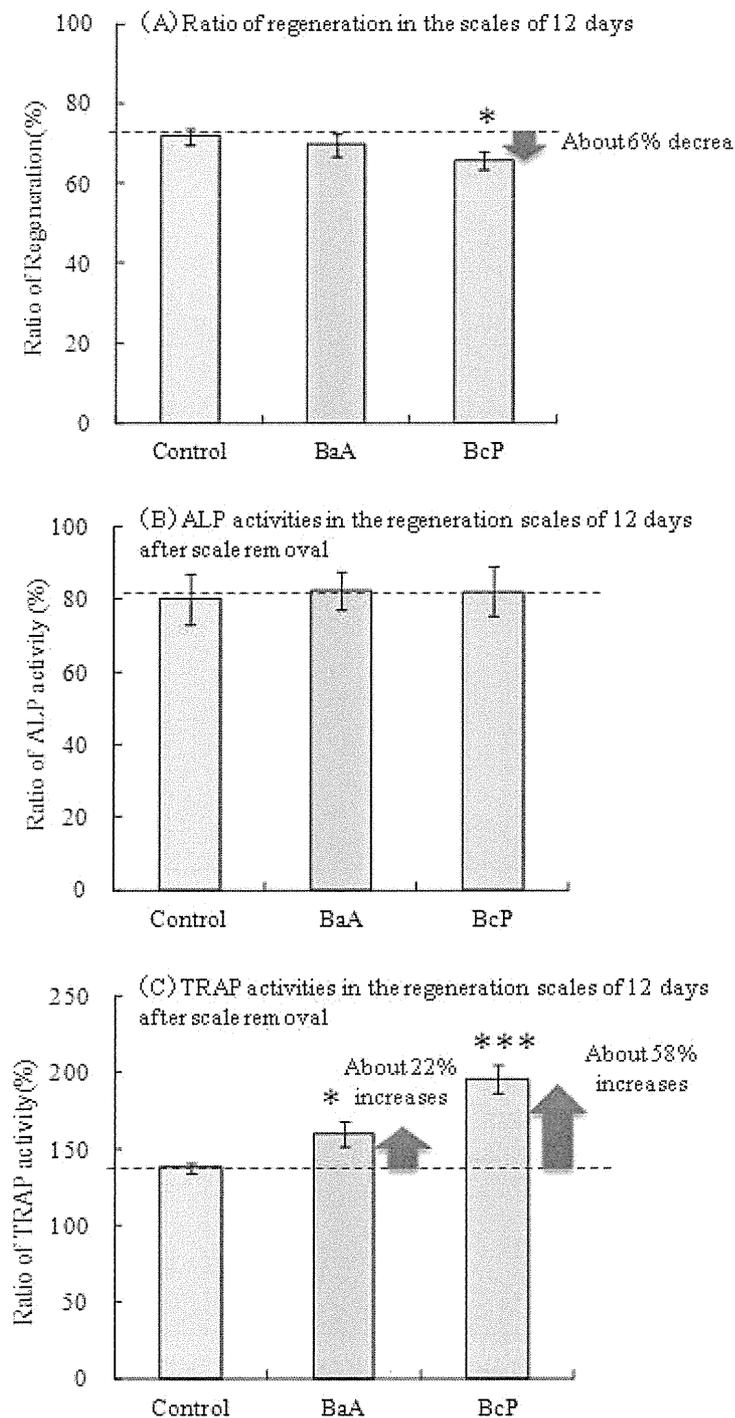


Fig.4 Regeneration rate (A) , ALP (B) and TRAP (C) activities in the regeneration scales.
 Ratio of Regeneration (%) : Regenerating scales of 12 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) × 100 (%)
 Ratio of ALP activity (%) : Regenerating scales of 12 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) × 100 (%)
 Ratio of TRAP activity (%) : Regenerating scales of 12 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) × 100 (%)

