

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

北村敬一郎^{1*}・中野 淳²・川部季美²・早川和一²・佐藤雄亮¹・根本 鉄¹
大嶋雄治³・島崎洋平³・遠藤雅人⁴・服部淳彦⁵・鈴木信雄⁶

2010年9月16日受付, Received 16 September 2010

2010年12月6日受理, Accepted 6 December 2010

Improvement in Efficiency and Accuracy of Goldfish Scale Assay with Automatic Area Measurement

Kei-ichiro KITAMURA^{1*}, Jun NAKANO², Kimi KAWABE², Kazuichi HAYAKAWA²,
Yusuke SATO¹, Tetsu NEMOTO¹, Yuji OSHIMA³, Youhei SHIMAZAKI³, Masato ENDO⁴,
Atsuhiko HATTORI⁵ and Nobuo SUZUKI⁶

Abstract

Teleost scale is a calcified tissue that contains osteoclasts, osteoblasts, and bone matrix, all of which are similar to those found in mammalian membrane bones. We have developed an *in vitro* model system using goldfish scale as a bone model. This system can detect the activities of osteoclasts and osteoblasts with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) as the respective markers. In the present study, we have improved this method by normalization of enzymatic activity with scale areal correction using image processing software. This methodological improvement made the system considerably efficient and accurate, and made it possible to measure TRAP and ALP activities even with the small scale of 0.5 mg or less. In addition, our new method minimized the influence of scale size on measurements of enzymatic activity.

Key Words: scale, unit weight activity, unit area activity, osteoclasts, osteoblasts
キーワード: ウロコ, 単位重量活性, 単位面積活性, 破骨細胞, 骨芽細胞

¹金沢大学医薬保健研究域保健学系 〒920-0942 石川県金沢市小立野5-11-80 (Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, 11-80 Kodatsuno 5 chome, Kanazawa, 920-0942 Japan)

²金沢大学医薬保健研究域薬学系 〒920-1192 石川県金沢市角間町 (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192 Japan)

³九州大学大学院農学研究院海洋生命化学講座 〒812-8581 福岡県福岡市博多区箱崎6-10-1 (Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 10-1 Hakozaki 6 chome, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan)

⁴東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7 (Department of Marine Biosciences, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 5-7 Konan 4 chome, Minato-ku, Tokyo, 108-8477 Japan)

⁵東京医科歯科大学教養部生物学教室 〒272-0827 千葉県市川市国府台2-8-30 (Department of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 8-30 Kohnodai 2 chome, Ichikawa, Chiba, 272-0827 Japan)

⁶金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設 〒927-0553 石川県鳳珠郡小木町△4-1 (Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, 4-1 Ogi, Housu-gun, Ishikawa, 927-0553 Japan)

*連絡著者 (Correspondence author)

I. はじめに

魚類のウロコは、骨芽細胞、破骨細胞および骨基質タンパクを持ち(Yamada 1961, 1971; Bereiter-Hahn and Zylberberg, 1993; Nishimoto *et al.*, 1992; Lehane *et al.*, 1999), 哺乳類の膜性骨同様に添加的石灰化により軟骨が関与しないで直接骨化する。既にわれわれは、この魚類のウロコを骨モデルとし、その破骨細胞と骨芽細胞活性をそれらのマーカー酵素である酒石酸耐性酸ホフターゼ(TRAP)およびアルカリホフターゼ(ALP)により(Vaes 1988; Dimai *et al.*, 1998), 別々に測定できるアッセイ系を開発している(Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki and Hattori 2002)。これまでこのアッセイ系を用い、1960年代半ばから船底や漁網への貝類や海藻類の付着を防ぐための防汚剤(Boyer, 1989; Fent, 1996)として広く・大量に使用されたトリブチルスズによる沿岸海域の汚染の骨代謝への影響評価(Suzuki *et al.*, 2008)を評価した実績がある。さらに、魚の泳ぎや低強度超音波による機械的刺激が骨芽細胞活性を促進することなどを示してきた(Kitamura *et al.*, 2010a; Kitamura *et al.*, 2010b)。

