

ISSN 1348-4656

金沢大学環日本海域環境研究センター

臨海実験施設  
研究概要・年次報告 第9号  
2010.4 ~ 2011.3



九十九湾で採集されたウミケムシ  
(*Chloeia flava*)

# 活 動 報 告

* 研究概要	2
* 研究業績	4
* 研究発表及び研究活動	5
* 研究交流	6
* 研究費	8
* 利用状況	9

## 【研究概要】

### 無脊椎動物及び脊椎動物の生理・生化学的研究

4年生の松本高大君は、笹山雄一教授の指導の下、マシコヒゲムシの幼若個体の栄養体を観察するため、複数回のドレッジによって、幼若個体を採集した。それらの体幅は0.48~0.11mmであり、栄養体を含む後環帯部までであったのは15個体のみであった。その内5個体の体幅は0.48~0.25mmであり、残りの10個体は0.18~0.11mmで、極めて細かった。これらの栄養体を観察した結果、体幅0.48mmの個体では栄養体が発達しているように観察されたが、DAPI染色で共生細菌がほとんど確認できなかった。体幅0.15mmの個体では、ヘマトキシリン・エオシン染色で栄養体が貧弱に見えてもDAPI染色で多数の共生細菌が確認できた。このように、体幅と共生細菌の存在の明確さの関係を調べると、少なくとも本観察の結果からは、幼若な個体ほど共生細菌が少ないということはなかった。成体では環帯より前の体表面から、周囲の環境にある多糖を単糖に分解して取り込み、栄養としている可能性が示されている。したがって、幼若個体においても共生細菌から栄養が補給されているのではなく、対表面から栄養が取り込まれているのかもしれない（研究報告参照）。

山岸功典君（4年生）は、笹山雄一教授及び鈴木信雄准教授の指導の下、ヌタウナギのカルシトニン様物質を研究した。これまで最古の脊椎動物として知られるヌタウナギ（*Eptatretus burgeri*）において鰓後腺は存在しないと言われているが、その血液中にカルシトニン様分子の存在が報告されている。そこで、ヌタウナギのカルシトニン様分子がどこで産生されているのかを調べた。ヌタウナギの消化管を、サケカルシトニンに対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に精査した。その結果、消化管全体にカルシトニンの抗体に反応する細胞が見つかり、カルシトニン様分子を産生する細胞が消化管全体に広く分布することが明らかになった。これまで、脊椎動物のキンギョにおいて鰓後腺に加えて、消化管前方部の上皮にカルシトニン産生細胞が混在することが報告されている。また、系統発生的に鰓後腺をもたない原索動物のナメクジウオの消化管の特定の部位においても、カルシトニンの抗体に反応する細胞の存在が知られている。これらのことを考え併せると、消化管が鰓後腺の起源である可能性が高い。今後、ヌタウナギのカルシトニンの構造決定を行う予定である（研究報告参照）。

軟骨魚類のアカエイのカルシトニン受容体のクローニングも笹山雄一教授と鈴木信雄准教授が中心に進めている。この研究は（財）サントリー生物有機科学研究所の佐竹 炎博士、同研究員 関口俊男博士との共同研究により行った。カルシトニン受容体の構造は、リガンドのカルシトニンと同様にして、硬骨魚類と哺乳類のカルシトニン受容体の中間的な配列だった。さらにカルシトニン受容体の発現解析を岡山大学附属牛窓臨海実験施設の坂本竜哉教授との共同研究により行った結果、希釈海水に移行した時の鰓や腎臓におけるカルシトニン受容体の発現が低下した。したがって、アカエイにおいてカルシトニンは浸透圧調節に関与している可能性が高い。これらの成果は、日本動物学会及び日本比較内分泌学会で発表し、Gene誌に投稿予定である。

副甲状腺ホルモンのカルシウム代謝に対する応答についても解析を行った。この研究は、鈴木信雄准教授が中心となり、オーストラリアのメルボルン大学のProf. T. John MartinとRMIT大学Dr. Janine A. Danks、東京医科歯科大学の服部淳彦教授、同大学の田畑 純准教授、岡山大学の山本敏男教授、同大学池亀美華准教授、早稲田大学の中村正久教授、当施設の笹山雄一教授との共同研究により進めている。国内外の共同研究により、以下のことがわかった。副甲状腺ホルモンはヒトと同様にまず骨芽細胞を活性化し、次いで破骨細胞を活性化して骨吸収を行うことを*in vitro*及び*in vivo*でも証明した。さらに骨芽細胞で発現しているリガンドであるReceptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) と破骨細胞にあるレセプターであるReceptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) のmRNA発現も副甲状腺ホルモンにより上昇することが判明した。これらの成果は、国際骨代謝学会の学会誌であるBone誌に発表した（研究報告参照）。

### 様々な物理的刺激に対する骨組織の応答に関する研究：魚類のウロコを用いた解析

魚のウロコを骨のモデルとして、物理的刺激やホルモン等の生理活性物質の骨に対する作用を調べ、その応答の多様性を鈴木准教授が中心となり研究を進めている。

本年度は国際宇宙ステーション「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマとして採択され、本年5月にスペースシャトル（アトランティス号）でキンギョのウロコが打ちあがり、野口聡一宇宙飛行士により、宇宙実験が実施された。僅か2年の準備期間で宇宙実験が行われたのは、ウロコという非常に優れた材料を用いたおかげである。ウロコは低温（4℃）でも約2週間保管可能であり、低温保管後も重力刺激に保管前と同様に応答する。現在、宇宙実験のサンプルの解析を行っている。来年度、骨計測学会、骨代謝学会、歯科基礎医学会等で宇宙実験の成果を発表する予定である。さらに本年、JAXAとの共催で金沢市民向けのシンポジウムを計画中である。来年度は、宇宙実験の成果を学会及びシンポジウム等で発表していく予定である。

宇宙実験では、新規メラトニン誘導体の作用についても解析している。この研究は、東京医科歯科大学の服部淳彦教授と金沢大学の染井正徳名誉教授との共同研究であり、2004年から継続して研究しているテーマである（J. Pineal Res., 2008a）。既に、国内特許は取得済（JP Patent 4014052号）であり、現在米国特許を出願中である。また、ハムリー（株）の関あずさ博士と共にメラトニン誘導体の卵巣除去ラット及び低Ca食ラットにおける影響を評価した。その結果、卵巣除去ラットおよび低Ca食ラットにおいて、メラトニン誘導体を経口投与することにより骨強度が上昇することが判明した（J. Pineal Res., 2008b）。したがって、この化合物は骨疾患の治療薬として有望である。これらの成果の一部は、金沢大学若手イノベーション発表会、福井で開催されたテクノフェア2010で発表した。さらに金沢大学イノベーション会議及び金沢大学の理学談話会でも講演した。

超音波の音圧による機械的刺激に対する応答について解析を行った。ヒトの骨折の治療に使用されている超音波治療機器（SAFHS: Sonic Accelerated Fracture Healing System）の骨に対する作用をゼブラフィッシュのウロコを材料として用いて解析した。その結果、破骨細胞の活性が低下し、骨芽細胞の活性が上昇した。さらに本年度は、JAXAの矢野幸子主任研究員、本学保健学類の北村敬一郎准教授、岡山大学池亀美華准教授、富山大学近藤 隆教授、同大学田淵圭章准教授、同大学高崎一朗助教との共同研究により、破骨細胞に対する作用を詳細に解析した。キンギョの筋肉内にキンギョのウロコを自家移植して、ウロコの表面に破骨細胞を誘導し、その破骨細胞に対する影響を解析した。その結果、超音波の刺激により、ウロコの破骨細胞がアポトーシスを起こしていることが判明した。超音波は骨の内部には浸透せず、骨の表面に作用する。骨折した骨の表面に超音波が作用するため、骨折にはその治癒効果が認められる。ウロコの骨芽細胞と破骨細胞は表面に存在することから、ウロコは超音波に対する骨の影響を解析する非常によいモデルである（Boneに投稿予定）。