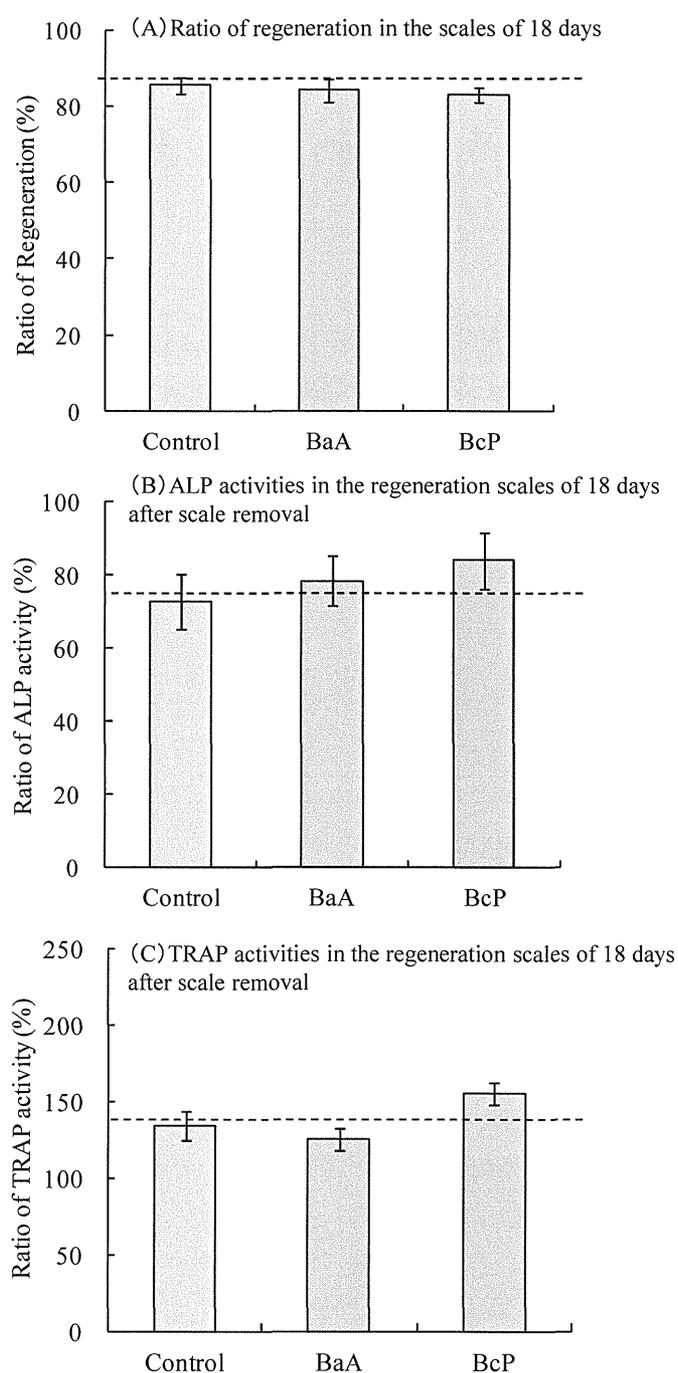


Fig.5 Regeneration rate (A) , ALP (B) and TRAP (C) activities in the regeneration scales.
 Ratio of Regeneration (%) : Regenerating scales of 18 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) $\times 100$ (%)
 Ratio of ALP activity (%) : Regenerating scales of 18 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) $\times 100$ (%)
 Ratio of TRAP activity (%) : Regenerating scales of 18 days after scale removal / Initial scale (ontogenic scale) $\times 100$ (%)