一方、1個体のキンギョからアッセイに使えるウロコは、100枚程度しか得られず、従来のウロコの重量当たりの酵素活性測定では一枚一枚のウロコ重量測定に多大な時間を要した。また、小さなウロコの重量測定は困難であり、TRAPやALP活性測定値が小さなウロコでは相対的に大きくなるなどの傾向が見られ、できるだけ同程度の大きさのウロコを使用してきた。そこで、今回、米国立衛生研究所(NIH)から提供される画像処理ソフトImage Jを用い、迅速かつ正確にウロコの面積当たりで酵素活性を測定できる方法を開発した。

II. 材料と方法

1) キンギョ

面積補正法開発のために体長約12cmのオスのキンギョ(*Carassius auratus*)を6個体(東川養魚場, 奈良県大和郡山市)使用した。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。

2) ウロコの面積補正法によるTRAPおよびALP活性測定の改良

2-1) ウロコの採取

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(ナカライテスク株, 京都市, 日本)水溶液で麻酔後、側線鱗の上および下の各3行より左右対称に各行16枚ずつ別々に抜去し(図1), 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したLeibovitz's L-15培地(11415, Invitrogen, Auckland, NZ, USA)へ移した。そして、左側面のウロコを重量法で、右側面のウロコを面積法でそれぞれTRAPおよびALP活性を測定した。

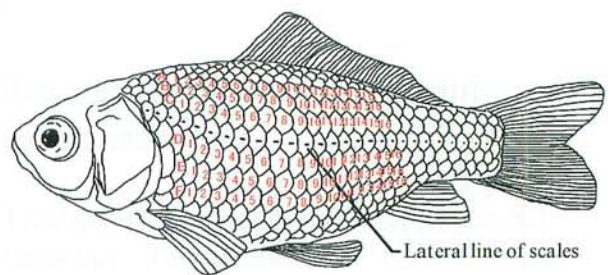


図1 ウロコのサンプリング位置. 酵素活性の重量・面積補正法: 左側面のウロコを重量法で、右側面のウロコを面積法でそれぞれTRAPおよびALP活性測定するため、左右側線上のウロコの上・下各3行(A~F行)のウロコを抜去した。

Fig. 1 Schematic of sampling location for scale removal. Scale sampling for development of alternated measurement in TRAP and ALP activities: 192 scales (numbered scales) were collected from 6 horizontal lines (from A to F) of scales along the lateral line of scales on both side of the body. TRAP and ALP activities on the left side of scales were measured with weight correction method and on the right side of scales were measured with areal correction method.

2-2) TRAP活性の吸光度測定

ウロコを生食水で洗浄後、pH 5.3の酸性酒石酸緩衝液(20 mM 酒石酸含有0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液)100 μ l ずつが入った96穴マイクロプレートの各ウエルの中へ1枚ずつ入れた。ウロコを入れた直後に、マイクロプレートをマイナス80°Cで凍結・保存した。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pH 5.3の酸性酒石酸緩衝液100 μ l ずつ各ウエルへ加えて、20°Cで30分間反応させた後、3 N 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、150 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をブランクとし

て、405 nmで吸光度を測定した。

2-3) ALP活性の吸光度測定

ALP活性の吸光度測定は、アルカリ緩衝液 (1mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM塩化亜鉛を含む, pH 9.5 の100 mM トリス・塩酸緩衝液) を酸性酒石酸緩衝液に換えて使用した。その他の条件は、TRAP活性測定と同様条件で行った。

2-4) ウロコの面積測定

吸光度測定のために反応液を新しいプレートへ移した後、残った反応液を除き、0.4 %のメチレンブルー液を各ウエルへ100 μ l ずつ加え5分以上染色した。その後染色液を取り除き、生食水で洗浄後、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た。ポリプロピレンシート上の余分な水分をペーパータオルで除去した。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 (CanoScan LiDE 600F, キヤノン(株), 日本) により解像度300 ドット/インチ (dpi) のJPEG画像としてウロコ画像を取り込んだ (図2)。

アメリカ国立衛生研究所 (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、ウロコ画像のコントラストを最大化 (Brightness/contrast : 図3) 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 : 図4) 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