### 海洋汚染に関する研究

金沢大学医薬保健研究域薬学系の早川和一教授と鈴木准教授との共同研究により、多環芳香族炭化水素類（PAH）の内分泌攪乱作用を調べている。多環芳香族炭化水素（PAH）類は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であり、その中にはベンゾ[a]ピレンのように発癌性/変異原性を有するものが多い。また、PAH類は原油にも含まれており、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。しかし、重油残留海域で採集した魚類に癌が見出された報告はこれまでなく、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。したがって、魚類に及ぼす重油の影響は発癌ではなく、骨代謝異常であることを強く示唆しているが、その発症機序は不明のままである。そこで、ウロコを用いてPAH類の骨に対する作用を解析した。ウロコの*in vitro*の培養系で解析した結果、水酸化PAH（P450により代謝されたPAHの代謝産物）の内分泌攪乱作用が、PAH自体よりも強いことが示唆された（Life Sci., 2009）。現在、富山大学遺伝子実験施設の田淵圭章准教授と高崎一朗助教との共同研究により、GeneChip解析を行い、詳細な機構を解析中である。これらの成果はBusan Symposium in Pukyong National University及びJENESYS-POMRAC-Kanazawa University Joint Symposium 2010、日本動物学会中部支部例会、日本薬学会で発表した。これらの成果の一部をJournal of Health Scienceに投稿予定である。

## 【研究業績】

### 1) 学術論文

- (1) Kitamura, K., Suzuki, N., Sato, Y., Nemoto, T., Ikegame, M., Yamamoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Furusawa, Y., Wada, S. and Hattori, A.: Osteoblast activity in the goldfish scale responds sensitively to mechanical stress. *Comp. Biochem. Physiol., part A*, 156: 357-363 (2010)
- (2) Mishra, D., Srivastav, S.K., Suzuki, N. and Srivastav, A.K.: Corpuscles of Stannius of a teleost *Heteropneustes fossilis* following intoxication with a pyrethroid (cypermethrin). *North-West. J. Zool.*, 6:203-208 (2010)
- (3) Kitamura, K., Chen, W., Zhu, X., Suzuki, N., Yano, S. and Nemoto, T.: Acceleration-based study of optimum exercise for human weight-bearing bones enhancement. *Biol. Sci. Space*, 24:83-90 (2010)
- (4) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T. and Tang, N.: Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 135: 231-241 (2010)
- (5) 鈴木信雄, 矢澤一良, 渡部和郎, 繁森英幸, 山田昭浩, 畠伸彦, 田中雅子, 前成美, 矢野純博, 稲葉信策, 中間俊彦, 笹山雄一: イカの皮に存在する生理活性物質及び色素. *日本海域研究*, 41: 1-5 (2010)
- (6) 鈴木信雄, 田畑純, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 根本鉄, 清水宣明, 笹山雄一, 染井正徳, 池亀美華, 中村正久, 近藤隆, 古澤之裕, 松田恒平, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬睦, 久保田幸治, 鈴木徹, 遠藤雅人, 竹内俊郎, 江尻貞一, 小萱康徳, 前田斉嘉, 内田秀明, 田谷敏貴, 林明生, 中村貞夫, 杉立久仁代, 芹野武, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究: 魚類のウロコにおけるホルモン応答. *Space Utilization Res.*, 26: 210-213 (2010)
- (7) Ngamniyom, A., Magtoon, W., Nagahama, Y. And Sasayama, Y.: Expression levels of bone morphogenetic protein 2b in fins of adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to sex steroid hormones. *J. Fisheries Aquatic Sci.*, 6: 119-129 (2011)
- (8) Asada, M., Nakabayashi, H. and Sasayama, Y.: Microscopic observation of Ito cells present in the livers of several species of teleost. *Nihon-Kaiiki Kenkyu*, 42: 1-8 (2011)
- (9) 北村敬一郎, 中野淳, 川部季美, 早川和一, 根本鉄, 大嶋雄治, 島崎洋平, 服部淳彦, 鈴木信雄: 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. *日本海域研究*, 42:27-34 (2011)
- (10) 鈴木信雄, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 根本鉄, 清水宣明, 笹山雄一, 染井正徳, 池亀美華, 田畑純, 中村正久, 近藤隆, 古澤之裕, 松田恒平, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬睦, 久保田幸治, 土屋美和, 谷川直樹, 吉馴重徳, 大嶋一成, 鈴木徹, 遠藤雅人, 竹内俊郎, 江尻貞一, 小萱康徳, 前田斉嘉, 内田秀明, 田谷敏貴, 林明生, 中村貞夫, 杉立久仁代, 芹野武, 嶋津徹, 矢野幸子, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究: ウロコ及び頭蓋骨に対する重力応答. *Space Utilization Res.*, 27: 209-212 (2011)
- (11) Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Ikegame, M., Sasayama, Y., Hattori, A., Nakamura, M., Tabata, M.J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav, A.K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K. and Martin T.J.: Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, 48: 1186-1193 (2011)
- (12) Suzuki, N., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Omori, K., Takada, K., Tabata, J.M., Kitamura, K., Endo, M., Wada, S., Srivastav, A.K., Chowdhury, V.S., Oshima, Y., and Hattori, A.: Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales *in vitro*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 56: 47-51 (2011)

- (13) Srivastav, A.K., Srivastav, B., Mishra, D., Srivastav, S.K. and Suzuki, N.: Calcitonin induced alterations in the ultimobranchial and parathyroid gland of garden lizard, *Calotes versicolor*. Turk. J. Zool., 35: 9-14 (2011)
- (14) Satone, H., Lee, J.M., Oba, Y., Kusakabe, T., Akahoshi, E., Miki, S., Suzuki, N., Sasayama, Y., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S., Honjo, T. and Oshima, Y.: Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. Aquatic Toxicol., 103: 79-84 (2011)
- (15) Ngamniyom, A. and Sasayama, Y.: Expression levels of sex hormone receptors in brains of Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Actinopterygii: Beloniformes: Adrianichthyidae). Acta Ichthyologica et Piscatoria, 41: 29-35 (2011)
- (16) Kobayashi, Y., Chiba, H., Mizusawa, K., Suzuki, N., Cerdá-Reverter, J.M. and Takahashi, A.: Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., in press

## 2) 総説・解説等

- (1) 三島弘幸, 北原正大, 服部淳彦, 鈴木信雄, 田畑 純, 奈良雅之, 笥 光男, 見明康夫: 歯の象牙質における成長線の周期性と生物リズムとの関連: メラトニンによる調節の可能性, 比較内分泌学, 36: 106-112 (2010)
- (2) 早川和一, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄: 多環芳香族炭化水素から見た海洋油汚染, 安全工学, 50: 85-92 (2011)
- (3) 鈴木信雄, 北村敬一郎, 清水宣明, 染井正徳, 笹山雄一, 大森克徳, 矢野幸子, 重藤祐子, 谷垣文章, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 池亀美華, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 中村正久, 井尻憲一, 田畑 純, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究, 平成22年度JAROS宇宙環境利用の展望, 第2章: 1-13 (2011)

