

## 水酸化多環芳香族炭化水素類の魚類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する影響

鈴木信雄<sup>1</sup>, 服部淳彦<sup>2</sup>, 早川和一<sup>3</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木, 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設; <sup>2</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台, 東京医科歯科大学 教養部 生物学教室; <sup>3</sup>〒920-1192 金沢市角間町, 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 環境衛生化学

Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>2</sup>, Kazuichi HAYAKAWA<sup>3</sup>: Effect of monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons on osteoblasts and osteoclasts in teleosts

多環芳香族炭化水素類 (PAH) は、石炭燃料やディーゼル車からの排ガス粉塵に起因する大気汚染物質である。PAH は動物体内に入ると、P450 により水酸化される。その PAH の代謝産物である水酸化 PAH に内分泌攪乱作用 (エストロゲン受容体と結合する作用) があることが、酵母 two-hybrid assay によりわかってきた (Hayakawa et al., 2007)。しかし PAH 自体にはエストロゲン受容体との結合がみられないことから、水酸化 PAH が内分泌攪乱作用の活性物質であると推測される (Hayakawa et al., 2007)。また PAH は重油にも含まれており、重油汚染海域では魚の脊柱彎曲が観察されている。水酸化 PAH が魚の骨代謝に影響を与えている可能性が非常に高い。しかし、これまで水酸化 PAH の生物に対する作用はほとんど注目されておらず、骨代謝に及ぼす影響はこれまで全く調べられていない現状にある。

そこで我々は、「魚類のウロコ」に注目した。ウロコには骨芽細胞と破骨細胞が共存し、エストロゲン受容体も存在している (Suzuki et al., 2006)。さらに、ウロコを用いたアッセイを開発して、ビスフェノール A (Suzuki and Hattori, 2003) 及びトリブチルスズ (Suzuki et al., 2006) の影響を評価してきた。

本研究では、水酸化 PAH の骨代謝に及ぼす作用をキンギョのウロコのアッセイシステムで評価し、さらに RT-PCR により骨組織に特異的に発現している遺伝子の変化も解析した。

### 【方法】

#### 1) キンギョおよびベラのウロコのアッセイ系を用いた水酸化 PAH 類の骨代謝に対する影響評価

材料としてキンギョ (*Carassius auratus*) とベラ (*Pseudolabrus sieboldi*) を用いた。魚を MS-222 で麻酔し、ウロコを取った。そのウロコを半分に切り、実験群と対照群とに分けた (N=8)。なお、1 個体の魚からウロコを約 100 枚とり、一連の実験は同一個体のウロコを用いて行った。統計は student's t-test で解析した。HEPES (20 mM) (pH 7.0) 及び抗生物質 (1%) を含む培地 (MEM, ICN Biomedicals Inc.) に 4-hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) と 3-hydroxybenz[a]anthracene (3-OHBaA) を添加し、水酸化 PAH の破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用を評価した。培養時間は 6 及び 18 時間で、濃度は  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M でその作用を解析した。また、ネガティブコントロールとして酵母の two-hybrid assay でエストロゲン及び抗エストロゲン活性がみられなかった 1-hydroxypyrene (1-OHPy) を用い、ポジティブコントロールとして 17 $\beta$ -estradiol を用いて実験を行った。

本研究では、破骨細胞の活性の指標として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) を用い、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ (ALP) を使用し、水酸化 PAH 類の骨組織に対する作用を調べた。骨芽及び破骨細胞の活性の測定方法は Suzuki and Hattori (2002) により行った。

#### 2) 水酸化 PAH のカテプシン K 及び IGF-I mRNA の発現に対する影響

8 匹のキンギョのウロコを取り、前述と同様の方法により、ウロコを半分に切り、実験群と対照群とに分けた。なお、今回は 1 匹のキンギョにおいて、実験群と対照群との差を paired t-test で解析した。HEPES (20 mM) (pH 7.0) 及び抗生物質 (1%) を含む培地 (MEM, ICN Biomedicals Inc.) に 4-OHBaA ( $10^{-5}$  M) を添加し、水酸化 PAH の mRNA の発現に対する影響を解析した。哺乳類と同様にしてキンギョにおいても、カテプシン K は破骨細胞 (Azuma et al., 2007)、IGF-I は骨芽細胞 (Suzuki and Hattori,

