

Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/1103

ビスフェノールAはキンギョのウロコの破骨及び骨芽細胞の活性を抑制する

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish

ビスフェノールAは、主としてポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として使用され、食品の包装等に広く用いられている。最近、この物質は女性ホルモンであるエストロゲンのレセプターと結合し、エストロゲン様の作用を持ち、生殖を攪乱することがわかってきた。エストロゲンは骨にも作用するので、ビスフェノールAも骨代謝に影響を与えている可能性がある。

一方、骨を壊す細胞である破骨細胞と骨を作る細胞である骨芽細胞を共存させて培養することは難しい。これまでの骨代謝に関する研究は、それぞれの細胞を単独で培養し、ホルモン等に対する作用を調べられてきた。また破骨細胞が分化するには、骨芽細胞との相互作用が必要であることが最近明らかになってきた。両方の細胞を共存させて培養しなければ、これらの骨細胞に対する作用を正確に評価できないと考えられる。そこで私は、魚のウロコに注目した。

大部分の魚の脊椎骨は無細胞であり、ウロコからカルシウムを出し入れしている。ウロコには破骨及び骨芽細胞が共存し、ヒトの脊椎骨を薄く輪切りにしたような構造をしている。したがって、ウロコはヒトの脊椎骨のモデルになり、ビスフェノールA等の環境汚染物質の骨代謝に対する影響を評価できる可能性が高い。そこで、ウロコのアッセイ系を開発し、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を調べた。

キンギョのメス（体重30g前後）をMS222（Aldrich）で麻酔し、ウロコを採取した。そのウロコを1%の抗生物質を含むイーグルスの最少培地（大日本製薬）で2度洗浄した。その後ビスフェノールA（ 10^{-7} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養（15°C, 6時間）し、無添加のコントロールと比較した。同様にキンギョのメス（体重30g前後）からウロコを採取し、エストロゲン（ 10^{-7} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養し、無添加のコントロールと比較した。なお、ウロコは各培地に8枚ずつ入れ、その破骨及び骨芽細胞の活性を測定した。

本研究では、破骨細胞の活性として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRACP）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、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を評価した。これらはフォスファターゼなので基質としてパラニトロフェノールリン酸を用い、緩衝液の組成を変えることで測定可能である。本研究では、TRACP及びALP用の緩衝液として、それぞれ酒石酸（10mM）を含む0.1M酢酸緩衝液（pH5.3）及び塩化マグネシウム（1mM）を含む0.1Mトリス緩衝液（pH9.5）を用いた。

培養後、10%ホルマリンを含む0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）でウロコを固定し、蒸留水で洗浄し、0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）で保存（4°C）した。その後、ウロコの重量を測定し、96穴のマイクロプレートにウロコを入れ、そのウェルに前述の基質（10mM）を含む緩衝液（200µl）を入れ、インキュベートした（25°C, 1時間）。反応は2N水酸化ナトリウム（50µl）を加えることで停止し、そのウェルから150µlとり、別のマイクロプレートに移した。その後、マイクロプレートリーダーで測定（405nm）し、その吸光度からパラニトロフェノール量をあらかじめ作成しておいた標準曲線により求めた。

TRACP活性は、エストロゲンを添加すると、無添加のコントロール（5.2 nmol pNP produced x (mg

scale x h⁻¹) と比較して、10⁻⁷及び10⁻⁶ Mで有意に上昇した (6.2 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, *P*<0.05 ; 6.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, *P*<0.01) (Fig. 1)。一方、ビスフェノールA (10⁻⁵ M) を添加すると逆にその活性は低下し、無添加のコントロール (3.3 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹) よりも、低い値を示した (2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, *P*<0.01) (Fig. 1)。

ALPもエストロゲン (10⁻⁵ M) により上昇し (コントロール : 2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹ ; エストロゲン 4.1 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, *P*<0.05)、ビスフェノールA (10⁻⁵ M) により低下した (コントロール : 3.7 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹ ; ビスフェノールA : 2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, *P*<0.05) (Fig.2)。

以上のことから、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用はエストロゲンと異なっており、骨代謝に悪影響を与えていることが判明した。ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を明らかにしたのは、本研究が初めてであり、その機構の詳細を調べていきたい。