## 3) 著書

- (1) 服部淳彦, 田畑 純, 鈴木信雄: 第3章 親子判別. 『身近な動物を使った実験4』, 鈴木範男編, 三共出版, 東京, 印刷中

## 【研究発表及び研究活動】

### 1) 研究発表及び講演会

- (1) 鈴木信雄, 矢澤一良, 渡部和郎, 繁森英幸, 山田昭浩, 畠 伸彦, 田中雅子, 前 成美, 矢野純博, 稲葉信策, 中間俊彦, 笹山雄一: イカの皮に存在する生理活性物質及び色素. 第24回海洋生物活性談話会. 広島大学, 広島県 (2010, 6/5-6)
- (2) Maeda, M., Hayashi, A., Nakamura, S., Serino, T., Kitamura, K. and Suzuki, N.: Scale metabolite profiling reveals differential changes in response to gravitational stress. 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, Utah (May 23 - 27, 2010)
- (3) Kitahara, M., Hattori, A., Suzuki, N., Tabata, M.J., Kakei, M., Miake, Y. and Mishima, H.: The relationship between the melatonin and the periodicity of incremental lines in the tooth dentin. 37th European Symposium on Calcified Tissues, Glasgow, United Kingdom (June 26-30, 2010)
- (4) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T. and Tang, N.: Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. Tenth International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Water Pollution, Intercontinental Hotel, Bucharest, Romania (June 9-11, 2010)
- (5) 鈴木信雄: キンギョのウロコを使って宇宙実験. 日本海イノベーション会議 2010年度第1回プログラム, 金沢大学, 石川県 (2010, 7/17) (基調講演)
- (6) 山岸功典, 鈴木信雄, 佐竹 炎, 笹山雄一: ヌタウナギのカルシトニンの一次構造決定の試み. 平成22年度日本動物学会中部支部大会, 岐阜大学, 愛知県 (2010, 7/24-25)
- (7) 鈴木信雄, 中野 淳, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦, 笹山雄一, 鳥羽 陽, 早川和一: 重油に含まれる多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用. 平成22年度日本動物学会中部支部大会, 岐阜大学, 愛知県 (2010, 7/24-25)

- (8) Kawabe, K., Suzuki, N. and Hayakawa, K.: Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish bone metabolism. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", Pusan National University (Busan, Korea)(September 2, 2010)
- (9) Nakano, J., Suzuki, N. and Hayakawa, K.: Development of the high sensitive bioassay system for analysis of bone metabolism using the regenerating scales. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", Pusan National University (Busan, Korea), (September 2, 2010)
- (10) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦, 笹山雄一, 鳥羽 陽, 早川和一: 水酸化多環芳香族水素類 (4-hydroxybenz[a]anthracene) の魚の骨代謝に対する作用. 重油に含まれる多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用. 平成 22 年度衛生薬学フォーラム, 星薬科大学, 東京都 (2010, 9/10-11)
- (11) 北村敬一郎, 陳 文西, 朱 欣, 鈴木信雄, 矢野幸子, 根本 鉄: 加速度計測に基づく過重負荷骨形成のための最適運動. 平成 22 年度宇宙生物科学会, 東北大学, 宮城県 (2010, 9/17-18)
- (12) 矢野幸子, 笠原春夫, 吉馴重徳, 田畑 純, 服部淳彦, 鈴木信雄: 宇宙空間における骨代謝制御: キンギョの培養ウロコを骨のモデルとした解析」 (Fish Scales) 冷蔵輸送の検討. 平成 22 年度宇宙生物科学会, 東北大学, 宮城県 (2010, 9/17-18 )
- (13) 鈴木信雄, 柿川真紀子, 山田外史, 田渕圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 和田重人, 廣田憲之, 北村敬一郎, 岩坂正和, 服部淳彦, 上野照剛: 交流磁場の骨形成促進作用: 再生ウロコを用いた *in vivo* の解析. 平成 22 年度宇宙生物科学会, 東北大学, 宮城県 (2010, 9/17-18)
- (14) 鈴木信雄, 関口俊男, 佐竹 炎, 加藤花野子, 西山雄大, 坂本竜哉, 兵藤 晋, 竹井祥郎, 柿川真紀子, 服部淳彦, 笹山雄一: アカエイにおけるカルシトニンの生理的役割. 第 81 回日本動物学会, 東京大学, 東京都 (2010, 9/23-25)
- (15) 丸山雄介, 鈴木信雄, 伊藤正則, 服部淳彦: 繁殖期の雌キンギョにおけるカルシウム代謝に対するメラトニンの作用. 第 81 回日本動物学会, 東京大学, 東京都 (2010, 9/23-25)
- (16) 鈴木信雄: 宇宙実験による新規骨疾患治療薬の研究開発. 金沢大学若手研究者シーズ発表会, 金沢大学, 石川県 (2010, 11/4)
- (17) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一: 再生ウロコの振動分光学研究. 日本分光学会年次講演会, 京都大学, 京都府 (2010, 11/18-20)
- (18) 鈴木信雄, 関口俊男, 佐竹 炎, 加藤花野子, 西山雄大, 高橋英也, 御輿真穂, 坂本竜哉, 兵藤 晋, 柿川真紀子, 服部淳彦, 笹山雄一: アカエイのカルシトニンファミリー受容体のクローニングと発現解析. 第 35 回日本比較内分泌学会大会, 静岡大学, 静岡県 (2010, 11/18-20)
- (19) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用. 平成 22 年度日本薬学会北陸支部 第 122 回例会, 北陸大学, 石川県 (2010, 11/21)
- (20) 鈴木信雄, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 根本 鉄, 清水宣明, 笹山雄一, 西内 巧, 染井正徳, 池亀美華, 田畑 純, 中村正久, 近藤 隆, 古澤之裕, 松田恒平, 田渕圭章, 高崎一朗, 和田重人, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬 睦, 久保田幸治, 土屋美和, 谷川直樹, 吉馴重徳, 大嶋一成, 鈴木 徹, 遠藤雅人, 竹内俊郎, 江尻貞一, 小萱康徳, 前田斉嘉, 内田秀明, 田谷敏貴, 林 明生, 中村貞夫, 杉立久仁代, 芹野 武, 嶋津 徹, 矢野幸子, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究: ウロコと頭蓋骨に対する重力応答. 第 27 回宇宙利用シンポジウム, 宇宙航空研究開発機構・相模原キャンパス, 神奈川県 (2011, 1/24-25)
- (21) 谷内口孝治, 鈴木信雄, 早川和一: 無機水銀は魚のウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性を抑制する. 第 45 回日本水環境学会, 北海道大学, 北海道 (2011, 3/18-20)
- (22) 川部季美, 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族炭化水素類がキンギョの再生ウロコに及ぼす影響の *in vivo* 解析. 第 131 回日本薬学会年大会, 静岡大学, 静岡県 (2011, 3/28-31)

## 【研究交流】

### 1) 共同研究

- (1) 笹山雄一: タイ・バンコク郊外におけるメダカの雌雄性を指標にした環境汚染の研究, 国立スリナカリンウイロット大学 (タイ) Dr. Wichian Magtoon
- (2) 笹山雄一: メダカの鱗の形成に及ぼす性ホルモンの研究, 愛媛大学社会連携推進機構教授 長濱義孝氏