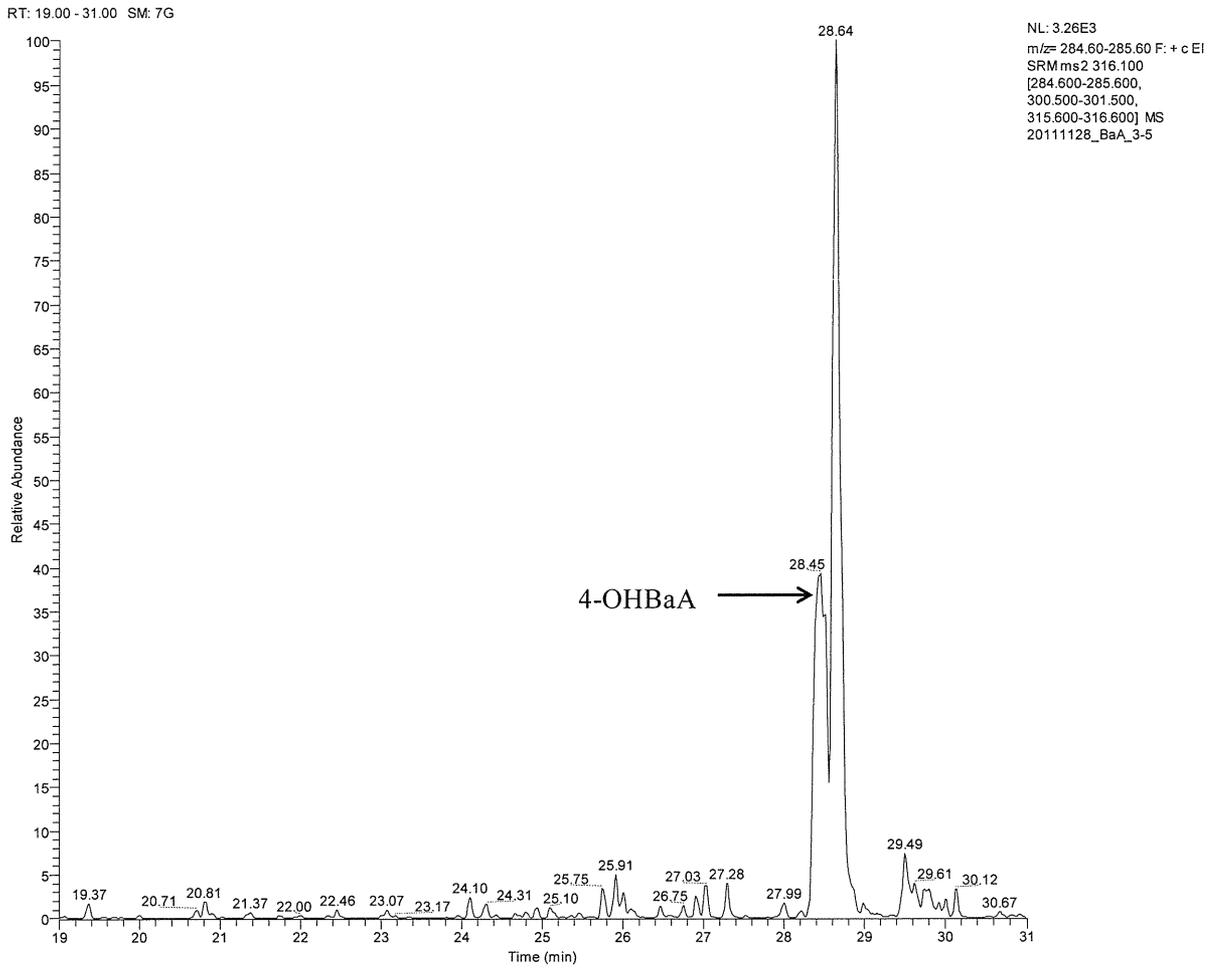


Fig.6 A chromatogram of bile from goldfish after injection of BaA (10 ng/gBW)