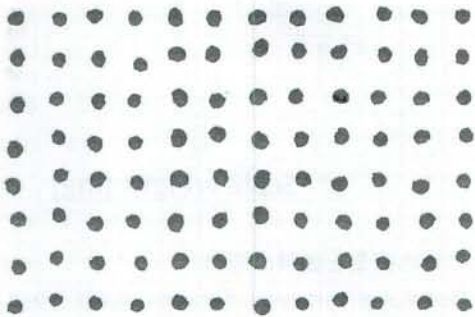


図2 イメージスキャナーで取り込まれたウロコ画像。ウロコは、メチレンブルーで5分間染色後、生食水で洗浄し透明なポリプロピレンシート上に96穴マイクロプレートと同じ配置で並べられ、イメージスキャナーでその画像を取り込んだ。

Fig. 2 A representative stained-scale image captured by an image scanner. After scales were stained with methylene blue, it was washed with saline and arranged in a 96-well plate-like array on a polypropylene sheet. Then the image of these arranged scales was taken with an image scanner.

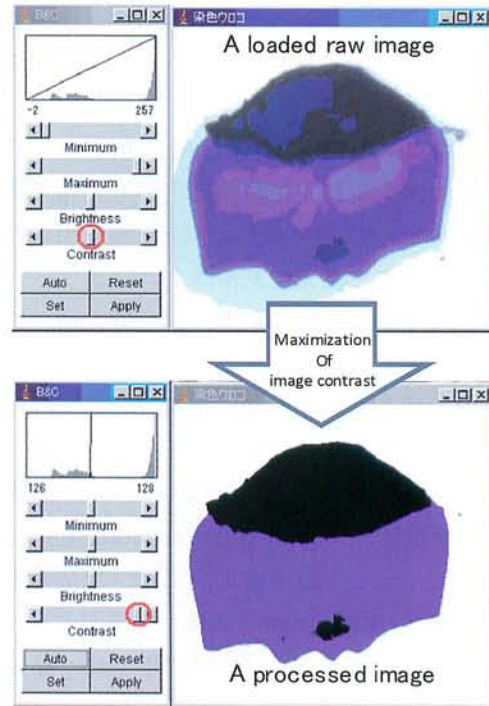


図3 画像コントラストの最大化。画像処理ソフトウェア「Image J」により、ウロコ画像のコントラストを最大化し、着色ウロコ以外のノイズ画像を除去した。

Fig. 3 Maximization of image contrast. Dragging the slider of contrast to right side to maximize the contrast of the scale image. Then, almost all noise components on the image except scale are eliminated.

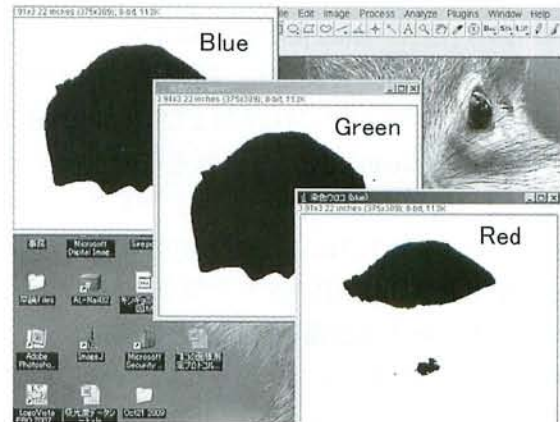


図4 2値化画像へ変換。「Image J」の「split channels」コマンドで画像を3原色の画像に分離することにより2値化画像へ変換する。2値化画像へ変換後「measure」コマンドで指定位置 (ウロコ) 画像が占めるドット数をカウントする。

Fig. 4 Image binarization. An original image file is separated into trichromatic color images (red image file, green image file, and blue image file) to convert an image into binarized image, using "split channels" command. Generally, green image file suit a wide range of images for an accurate area measurement. Then, area measurement is automatically processed by clicking the mouse cursor on each scale of green image file.

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、個々のウロコ面積 (mm²) に換算した。

2-5) ウロコのTRAPおよびALP活性

基質液添加後20℃で30分間反応させた後、測定した405nmの吸光度からブランク値を差し引いた吸光度を求めた。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)を求めた。その後、重量補正法では、反応時間 (h) とウロコ1枚の重さ (mg) で生じたp-ニトロフェノール量を除して、単位時間 (h)・単位重量 (mg) 当たりの酵素活性 (nmol pNP produced/(mg scale×h)) とした。一方、面積補正法では、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除して、単位時間 (h)・単位面積 (mm²) 当たりの酵素活性 (nmol pNP produced/(mm² scale×h)) とした。