- (3) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体のバクテリオサイト微細構造の研究，島根大学生物資源科学部教授 松野あきら氏
- (4) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体の脂肪酸組成の研究，東京学芸大学教授 三田雅敏氏
- (5) 鈴木信雄：魚類の副甲状腺ホルモンに関する研究，メルボルン大学（オーストラリア）Prof. T. John Martin、RMIT 大学（オーストラリア）Dr. Janine A. Danks
- (6) 鈴木信雄：魚類のカルセミックホルモン（カルシトニン、ビタミン D、スタニオカルシン）に関する研究，ゴラクプール大学（インド）Prof. Ajai K. Srivastav
- (7) 鈴木信雄：メラトニンの骨代謝に関する研究，東京医科歯科大学教授 服部淳彦氏，九州大学大学院農学研究院准教授 安東宏徳氏
- (8) 鈴木信雄：重金属の骨芽・破骨細胞に及ぼす影響：ウロコのアッセイ系による解析，国立水俣病研究センター主任研究員 山元 恵氏，東京慈恵会医科大学医学部准教授 高田耕司氏
- (9) 鈴木信雄：ニワトリのカルシトニンレセプターのクローニングとその発現に関する研究，新潟大学農学部准教授 杉山稔恵氏
- (10) 鈴木信雄：ウロコの破骨細胞に関する研究，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授 山本敏男氏，同准教授 池亀美華氏
- (11) 鈴木信雄：プロラクチンの骨組織に対する作用，岡山大学理学部附属臨海実験所教授 坂本竜哉氏，北里大学水産学部教授 高橋明義氏，同教授 森山俊介氏
- (12) 鈴木信雄：再生ウロコに関する研究，北海道大学大学院水産科学研究院教授 都木靖章氏，東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科准教授 田畑 純氏
- (13) 鈴木信雄：円口類と軟骨魚類のカルシトニンの構造決定，東京大学海洋研究所教授 竹井祥郎氏，同准教授 兵藤 晋氏
- (14) 鈴木信雄：交流磁場の骨代謝に及ぼす影響，九州大学大学院工学研究院特任教授 上野照剛氏，千葉大学 工学部准教授 岩坂正和氏
- (15) 鈴木信雄：魚類の鰓後腺に存在するエストロゲンレセプターに関する研究，早稲田大学教育学部名誉教授 菊山 榮氏，早稲田大学人間総合研究センター研究員 山本和俊氏
- (16) 鈴木信雄：ヒラメの初期発生におけるカルシトニンの作用，東北大学農学研究科教授 鈴木 徹氏，独立行政法人水産総合研究センター 東北区水産研究所 資源生産部 増養殖管理グループ長 黒川忠英氏
- (17) 鈴木信雄：脂肪酸の石灰化に対する作用，富山大学 和漢薬研究所教授 浜崎智仁氏
- (18) 鈴木信雄：超音波の骨代謝に及ぼす影響，富山大学大学院医学薬学研究部教授 近藤 隆氏，同大学 医学部講師 和田重人氏，JAXA 主任研究員 矢野幸子氏
- (19) 鈴木信雄：ウロコの破骨細胞で発現している遺伝子の解析，早稲田大学教育学部教授 中村正久氏
- (20) 鈴木信雄：重力及び微小重力の骨組織に対する作用，東京大学 アイソトープ総合センター教授 井尻憲一氏
- (21) 鈴木信雄：歯の石灰化に関する研究，高知学園短期大学教授 三島弘幸氏
- (22) 鈴木信雄：静磁場の骨代謝に及ぼす影響，独立行政法人 物質・材料研究機構 強磁場研究センター 主任研究員 廣田憲之氏，同研究センター 特別研究員 木村史子氏
- (23) 鈴木信雄：インドール化合物の抗菌活性及び植物の根の成長促進作用に関する研究，富山大学大学院理工学研究部客員教授 神坂盛一郎氏，同准教授 唐原一郎氏
- (24) 鈴木信雄：魚のウロコを用いた宇宙生物学的研究，宇宙航空研究開発機構主任研究員 大森克徳氏，同主任研究員 矢野幸子氏，富山大学大学院理工学研究部教授 松田恒平氏
- (25) 鈴木信雄：トリプチルスズの海域汚染に関する研究，九州大学大学院農学研究院教授 大嶋雄治氏，同助教 島崎洋平氏
- (26) 鈴木信雄：インドール化合物のラットの骨代謝に及ぼす影響，ハムリー（株）国際事業部部長 関あずさ氏
- (27) 鈴木信雄：魚類の骨代謝におけるビタミンKの作用，神戸薬科大学教授 岡野登志夫氏，同講師 中川公恵氏
- (28) 鈴木信雄：魚のウロコで発現している遺伝子のメカニカルストレスに対する応答，富山大学生命科学先端研究センター 遺伝子実験施設 准教授 田淵圭章氏，同助教 高碓一朗氏
- (29) 鈴木信雄：耳石の石灰化に対するメラトニンの作用，茨城県立医療大学教授 大西 健氏
- (30) 鈴木信雄：海産魚類及び海産無脊椎動物のカルシトニンの構造進化及び作用進化に関する研究，(財)サントリー生物有機科学研究所・第二研究部部长・主幹研究員 佐竹 炎氏，同研究員 川田剛士氏，同研究員 関口俊男氏
- (31) 鈴木信雄：海洋細菌に関する研究，富山大学生物圏地球科学科教授 中村省吾氏，同准教授 田中大祐氏



## 2) 各種活動

### 社会活動

- (1) 笹山雄一：石川県原子力発電温排水検討委員会委員，2000-現在
- (2) 笹山雄一：のと海洋ふれあいセンター研究報告編集委員会委員，1994-現在
- (3) 笹山雄一：石川県公共事業評価監視委員会委員，2005-現在
- (4) 鈴木信雄：石川県環境影響評価委員会委員，2010-現在

### 学会活動

- (1) 鈴木信雄：日本動物学会中部支部代議員，2008-2010

## 【研究費】

### 1) 科学研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），基盤研究（C），磁場と骨代謝調節ホルモンとの相乗効果を利用した新規骨疾患治療システムの開発，1,100,000 円。
- (2) 鈴木信雄（分担），基盤研究（C），ナノ粒子を利用した特異的温度制御による口腔癌治療（代表：和田重人，富山大学）分担金 2010 年 50,000 円（2009 年の直接経費 total 500,000 円）
- (3) 鈴木信雄（分担），基盤研究（B），多環芳香族炭化水素類が環境・生体で新たに獲得する毒性に関する戦略研究（代表：早川和一，金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）分担金 2010 年 200,000 円（2010 年の直接経費 total 2,600,000 円）
- (4) 鈴木信雄（分担），挑戦的萌芽研究，重油汚染海水で孵化した魚の脊柱彎曲は多環芳香族炭化水素が原因か？分担（代表：早川和一，金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）分担金 2010 年 700,000 円（2009 年の直接経費 total 1,600,000 円）
- (5) 鈴木信雄（分担），二国間交流事業，東アジアにおける多環芳香族炭化水素類の挙動と毒性（代表：鳥羽 陽，金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授）（2010 年，1,200,000 円）
- (6) 鈴木信雄（分担），厚生労働省科学研究費，化学物質リスク研究事業，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．分担金 2010 年 2,000,000 円（代表：早川和一、金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）

### 2) 受託研究費

- (1) 鈴木信雄（分担），環境省 ExTEND2005 フィージビリティースタディー，多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の構造活性相関に基づく魚鱗の化学物質スクリーニング法に関する研究．（代表：早川和一、金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授），2010 年 2,000,000 円
- (2) 鈴木信雄（分担），環境省 地球環境推進費 H21 地球環境問題対応型研究課題，日本海域における有機汚染物質の潜在的脅威の把握，（代表：早川和一、金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）2010 年 42,931,000 円

### 3) 共同研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），宇宙航空研究開発機構，宇宙空間における骨代謝制御：キンギョの培養ウロコを骨のモデルとした解析，5,572,350 円
- (2) 鈴木信雄（代表），宇宙航空研究開発機構 宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ活動支援，魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究，2,646,000 円

### 4) 奨学寄附金

- (1) 鈴木信雄（代表），（財）クリタ水・環境科学振興財団助成金，骨代謝異常を評価する迅速・高感度なシステムの開発：重油汚染海域における魚の脊柱彎曲の発症機構の解明．2009 年 10 月～2010 年 9 月 750,000 円