RT: 19.00 - 31.00 SM: 7G

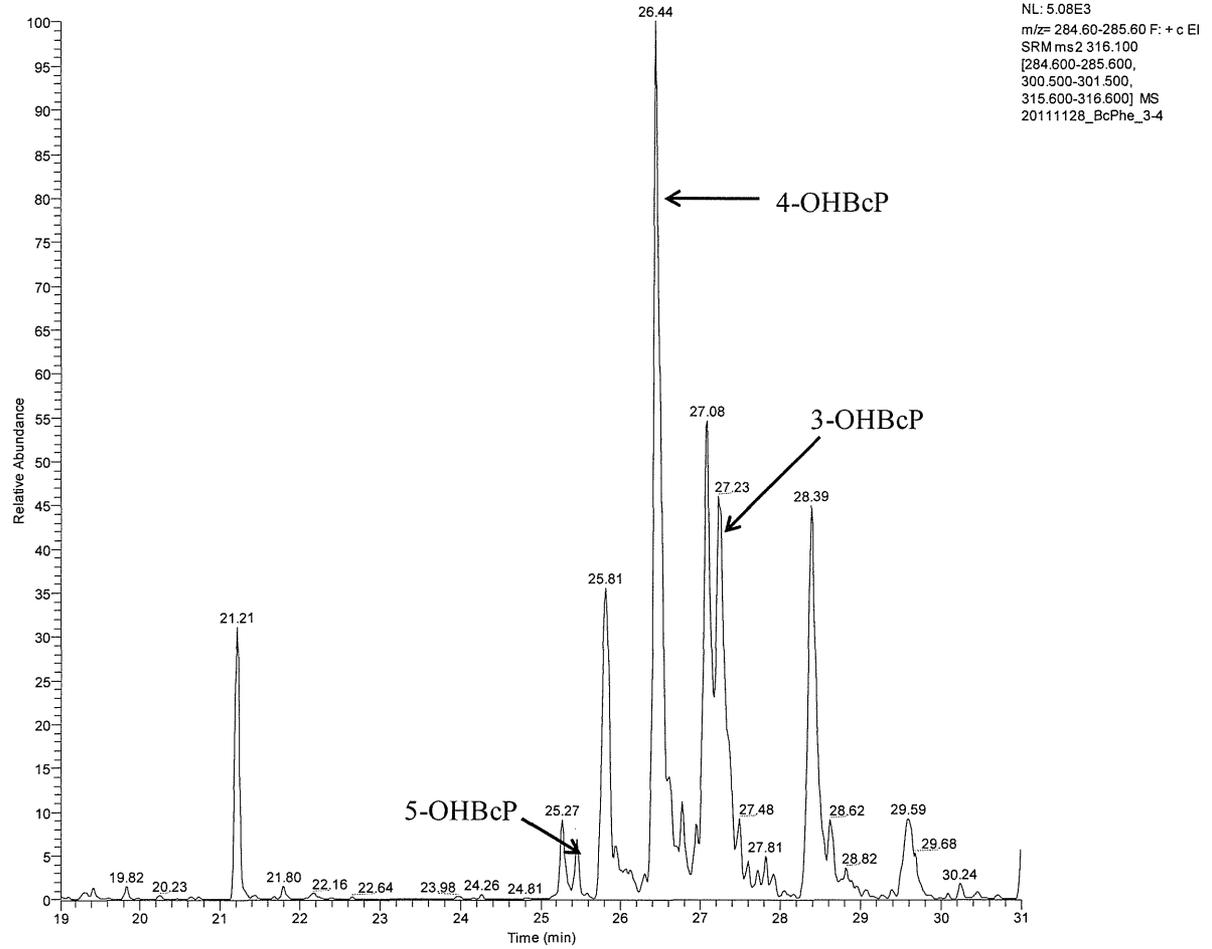


Fig.7 A chromatogram of bile from goldfish after injection of BcP (10 ng/gBW)