2-6) ウロコの重量と面積の関連

キンギョの各ウロコの重量と面積の関係を144枚 (2個体) について調べた。

2-7) ウロコの重量または面積とALPおよびTRAP活性の関連

キンギョの片側のウロコのALP (24枚) およびTRAP (24枚) 活性 (nmol pNP produced/h) とそれぞれのウロコ重量 (mg) を測定し、同じ個体の対側の対称位置のウロコのALP (24枚) およびTRAP (24枚) 活性 (nmol pNP produced/h) とそれぞれのウロコ面積 (mm²) を4個体について測定した。そして、ウロコの重量とALPまたはTRAP活性との関連とウロコの面積とALPまたはTRAP活性との関連を調べた。

2-8) 重量補正法と面積補正法との関連

ALPおよびTRAP活性のそれぞれについて、単位重量当たりの活性値 (従来法) と単位面積当たりの活性値 (改良法) との間の相関関係を調べた。

2-9) ウロコの面積と単位面積当たりのALPおよびTRAP活性との関連

ウロコの面積でALPまたはTRAP活性値 (nmol pNP produced/h) を除して算出した単位面積当たりのALPまたはTRAP活性値 (nmol pNP produced/(mm² scale×h)) とウロコの面積 (mm²) との関連から、単位面積当たりの活性に変換した効果を調べた。

3) 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (standard error of mean: SEM) の形で表した。ウロコの重量と面積の関連は、ウロコの面積を目的変数、ウロコの重量を説明変数とする回帰分析を行った。ウロコの重量または面積とALPおよびTRAP活性の関連は、ウロコの酵素活性を目的変数、ウロコの重量あるいは面積を説明変数とする回帰分析を行った。重量補正法と面積補正法との関連は、単位面積当たりの活性値 (改良法) を目的変数、単位重量当たりの活性値 (従来法) を説明変数とする回帰分析を行った。ウロコの面積と単位面積当たりのALPおよびTRAP活性との関連は、単位面積当たりのALPおよびTRAP活性を目的変数、ウロコの面積を説明変数とする回帰分析を行った。危険率5%未満を統計学的有意水準とした。

III. 結果

1) ウロコの重量と面積の関連

各ウロコの重量と面積の間には、正の相関が見られた ($r=0.65$, $p<0.001$), (図5)。

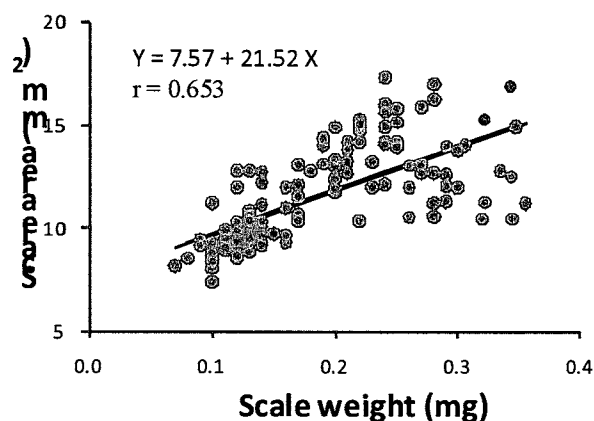


図5 ウロコの重量と面積の関連。

Fig. 5 Correlation analysis between scale weight and scale area.

2) ウロコのTRAPまたはALP活性と重量または面積との関連

ウロコ1枚のALP総活性とウロコの重さの間には、正の相関が見られた ($r=0.57$, $p<0.001$), (図6A)。また、TRAP総活性とウロコの重さの間にも、正の相関 ($r=0.65$, $p<0.001$) が見られた (図6 B)。

ウロコ1枚のALP総活性とウロコの面積の間には、強い正の相関が見られた ($r=0.91, p<0.001$) (図6C)。また、TRAP総活性とウロコの面積の間にも、強い正の相関 ($r=0.78, p=2.6\times 10^{-22}$)が見られた (図6D)。

3) 重量補正法と面積補正法との関連

単位重量当たりのALP活性値 (従来法) と単位面積当たりのALP活性値 (改良法) との間には、弱い正の相関 ($r=0.38, p<0.001$) (図7A) が見られた。また、単位重量当たりのTRAP活性値 (従来法) と