## 【受賞】

- (1) 山岸功典：平成22年度日本動物学会中部支部大会，優秀発表賞。

## 【新聞発表】

- (1) 鈴木信雄，平成22年5月3日（北陸中日新聞）、5月12日及び16日（北國新聞）：「きぼう」の国際宇宙ステーションを用いた宇宙実験を平成22年5月中旬に決定した事に関する記事。
- (2) 鈴木信雄，平成22年5月8日（北國新聞）：イカの皮の有効利用に関する記事。
- (3) 鈴木信雄，平成22年7月18日及び8月31日（北國新聞）：日本海イノベーション会議2010年度第1回プログラム。

## 【利用状況】

### 1) 来訪者及び研究目的

4 / 1 5	のと海洋ふれあいセンター 東出 幸真 主任技師 他1名 「海洋生物の採集」
5 / 1 4	富山県立砺波高校 松原 禎弘 教諭 他1名 「実習の打ち合わせ」
5 / 1 6	のと海洋ふれあいセンター 横井 将人 主事 他1名 「海洋生物の調査」
6 / 1 2	のと海洋ふれあいセンター 東出 幸真 主任技師 他1名 「海洋生物の採集」
6 / 1 8 ~ 6 / 2 0	スーパーサイエンスハイスクール 「海洋生物の観察」七尾高校
6 / 2 4 ~ 6 / 2 5	神戸大学バイオシグナル研究センター 吉野 健一 助教 「棘皮動物の細胞内情報伝達に関する研究のため」
6 / 2 5 ~ 6 / 2 6	金沢大学環日本海域環境研究センター 中村 浩二 教授 他29名 「能登半島の里山里海体験実習」

- 7 / 1 5 のと海洋ふれあいセンター  
横井 将人 主事 他 1 名  
「海洋生物の調査」
- 7 / 2 8 金沢大学理工研究域自然システム学系  
神谷 隆宏 教授 他 5 名  
「試料採集のため」
- 8 / 1 1 金沢大学環日本海域環境研究センター  
中村 浩二 教授 他 2 0 名  
「能登半島の里山里海体験実習」
- 8 / 1 7 のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 主任技師 他 1 名  
「海洋生物の採集」
- 8 / 1 9 ~ 8 / 2 0 東京医科歯科大学  
田畑 純 准教授 他 9 名  
「宇宙実験の研究打ち合わせ」
- 8 / 2 7 金沢大学理工研究域自然システム学系  
加藤 道雄 教授 他 3 名  
「試料採集のため」
- 8 / 2 7 のと海洋ふれあいセンター  
谷内口 孝治 館長  
「研究打ち合わせ」

9 / 17

のと海洋ふれあいセンター  
横井 将人 主事 他1名  
「海洋生物の調査」

10 / 14

のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 主任技師 他1名  
「海洋生物の採集」

10 / 22

東京海洋大学  
藤田 大介 准教授  
「視察のため」

11 / 4

富山大学理学部  
中村 省吾 教授 他1名  
「研究打ち合わせ」

11 / 13

のと海洋ふれあいセンター  
横井 将人 主事 他1名  
「海洋生物の調査」

11 / 30

金沢大学理工研究域自然システム学系  
加藤 道雄 教授 他5名  
「試料採集のため」

12 / 14

のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 主任技師 他1名  
「海洋生物の採集」

1 / 14

のと海洋ふれあいセンター

横井 将人 主事 他1名

「海洋生物の調査」

1 / 27

富山県立大学工学部

楠井 隆史 教授 他1名

「演習のため」

2 / 15

のと海洋ふれあいセンター

東出 幸真 主任技師 他1名

「海洋生物の採集」

3 / 15

のと海洋ふれあいセンター

横井 将人 主事 他1名

「海洋生物の調査」

3 / 28 ~ 3 / 30

東京海洋大学

藤田 大介 准教授 他16名

「日本藻類学会第35回富山大会エクスカージョン観察会」

## 2) 臨海実習

7 / 6 ~ 7 / 7

富山県立砺波高校

松原 禎弘 教諭 他 4 5 名

「ウニの初期発生の研究および磯の生物調査」

8 / 7 ~ 8 / 8

金沢大学理工研究域自然システム学系

中村 浩二 教授 他 3 2 名

「臨海実習」

8 / 1 0 ~ 8 / 1 4

福井大学教育地域科学部

前田 柁夫 教授 他 1 名

「臨海実習」

8 / 2 2 ~ 8 / 2 7

金沢大学環日本海域環境研究センター

笹山 雄一 教授 他 5 名

「公開臨海実習」

9 / 9

金沢工業大学バイオ化学部

藤永 薫 教授 他 3 6 名

「臨海実習」

9 / 2 4 ~ 9 / 2 6

富山大学理工学研究部

竹内 章 教授 他 1 7 名

「野外実習Ⅱ」

9 / 2 6 ~ 9 / 2 8

金沢大学理工研究域

田岡 東 助教 他 3 1 名

「臨海実習」

### 3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成22年度臨海実験施設利用者数（延べ人数916人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	0	2	0	0
5	0	4	0	0
6	0	40	0	168
7	1	26	5	120
8	6	30	139	43
9	4	18	95	82
10	3	11	2	0
11	1	12	5	0
12	0	11	0	0
1	0	10	0	1
2	0	9	10	0
3	0	28	0	30
合計	15	201	256	444

平成22年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ
4	2	6
5	4	4
6	1	5
7	3	4
8	6	4
9	2	3
10	2	4
11	4	5
12	3	4
1	5	4
2	2	3
3	2	3
合計	36	49

## 研究報告

\* キンギョのウロコに対するフグ副甲状腺ホルモン1の作用: *in vitro*及び*in vivo*  
の実験による解析  
鈴木信雄 (p 16-17)

\* キンギョのウロコの骨芽細胞・破骨細胞に対する多環芳香族炭化水素類の影響  
中野 淳, 鈴木信雄, 早川和一 (p 18-19)

\* ヌタウナギのカルシトニン様分子の産生細胞の特定  
山岸功典, 鈴木信雄, 笹山雄一 (p 20)

\* マシコヒゲムシの幼若個体の栄養体における共生細菌の観察  
松本高大, 笹山雄一 (p 21)

\* 無機水銀のキンギョの骨芽細胞及び破骨細胞活性に及ぼす影響:  
ウロコのアッセイ系による解析  
谷内口孝治, 鈴木信雄, 早川和一 (p22-23)



# キンギョのウロコに対するフグ副甲状腺ホルモン1の作用： *in vitro*及び*in vivo*の実験による解析

鈴木信雄

〒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

Nobuo SUZUKI: Effects of fugu parathyroid hormone 1 on the scales of goldfish: Analysis with both *in vitro* and *in vivo* experiments

副甲状腺は脊椎動物が陸上への進化の過程で生じた内分泌腺であり、魚類には存在しないと考えられてきた。一方、Danks et al. (2003)<sup>1)</sup>がフグの副甲状腺ホルモン (PTH) の構造を決定して、ヒトのPTH受容体にフグPTHが結合することを証明した。さらにHogan et al. (2005)<sup>2)</sup>がゼブラフィシユの側線の感丘細胞にPTHが強く発現していることを報告した。側線の感丘細胞は、ウロコの中にあるので、感丘細胞で作られたPTHがウロコに作用している可能性がある。そこで本研究では、*in vitro*と*in vivo*の実験を行い、キンギョのウロコに対するPTHの作用を解析した。

## 【実験1】フグPTHとヒトPTHの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用：ウロコのアッセイ系による解析 (*in vitro*の実験)

フグPTH及びヒトPTH (1 pg/ml~10 ng/ml) を培地 (血清なしのMEM) に添加して6時間及び18時間培養した後、ALP及びTRAP活性を測定した。

フグPTH及びヒトPTHも6時間の培養において、ALP活性を上昇させた。フグPTHは100 pg/mlでもALP活性を上昇させ、キンギョのウロコではヒトPTHよりも応答性が良かった。18時間培養でも同様にALP活性を上昇させたが、上昇率は6時間培養よりも低かった。