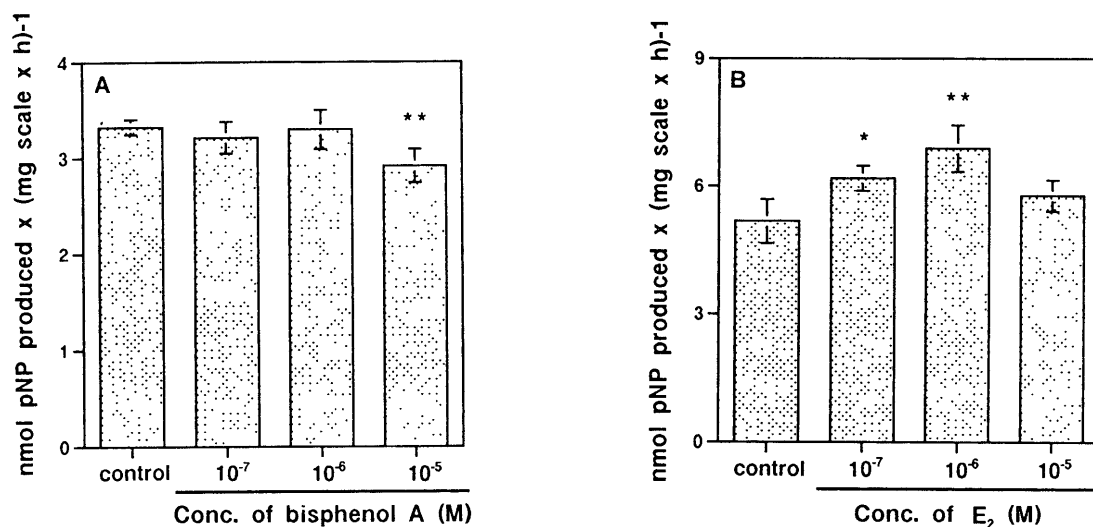


Fig 1 Effects of bisphenol A (A) and estrogen (E₂) (B) on TRACP activities in the cultured scales at 6 h. Values are means±SEM. *, ** indicate statistically significant differences at *P*<0.05 and *P*<0.01, respectively, compared with the values in the control scales.

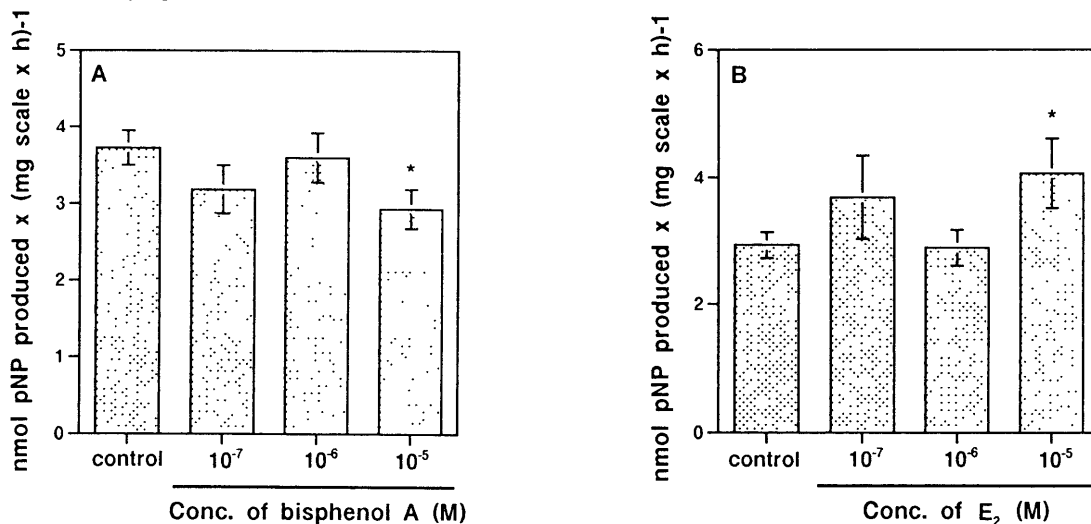


Fig 2 Effects of bisphenol A (A) and estrogen (E₂) (B) on ALP activities in the cultured scales at 6 h. Values are means±SEM. * indicates a statistically significant difference at *P*<0.05, compared with the values in the control scales.

謝辞

本研究は科学研究費、若手研究B (14740455) の援助により行われた。