単位面積当たりのTRAP活性値 (改良法) との間にも、正の相関 ($r=0.67, p<0.001$) (図7B) が見られた。

4) ウロコの面積と単位面積当たりのALPおよびTRAP活性との関連

ウロコのALPおよびTRAP活性を単位面積当たりの活性で表すと、ウロコの面積に関係なくほぼ一定となった (図8A, B)。

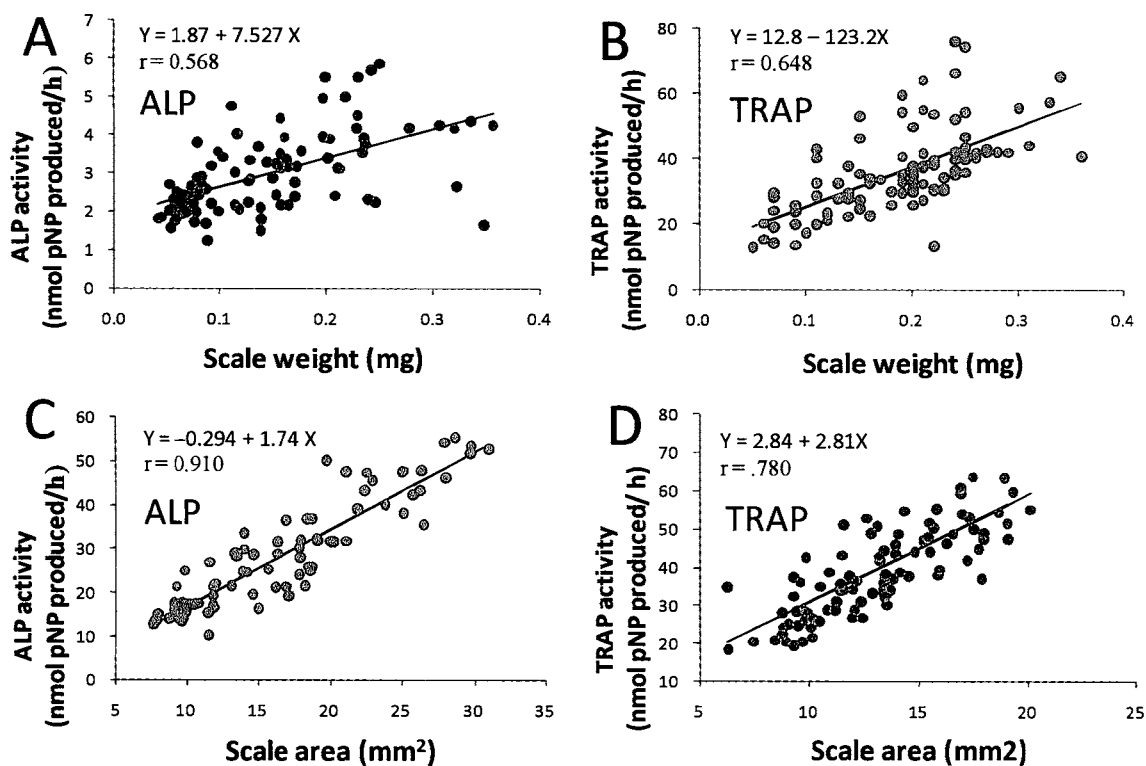


図6 ウロコのTRAPまたはALP活性とその重量または面積との関連.

Fig. 6 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).