フグPTH及びヒトPTHも6時間の培養においては、TRAP活性を変化させず、18時間培養においてTRAP活性を上昇させた。18時間培養では、ALPと同様にして、フグPTHは100 pg/mlでもTRAP活性を上昇させ、キンギョのウロコではヒトPTHよりも応答性が良かった。

ALP及びTRAP活性はそれぞれ骨芽細胞と破骨細胞の活性の指標として使用されているので、ウロコにおいても、まずPTHは骨芽細胞に作用して、その後破骨細胞の活性を上昇している可能性がある。

## 【実験2】骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関する解析 (*in vitro*の実験)

最近、哺乳類において、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関係する遺伝子が明らかにされた。この遺伝子は骨芽細胞で特異的に発現しているReceptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)と破骨細胞で発現しているReceptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK)である。特に破骨細胞は、多核の活性型に誘導するために、骨芽細胞からの連絡が必要であり、RANKLがリガンドとなり、破骨細胞のレセプターであるRANKと結合しなければ多核の活性型に誘導されない。これらの遺伝子は、哺乳類でしかクローニングされていなかったが、我々はキンギョのウロコからcDNAの全長のクローニングに成功した。この遺伝子の発現を解析することで、骨芽細胞と破骨細胞とのクロストークの解析が可能となった。そこでフグPTH1 (10 ng/ml) 入りの培地で6時間及び18時間培養時におけるRANK及びRANKL mRNAの発現を解析した。フグPTHによりRANK及びRANKL mRNAの発現が共に上昇することがわかった。さらにRANKの発現は18時間で顕著に上昇し、6時間培養の方がRANKLの発現は上昇率が大きかった。これらの結果は、実験1で得られた結果と一致していた。

### 【実験3】キンギョPTH受容体の部分配列の決定及びウロコにおける発現解析 (*in vitro*の実験)

哺乳類とゼブラフィッシュのPTH受容体の配列において、よく保存されている領域からプライマーを設計してNested PCRを行った。その結果、キンギョのウロコからPTH1R及びPTH2Rの部分配列を決定した。さらにこれらの配列を基にして特異的プライマーを作成して発現解析を行った結果、PTH1Rの発現のほうがPTH2Rの発現よりも高いことがわかった。

### 【実験4】フグPTHの破骨細胞の分化に対する影響：筋肉内自家移植により破骨細胞を誘導したシステムによる解析 (*in vitro*の実験)

最近我々は、キンギョの筋肉内にウロコを自家移植して、移植したウロコの表面に破骨細胞を誘導することに成功した<sup>3)</sup>。このシステムを用いて、フグPTHによる破骨細胞の分化（単核細胞から多核細胞への分化）に対する作用を解析した。

キンギョの筋肉内にウロコを自家移植して3日後のウロコを半分に切り、実験群と対照群に分け、実験群にフグPTH（10 ng/ml）を添加して*in vitro*で培養し、24及び48 時間後のウロコの単核と多核の破骨細胞の割合を測定した。その結果、PTHにより単核から多核への誘導が進行していることが判明した。さらに多核の破骨細胞を電子顕微鏡で微細構造を解析した結果、Ruffled Border (RB) やClear Zoneも観察され、活発に骨吸収を行っている破骨細胞が観察された。したがって、魚類においてもPTHは骨吸収能をもつ多核の破骨細胞を誘導することが明らかになった。

### 【実験5】キンギョのウロコのALP及びTRAP活性、血清Ca濃度に対するフグPTHの作用 (*in vivo*の実験)

未成熟なキンギョの腹腔内にフグPTH（500ng/g body weight）を投与して、1、2、3及び4日後に血液中のカルシウム濃度を測定した。その後、血液中のカルシウム濃度が最も高いタイムコースにおいて、ウロコ中のカルシウム含量、ウロコのALP及びTRAP活を測定した。

PTH投与後1、2及び3日後において、有意に血液中のカルシウム濃度が上昇した。その中で2日目の上昇率が大きかった。そこで、2日目のウロコのカルシウム含量、ウロコのALP及びTRAP活性を測定した。その結果、ウロコのALP及びTRAP活性はPTHを投与することにより有意に上昇した。TRAP活性が上昇した結果としてウロコ中のカルシウム含量は低下した。したがって、*in vitro*と同様にPTHがウロコの骨芽細胞及び破骨細胞作用して、PTHがキンギョのカルシウム代謝に関与していることを示している。

### 【引用文献】

- 1) Danks, J.A. et al., J. Bone Miner. Res., 18:1326-1331 (2003)
- 2) Hogan, B.M. et al., Endocrinology, 146: 547-551 (2005)
- 3) Takahashi, H. et al., Zool. Sci., 25: 739-745 (2008)

### 【謝辞】

本研究の一部は、科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費、（財）クリタ水・環境科学振興財団助成金、環境省 地球環境推進費及びExtend 2005の研究助成、宇宙航空研究開発機構の研究助成の援助により行われた。本研究の内容は、Bone 誌に発表した。国内外の共同研究者にお礼申し上げる。

## キンギョのウロコの骨芽細胞・破骨細胞に対する多環芳香族炭化水素類の影響

中野 淳<sup>1</sup>, 鈴木信雄<sup>2</sup>, 早川和一<sup>1</sup>

<sup>1</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; <sup>2</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

Jun NAKANO<sup>1</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>2</sup>, Kazuichi HAYAKAWA<sup>1</sup>: Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on osteoblasts and osteoclasts of goldfish

### 【背景・目的】

多環芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH) 類は原油中に含まれており、タンカー等の原油流出事故は大規模な海洋汚染を引き起す。実際に原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が、その発症機序は不明である。そこで魚の骨代謝に及ぼす PAH の影響を評価する方法として、魚類のウロコに注目した。魚類のウロコは、骨基質タンパク上に骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞が共存しており、シンプルな骨のモデルである。したがってウロコを用いれば、PAH が魚類の骨代謝に与える影響を評価できる可能性が高い。本研究では、以下の項目について研究した。

- ① 魚の骨芽細胞及び破骨細胞に対する PAH の作用を解析するためのバイオアッセイ系の開発
- ② 開発したバイオアッセイ系を用いた PAH の魚の骨代謝に対する作用の解析
- ③ PAH 代謝物の解析 : PAH を投与したキンギョの胆汁中の代謝物の測定

### 【実験① : 魚の骨芽細胞及び破骨細胞に対する PAH の作用を解析するためのバイオアッセイ系の開発】

ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞活性のより精度の高い測定法として、従来の単位体積あたりの活性測定法ではなく、単位面積あたりの活性測定法を開発した。また、ウロコは非常に再生能力の高い器官であり、抜去しても再生する。再生ウロコの形態学的観察から、通常ウロコでは見られない多核の破骨細胞が誘導され、骨代謝が活性化していた。この再生ウロコを用いて骨形成過程の骨芽細胞及び破骨細胞活性の変化を解析できるモデルとして最適な条件を決定した。

その結果、従来の重量当たりの酵素活性測定では、できるだけ同程度の大きさのウロコを選別して使用する必要があっが、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の値となった。またウロコを採取する部位による活性の違いも見られ、比較するウロコの位置も重要だということがわかった。また、再生ウロコの方が通常のウロコよりも E<sub>2</sub> の影響をより感度良く評価できることが分かった。さらにこれらの作業をコンピューターにより自動解析ができるようにした結果、感度、精度及び再現性が向上したシステムを構築できた。

### 【実験②：開発したバイオアッセイ系を用いた PAH の魚の骨代謝に対する作用の解析】

PAH はヒトエストロゲン受容体 (Human estrogen receptor : hER) に結合しないが、モノヒドロキシ多環芳香族炭化水素 (OHPAH) 類は結合活性を示すことを明らかにした<sup>1)</sup>。そこで①で開発したウロコのアッセイ系を用いて、E<sub>2</sub> と OHPAH の作用を比較した。