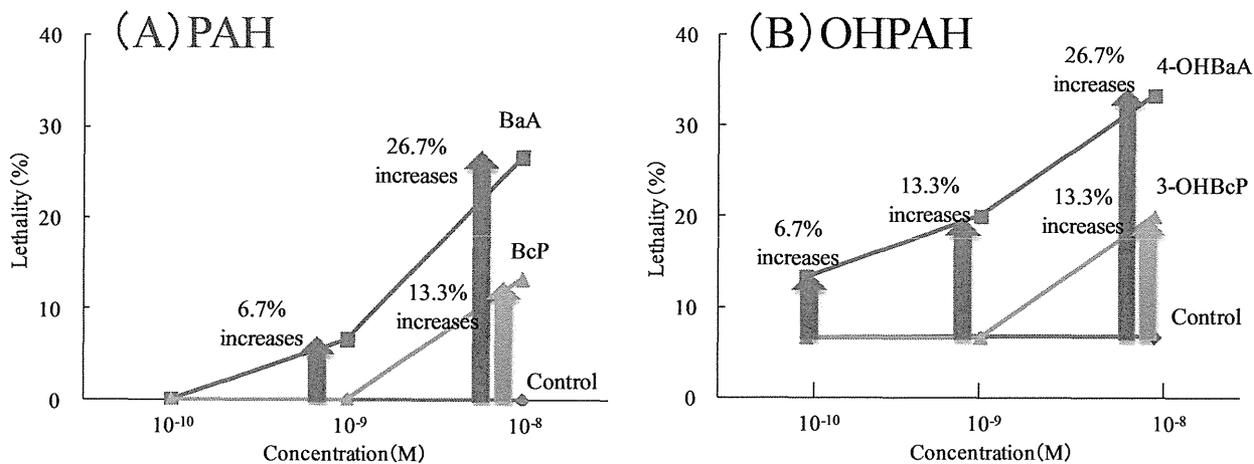


Fig.8 Lethality of injection of PAHs and OHPAHs into the medaka eggs
 (A) PAHs-injected eggs, (B) OHPAHs-injected eggs

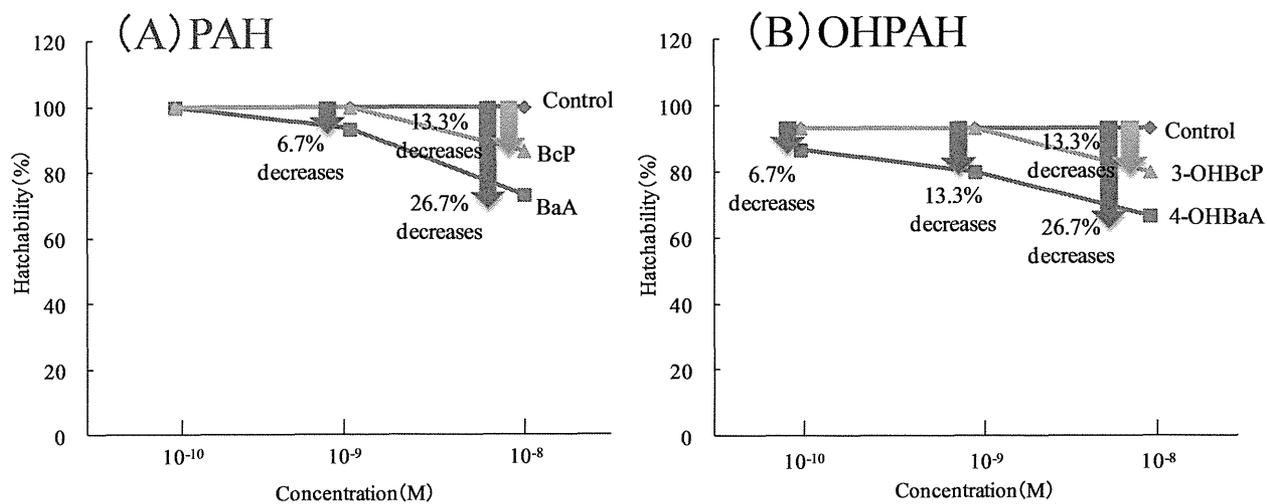


Fig.9 Hatchability of injection of PAHs and OHPAHs into the medaka eggs
 (A) PAHs-injected eggs, (B) OHPAHs-injected eggs