2003)のマーカーとして有用であることは既に検証済なので、本研究では、これらのマーカーの発現を解析した。培養時間は6及び18時間で、17 $\beta$ -estradiolとの作用を比較した。培養後、ウロコからキアゲンのキットにより mRNA を抽出し、キアゲンのキットを用いて cDNA を合成した。その後、mRNA の発現に対する影響を Suzuki et al. (2004) の方法に従い、解析した。

## 【実験結果】

### 1) キンギョおよびベラの破骨細胞に対する水酸化 PAH の作用

6時間の培養において、4-OHBaA ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M)・3-OHBaA ( $10^{-5}$  M) は、キンギョの破骨細胞の活性を有意に抑制した。ベラにおいても4-OHBaA ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) と3-OHBaA ( $10^{-5}$  M) は破骨細胞の活性を抑制した。一方、E<sub>2</sub> ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) はキンギョの破骨細胞の活性を有意に上昇した。なお、1-OHPy は有意な変化は示さなかった。18時間の培養においても、4-OHBaA ( $10^{-5}$  M) はキンギョおよびベラの破骨細胞の活性を抑制した。一方 E<sub>2</sub> は、キンギョでは  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M において、ベラでは  $10^{-5}$  M において破骨細胞の活性を上昇させ、1-OHPy は破骨細胞の活性を変化させなかった。

### 2) キンギョおよびベラの骨芽細胞に対する水酸化 PAH の作用

キンギョおよびベラの骨芽細胞においても、4-OHBaA および3-OHBaA は活性抑制作用を示した(キンギョ: 6時間, 4-OHBaA ( $10^{-5}$  M), 3-OHBaA ( $10^{-5}$  M)、ベラ: 6時間, 4-OHBaA ( $10^{-5}$  M), 3-OHBaA ( $10^{-5}$  M))。一方、E<sub>2</sub> (キンギョ:  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M、ベラ:  $10^{-5}$  M) は骨芽細胞の活性を上昇した。なお、1-OHPy は有意な変化は示さなかった。18時間の培養においては、4-OHBaA はキンギョの骨芽細胞の活性を抑制する傾向がみられ、ベラでは有意に活性を低下させた(4-OHBaA ( $10^{-5}$  M), 3-OHBaA ( $10^{-5}$  M))。一方、E<sub>2</sub> (キンギョ:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M、ベラ:  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) は骨芽細胞の活性を上昇させ、1-OHPy は破骨細胞の活性を変化させなかった。

### 3) カテプシンK及びIGF-I mRNA の発現に対する水酸化 PAH の影響

4-OHBaA ( $10^{-5}$  M) は破骨細胞のマーカーであるカテプシンK及び骨芽細胞のマーカーである IGF-I mRNA の発現を抑制した。一方、E<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) はこれらの発現を上昇させた。

## 【まとめ】

1. 酵母 two-hybrid 法で強いエストロゲン様活性を示した 4-OHBaA 及び 3-OHBaA は共に、魚類のウロコの破骨細胞及び骨芽細胞の活性抑制作用があり、魚類においてこれらの水酸化 PAH はエストロゲンとは異なる作用が認められた。
2. 酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示さなかった 1-OHPy は、魚類のウロコの破骨細胞及び骨芽細胞のいずれにも影響を示さなかった。
3. 4-OHBaA は、破骨細胞及び骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現も抑制し、細胞の活性と同様の変化を確認できた。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費補助金(基盤研究(C) No. 18500375、代表:鈴木信雄)及び環境省 ExTEND 2005 基盤的研究(代表:早川和一)の援助により行われた。

## 引用文献

- 1) Azuma, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 362: 594-600 (2007).
- 2) Hayakawa, K. et al., J. Health Sci., 53: 562-570 (2007).
- 3) Suzuki, N. and Hattori, A., J. Pineal Res., 33: 253-258 (2002).
- 4) Suzuki, N. and Hattori, A., Life Sci., 73: 2237-2247 (2003).
- 5) Suzuki, N., et al., J. Bone Miner. Metab., 22: 439-446 (2004).
- 6) Suzuki, N., et al., Life Sci., 78: 2533-2541 (2006).