再生ウロコを10<sup>-6</sup> mol/L の濃度の E<sub>2</sub> で処理すると骨芽細胞活性は 6 時間後に上昇し、破骨細胞は 10<sup>-8</sup>~10<sup>-10</sup> mol/L で活性が上昇した。また 4-Hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) は 6 時間で骨芽細胞、破骨細胞ともに活性が上昇し、破骨細胞で10<sup>-10</sup> mol/Lの濃度まで変化を感知することができた。一方 4-OHBaA の未代謝物である Benz[a]anthracene (BaA) は6 時間より遅れて、12 時間で破骨細胞活性の上昇が起こった。さらに、4-OHBaA は、ウロコの細胞には毒性を示さなかったことから、4-OHBaAのエストロゲン様作用はエストロゲン受容体等を介した内分泌かく乱作用の可能性が高い。

### 【実験③：PAH 代謝物の解析：PAHを投与したキンギョの胆汁中の代謝物の測定】

②において、4-OHBaAが内分泌かく乱作用を持つことが判明した。そこで次に、この代謝産物が実際にキンギョの体内で産生されることを証明した。即ち、キンギョに BaA (5 µg/g BW) を腹腔内投与して、胆汁中の 4-OHBaA 濃度を HPLC を用いて測定した。

その結果、4-OHBaA は、BaA 投与後 12時間でも検出され、48 時間で最も高い濃度 (16.96 mol/L) が検出された。したがって、代謝酵素 (CYP1A1) によりBaA が 4-OHBaA となり、魚の骨代謝に影響を及ぼしている可能性がある。

### 【結論】

重油中には BaA を含む多量の PAH が含まれている。本研究の結果より、重油中の PAH が体内に入り、CYP1A1により生じた水酸化体が内分泌攪乱作用を持ち、それが重油による魚の骨代謝異常の原因の一つであると推測された。

### 【引用文献】

- 1) Hayakawa, K. et al. J. Health Sci., 53: 562-570 (2007)

### 【謝辞】

本研究の一部は、科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費、(財)クリタ水・環境科学振興財団助成金、環境省 地球環境推進費及びExtend 2005の研究助成、宇宙航空研究開発機構の研究助成の援助により行われた。

(本研究は、金沢大学大学院 自然科学研究科 薬学系の中野 淳君の修士論文の一環として行われた)

## ヌタウナギのカルシトニン様分子の産生細胞の特定

山岸功典, 鈴木信雄, 笹山雄一

〒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

Katsunori, YAMAGISHI, Nobuo SUZUKI, Yuichi SASAYAMA: Detection of the calcitonin-producing cells in hagfish, *Eptatretus burgeri*

カルシトニンは血中カルシウム濃度の低下作用を有するペプチドホルモンであり、哺乳類では甲状腺のC細胞から、それ以外の脊椎動物では鰹後腺と呼ばれる内分泌器官から分泌される。これまで最古の脊椎動物として知られるヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) において鰹後腺は存在しないと言われているにもかかわらず、その血液中にカルシトニン様分子の存在が知られている。したがって、本研究ではまずヌタウナギのカルシトニン様分子がどこで産生されているのかを明らかにすることにした。

これまで、脊椎動物のキンギョにおいて鰹後腺に加えて、消化管前方部の上皮にカルシトニン産生細胞が混在することが報告されている。また、系統発生的に鰹後腺をもたない原索動物のナメクジウオの消化管の特定の部位においても、カルシトニンの抗体に反応する細胞の存在が知られている。これらのことを考え併せると、本種においてもカルシトニン様分子が消化管で産生されている可能性がある。本研究ではヌタウナギの消化管を、サケカルシトニンに対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に精査した。消化管全体をその長さに沿って8分割して、各部位についてパラフィン切片を作り、一次抗体で一晩インキュベートした。翌日、蛍光標識二次抗体でインキュベートし、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、その8つの部位のどこにおいてもカルシトニンの抗体に反応する細胞が見つかり、カルシトニン様分子を産生する細胞が消化管全体に広く分布することが明らかになった。

次に、ヌタウナギのカルシトニン様分子の一次構造を決定するために、その精製を試みた。血液中にも大量のカルシトニン様分子が存在することが知られているため、消化管からではなく血液からその純化を試みた。ヌタウナギの血漿を酢酸とアセトンで処理し、分子ふるいにかけて、分子量1万以上の分子を除いた。逆相のHPLCを用いてアセトニトリルの濃度で60分間に20-80%のグラデーションをかけ、2mlずつ分取した。それらをSDS-PAGEで流し分子量ごとに分離させ、免疫染色と同じ抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、ポジティブコントロールとして用いたサケ・カルシトニンと同じ位置にあるバンドが陽性の反応を示した。このバンドはアセトニトリルの濃度で34-37%のフラクションであった。この濃度はこれまでサケ、イワシおよびアカエイのカルシトニンが溶出される位置で、カルシトニン様分子の分子量はそれらのカルシトニンと同じく約3500付近であると推測された。したがって、このフラクションを集め、それをアセトニトリルの濃度で50分間に25-50%のグラデーションをかけた逆相のHPLCで分画し、ピークtoピークで分取した。各ピークをドットブロットにより分析したところ、アセトニトリルの濃度で約37%付近のピークに陽性の反応が検出された。したがって、この画分にカルシトニン様分子が含まれると思われる。しかしながら、アミノ酸シーケンサーにかけるほどのサンプル量は無かったため、再びその量を増やし、ヌタウナギのカルシトニンの一次構造を決定する予定である。

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物学科 山岸功典君の卒業論文の一環として行われた)

## マシコヒゲムシの幼若個体の栄養体における共生細菌の観察

松本高大, 笹山雄一

〒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

Takahiro MATSUMOTO, Yuichi SASAYAMA: Observation of symbiotic bacteria in the trophosome of young beard worms, *Oligobrachia mashikoi* (Annelida)

マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) は能登半島の九十九湾などに生息する環形動物門のゴカイの一種で、口や肛門が無く、したがって消化器官を持たない。虫体は前体、中体、後体、終体の4部に分けられる。この動物は、後体にある栄養体という器官のバクテリオサイトに共生している化学合成細菌が産生する炭水化物で生きている。また同時に、細菌を消化して栄養としている。これまで本種に関しては成体を用いた研究が行われてきた。一方、幼若個体は極めて細く、その栄養体は観察されたことはなかった。そこで本研究では、幼若個体の栄養体の基礎的データを取る目的で、幼若な個体ほど栄養体の共生細菌が少ないのではないかと仮定して共生細菌の状態を観察した。

### <方法>

九十九湾の深度20~25mの海底をドレッジし、本種を採集した。採れた個体は、4%パラホルムアルデヒドPBSで固定し、その後70%エタノールに保存した。各個体の体幅を精密に計測した後、パラフィン切片にし、一般的な観察をするためにヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色)を行った。また、共生細菌の多寡を調べるためにDAPI染色を施した。

### <結果・考察>

成体の体幅はおよそ0.8~0.6mmである。本研究では複数回のドレッジによって、合計25個体の幼若個体を採集した。それらの体幅は0.48~0.11mmであった。しかしながら、栄養体を含む後環帯部まであったのは15個体のみであった。その内5個体の体幅は0.48~0.25mmであったが、残りの10個体は0.18~0.11mmで、極めて細かった。虫体全体を採集できた個体はおらず、後環帯部の長さも均一ではなかったため、出来るだけ同じ条件で観察するために環帯部から最も離れた部位を検鏡に用いた。