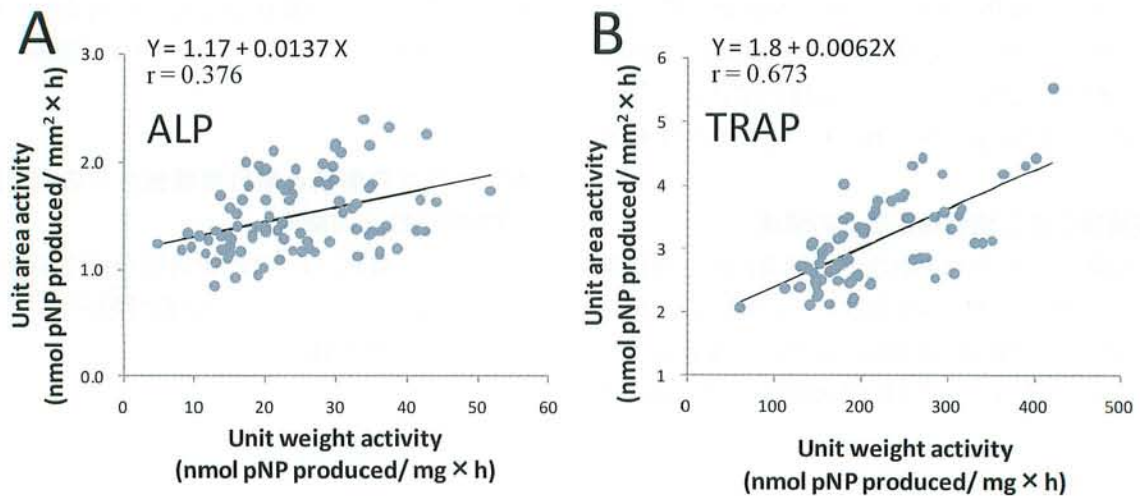


図7 重量補正法と面積補正法との関連。(A) 単位重量当たりのALP活性値(従来法)と単位面積当たりのALP活性値(改良法)との相関。(B) 単位重量当たりのTRAP活性値(従来法)と単位面積当たりのTRAP活性値(改良法)との相関。

Fig. 7 Correlation analysis between weight-correction method and areal-correction method. Left panel (A) showed correlation between unit weight ALP activity (conventional method) and unit area ALP activity (improved method). Right panel (B) showed correlation between unit weight TRAP activity (conventional method) and unit area TRAP activity (improved method).

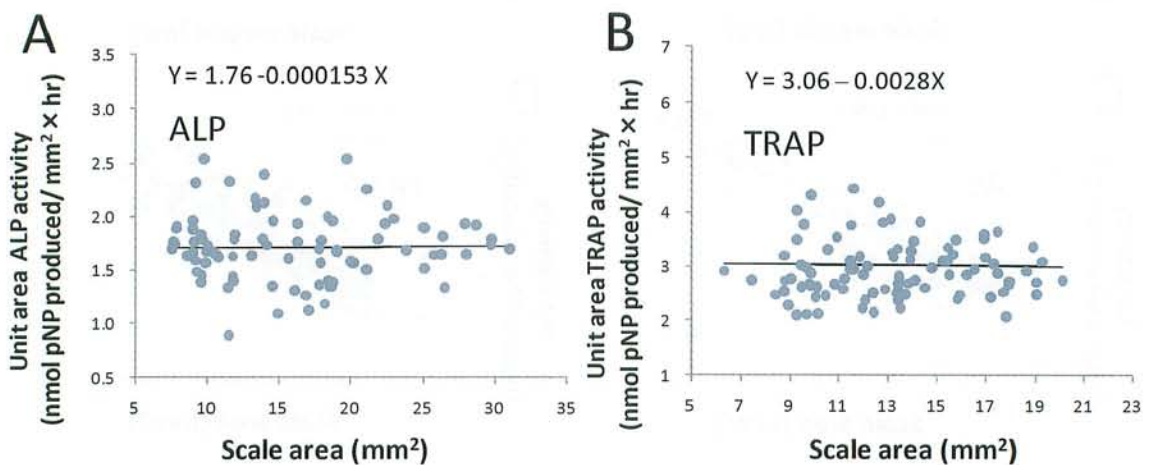


図8 ウロコの面積と単位面積当たりのALPおよびTRAP活性との関連。(A) ウロコの面積と単位面積当たりのALP活性との関連。(B) ウロコの面積と単位面積当たりのTRAP活性との関連。

Fig. 8 Relationship between scale area and enzyme activities. Left panel (A) showed relationship between scale area and unit area ALP activity. Right panel (B) showed relationship between scale area and unit area TRAP activity.

IV. 考察

従来ウロコのALPおよびTRAP活性をウロコの重量 (mg) 当たりの活性で表していた方法では、ウロコの乾燥と1枚1枚の秤量に多大な時間を要したことから、1mg未満の乾燥ウロコの秤量に困難さがあった

ため、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乾燥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。

ウロコの重量と面積の間には、正の相関があるものの、ウロコ重量が0.22 mg以上では、ウロコの重量と面積との相関が低下する傾向が見られた。また、ウロコの重量とALPおよびTRAP総活性値の間には、共に正の相関があるものの、ウロコの面積とALPおよびTRAP総活性値の間には、より強い正の相関があった。これは、ウロコの重量は、石灰化層や繊維層の厚さにより大きく影響され、必ずしもウロコサイズと一致しないことと、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、ウロコ表面に2次元的に分布している(Azuma, *et al.* 2007)ことが影響したものと思われた。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た。