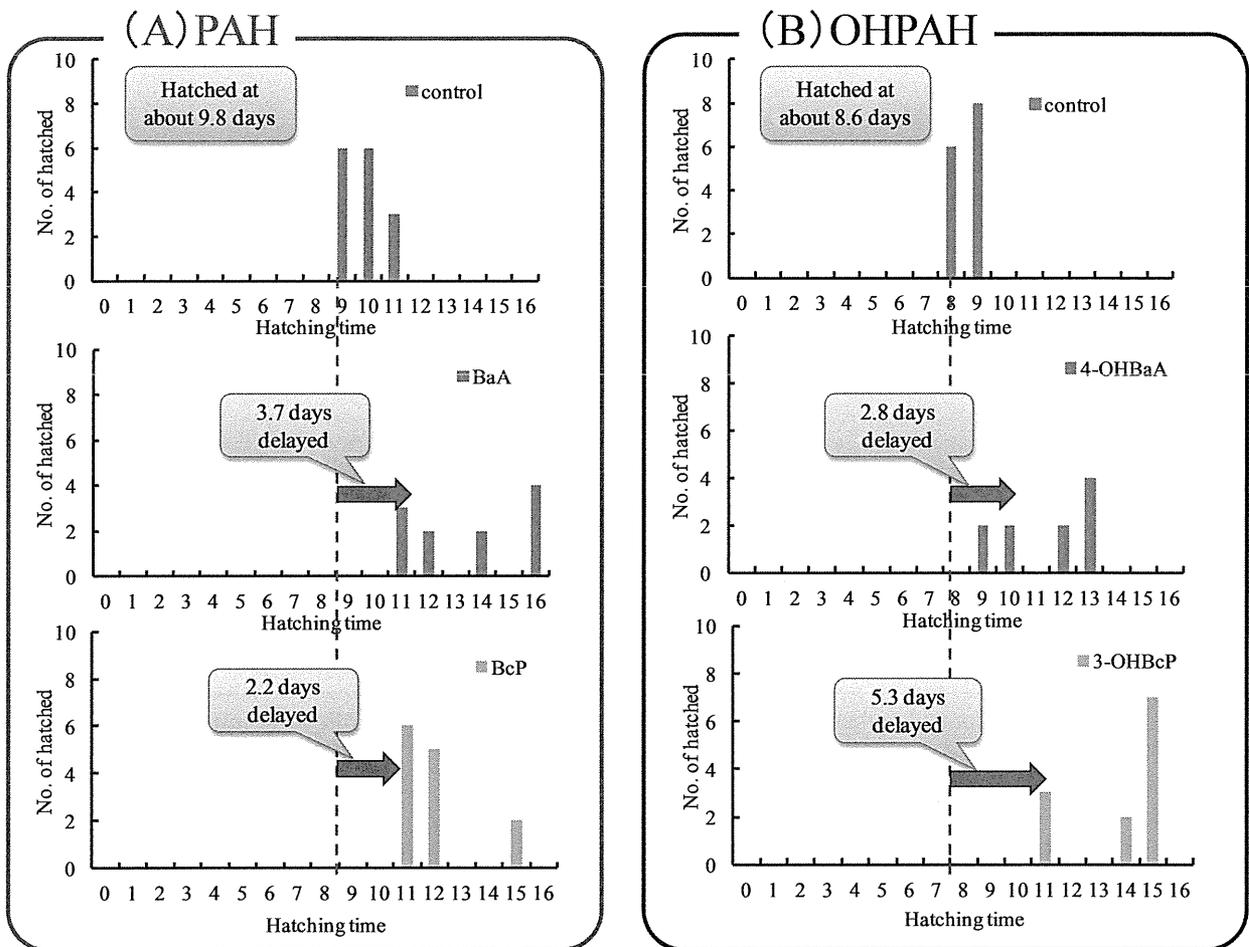


Fig.10 Toxicity of the medaka embryos injected PAHs and OHPAHs during before and after hatching
 (A) PAHs-injected eggs, (B) OHPAHs-injected eggs