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)の間には、相関関係が見られた(図7)。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互換性が期待できる。また、ALPおよびTRAP活性を面積補正法で算出した単位面積当たりの活性で表すと、ALPおよびTRAP活性は、ウロコの表面積と無相関でウロコサイズによる影響が無くなったことが明らかになった(図8)。

キンギョのウロコは、抜去しても再生する。そうしてできた再生ウロコは、普通のウロコにくらべてALP活性が統計学的に有意に高く、さらにエストロゲン(E2)のような骨代謝に関連するホルモン刺激に対しても、普通ウロコよりも感度良く、有意に高いALP活性の上昇を示すことが報告されている(Yoshikubo, *et al.* 2005)。このように骨代謝に影響する刺激に対して優れた感度を示す再生ウロコを骨のモデルとして用いる方が、普通ウロコを用いるよりも高感度のウロコアッセイができると考えられる。その際、石灰化層や繊維層が薄く軽い再生ウロコのウロコ1枚当たりの酵素活性を求める方法としては、重量法よりも面積法が適するものと思われる。そして、再生ウロコの系を用い、今回検討した面積補正法を利用した酵素活性測定法を利用することにより、

今後の海域汚染物質による骨代謝への影響を感度良く評価することに寄与できるものと思われる。

V. まとめ

われわれは、ウロコを骨モデルとした破骨細胞および骨芽細胞活性測定法を、従来から行ってきたウロコの重量当たりの酵素活性測定法から、ウロコの面積当たりの酵素活性測定法への変更を検討した。その結果、面積の自動計測によるウロコの面積当たりの酵素活性測定法への変更により、①酵素活性測定時間の大幅な短縮、②酵素活性測定の正確度および再現性の向上、③ウロコ1枚からの酵素活性測定、④酵素活性測定へのウロコサイズの影響を軽減が実現でき、⑤重量補償補正法との相関関係も確認した。

謝辞：本研究の一部は、科学研究費補助金(KK:21500681, NS:21500404)、クリタ水・環境科学振興財団、環境省の地球環境研究総合推進費(B-905)及びExTEND2005の研究費、厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)の支援により実施された。

文献

- Azuma, K., Kobayashi, M., Nakamura, M., Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S., Ikegame, M., Yamamoto, T. and Hattori, A., 2007: Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 594-600.
- Bereiter-Hahn, J. and Zylberberg, L., 1993: Regeneration of teleost fish scale. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105A**, 625-641.
- Dimai, H. P., Linkhart, T. A., Linkhart S. G., Donahue, L. R., Beamer, W. G., Rosen, C. J., Farley, J. R. and Baylink, D. J., 1998: Alkaline phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. *Bone*, **22**, 211-216.
- Kitamura, K., Suzuki, N., Sato, Y., Nemoto, T., Ikegame, M., Yamamoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Furusawa, Y., Shigehito Wada, S. and Hattori, A., 2010a: Osteoblast activity in the goldfish scale responds sensitively to mechanical stress. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **156**,

357-363.

- Kitamura, K., 2010b: Effects of low-intensity ultrasound on osteoblasts and osteoclasts in goldfish scale. *Biological Sciences in Space*, **24**, 29-34.
- Lehane, D. B., Mckie, N., Russell, R. G and Henderson, I. W., 1999: Cloning of a fragment of the osteonectin gene from goldfish, *Carassius auratus*: its expression and potential regulation by estrogen. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **114**, 80-87.
- Nishimoto, S. K., Araki, N., Robinson, F. D. and Waite, J. H., 1992: Discovery of bone γ -carboxyglutamic acid protein in mineralized scales. *J. Biol. Chem.*, **267**, 11600-11605.
- Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T., 2000: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost). *Peptides*, **21**, 115-124.
- Suzuki, N. and Hattori, A., 2002: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, **33**, 253-258.
- Suzuki, N., Kitamura, K., Somei, M., Reiter, R. J. and Hattori, A., 2008: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.*, **44**, 326-334.
- Vaes, G., 1988: Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **231**, 239-271.
- Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A., 2005: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, **76**, 2699-2709.