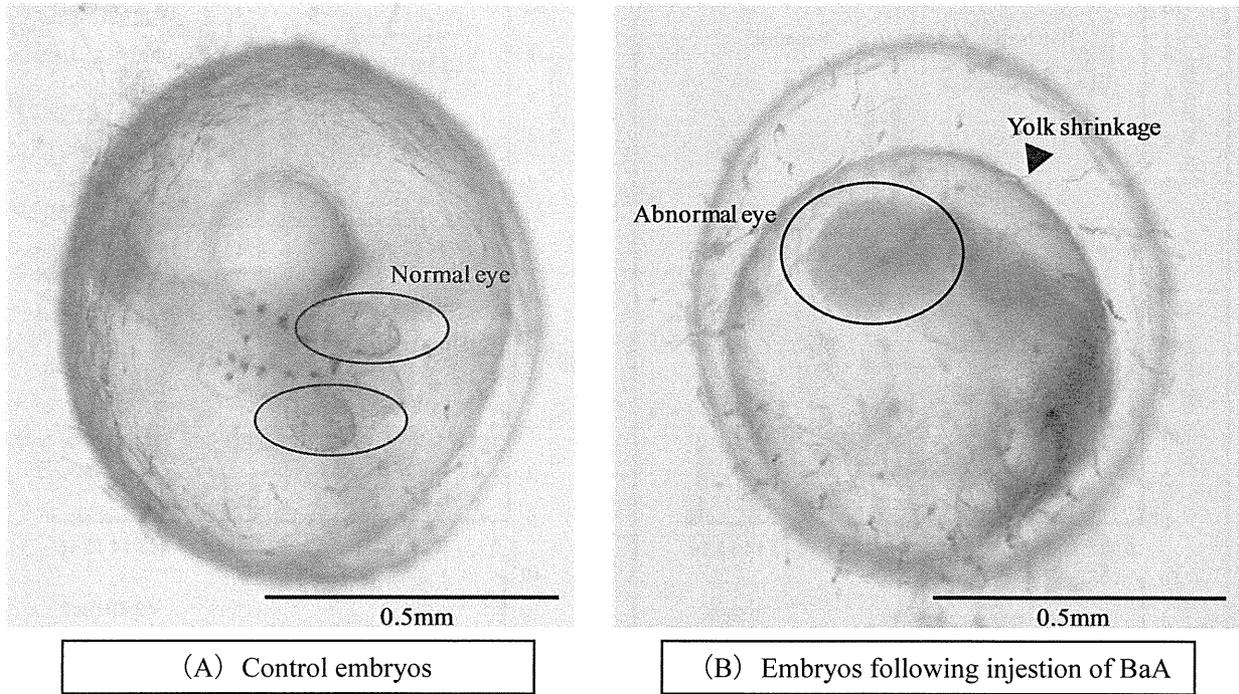


Fig.11 Comparison of control embryos and PAH-injected embryos at 2dpf (day post-fertilization)
(A) Control embryos : showing normal development, (B) Embryos following injection of BaA : showing yolk shrinkage and abnormal development, especially eyes and pigmentation

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

多次元データベース MDPD による信頼性の高い網羅的迅速定量分析法の構築

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長
研究協力者 田原 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員
研究協力者 五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

研究要旨

多環芳香族炭化水素 (PAH) 類における信頼性の高い網羅的迅速定量分析法開発のための基礎研究を行った。現状では、計量学的に純度が証明された PAH の標準物質はほとんど流通しておらず、また、測定法の妥当性検証が煩雑である等、定量分析値の信頼性の確保は十分ではない。そこで、トレーサビリティを確保した精度の高い定量分析法を実現するため、これまでに開発した qNMR 法および定量値の新規補正法 Multi Internal standards Calibration Objective (MICO) を応用して、迅速、精確、網羅的な多次元データベースを用いた定量分析法 (MDPD-MICO-qGC/MS) を開発した。得られたスペクトルや検量線等、化合物のデータを元に MDPD を構築し、これを参照することによって科学的小および計量学的に信頼性の高い定量値を算出することができた。本法により、環境中の PAH 等の精確な自動定量分析が可能となると考えられる。

A. 研究目的

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) 類は、異性体や環の数、また、水酸化体やニトロ化体などの置換基を持つ PAH 誘導体なども含めると、非常に多種存在し、それらの多くが発癌性や変異原性等の有害性を有する。そのため、曝露量や健康リスクを評価するためには、水、大気などの環境中の微量の PAH 類を網羅的に且つ精確に定量する高度な測定技術力が要求されている。

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) 等を用いる PAH 類測定の一連の分析操作過程には、①試料の採取、②試料調製、③標準物質の入手、④検量線作成、⑤定量分析があり、こ

れらの①-⑤すべての過程が精確に行われなければ、得られた定量分析値の信頼性は確保できない。

③の標準物質に関しては、純度や含量が精確に値付けられた標準品の入手が可能、あるいは、入手した標準品の純度の確証が重要である。しかし実際は、計量学的に純度が証明された標準物質はほとんど流通していない。平成 22 年度は、我々がこれまでに開発した定量核磁気共鳴法 (定量 NMR: quantitative NMR (qNMR)) を応用し、水酸化 PAH 市販試薬製品の純度値を測定し、純度のズレが少なからず定量値の誤差となっていることを明らかとした。すなわち、標準物質の純度は、結果として、定量分析の結果の