各個体につき、最低でも切片10数枚を観察した。その結果、体幅0.48mmの個体ではHE染色では栄養体が発達しているように観察されたが、DAPI染色で共生細菌がほとんど確認できなかった。体幅0.15mmの個体では、HE染色で栄養体が貧弱に見えてもDAPI染色で多数の共生細菌が確認できた。このように、体幅と共生細菌の存在の明確さの関係を調べると、少なくとも本観察の結果からは、幼若な個体ほど共生細菌が少ないという仮定は成立が困難であると結論された。成体では環帯より前の体表面から、周囲の環境にある多糖を単糖に分解して取り込み、栄養としている可能性が示唆されているので、幼若個体においてもそのことを考慮しなければならないのかもしれない。

### <今後の展望>

幼若個体は極めて細く、成体よりもさらに千切れやすいとわかった。したがって、スキューバダイビングによって、直接海底に行き、慎重に手で海底の泥から虫体を採集する必要があるだろう。また、本種は卵から幼生を経て変態する発生過程を人工的に進めることができない。これをクリアすることが本種を用いたこれからの種々の研究の重要な課題であろう。

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物学科 松本高大君の卒業論文の一環として行われた)

## 無機水銀のキンギョの骨芽細胞及び破骨細胞活性に及ぼす影響： ウロコのアッセイ系による解析

谷内口孝治<sup>1</sup>，鈴木信雄<sup>2</sup>，早川和一<sup>3</sup>，服部淳彦<sup>4</sup>

<sup>1</sup>〒927-0552 石川県鳳珠郡能登町字越坂，のと海洋ふれあいセンター；<sup>2</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>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；<sup>4</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

Koji YACHIGUCHI<sup>1</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>2</sup>, Kazuichi HAYAKAWA<sup>3</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>4</sup>: Effects of inorganic mercury on osteoblastic and osteoclastic activities in goldfish: Analysis by a scale *in vitro* assay system

### 【はじめに】

水俣病は、新日本窒素肥料（現在のチッソ）水俣工場が、アセトアルデヒドの生産に触媒として使用した無機水銀(硫酸水銀)により海洋が汚染され、その海域に生息した魚に水銀が蓄積・濃縮され、それを食した地域住民の脳-神経系に蓄積して、中毒性の中樞神経疾患になった。このような背景から、水銀に対する作用については、神経系に対する作用を中心に解析が進んでいる<sup>1)</sup>。一方、水銀の骨に対する作用については報告が少なく、*in vivo*での解析が多い<sup>2,3)</sup>。骨芽細胞に関する報告はあるが<sup>3)</sup>、破骨細胞に対する作用を解析した報告は、これまでにはない。骨芽細胞との相互作用により、単核の破骨細胞が融合して多核の破骨細胞になり、分化・活性化しないと骨吸収能がない。株化した骨芽細胞があるため、骨芽細胞の培養は容易であるが、破骨細胞の培養は容易ではない。したがって、容易に破骨細胞の作用を解析するモデルシステムの開発が求められている。

### 【目的】

魚類のウロコは、石灰化した骨質層の上に骨芽細胞と破骨細胞が共存して、ヒトの骨と同様に骨代謝をしている。魚類の椎骨には骨髄に相当する構造がなく、造血は腎臓の一部で行っている。また、骨とウロコがカルシウムの貯蔵庫であるが、魚類にとって、ウロコがヒトの骨と同様の役割を持つことは、放射性同位元素 ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) を用いた実験で証明されている。そこで我々は、ウロコを用いて *in vitro* の培養システムを開発した<sup>4)</sup>。本研究では、このシステムを用いて無機水銀の作用を解析した。

### 【実験方法】

実験材料として、淡水魚のキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。キンギョからウロコを麻酔下で採取した。次に、採取したウロコを Suzuki and Hattori (2003) の方法<sup>4)</sup> に従い *in vitro* で6及び18時間培養して、無機水銀の骨代謝に及ぼす影響を評価した。また、長時間 (18, 36及び64時間) の培養に対する影響も調べた。

さらに、水銀で18時間処理したウロコから mRNA を抽出して、破骨細胞のマーカー (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ: TRAP、カテプシンK)、骨芽細胞のマーカー (インスリン様成長因子I:

IGF-I)、重金属の解毒に関与する遺伝子(メタロチオネイン:MT)の発現に対する影響を無処理のウロコと比較した。

### 【実験結果】

無機水銀 ( $10^{-5} \sim 10^{-3}$  M) は6時間の培養で破骨細胞の活性を抑制した。一方、骨芽細胞の活性は6時間の培養では変化しなかった。

そこで次に、長時間の培養を行った。18時間の培養で $10^{-4}$  Mの無機水銀が破骨細胞の活性を抑制した以外は、破骨細胞の活性は減少傾向であるが、有意差は認められなかった。一方、骨芽細胞の活性は無機水銀 ( $10^{-6} \sim 10^{-4}$  M) により36時間以降において有意に低下した。

遺伝子発現の変化を調べると、破骨細胞のマーカであるTRAPとカテプシンK、さらに骨芽細胞のマーカであるIGF-Iの発現は低下していた。一方、重金属の解毒に関与するMTの発現が有意に上昇していた (Figure 1)。

### 【考察】

本研究により初めて無機水銀の破骨細胞に対する作用(細胞活性及び遺伝子発現の変化)を証明した。さらに無機水銀の破骨細胞に対する作用は、短時間の培養で顕著に現れることもわかった。水銀は魚の背骨ではなく、ウロコに蓄積するという報告があり<sup>5)</sup>、ウロコは非常に感度がよい骨のモデルである可能性が高い。

一方、骨芽細胞の活性は、短時間ではなく長時間の培養で低下することが判明した。18時間の培養でMTの発現量が有意に上昇したので、MTを作ることで骨芽細胞は無機水銀の作用を防御している可能性がある。しかし高濃度の場合は、IGF-Iの発現が有意に低下して、36時間以降に骨芽細胞の活性が下がったと推測される。

### 【引用文献】

- 1) Castoldi, A.F., et al., Brain Res. Bull., 55: 197-203 (2001)
- 2) Yonaga, T., et al., Anat. Anz., 159: 373-383 (1985)
- 3) Jin, G.-B., et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 185: 98-11 (2002)
- 4) Suzuki, N. and Hattori, A., Life Sci., 73: 2237-2247 (2003)
- 5) Lake, J.L., et al., Arch. Environ. Contam. Toxicol., 50: 539-544 (2006)

### 【謝辞】

本研究の一部は、科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費、(財)クリタ水・環境科学振興財団助成金、環境省 地球環境推進費及びExtend 2005の研究助成の援助により行われた。

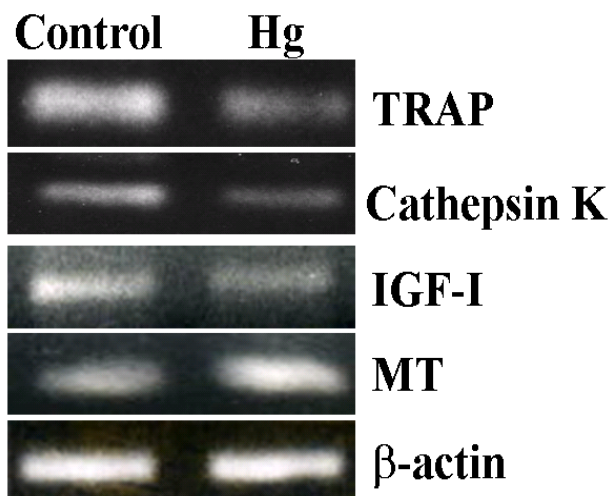


Figure 1 Expression analysis of osteoclastic markers (TRAP and cathepsin K) and osteoblastic marker (IGF-I) in control scales and mercury-treated scales.



## 【構成員】

### 1) 職員

教 授	笹山雄一 (sasayama@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 理学博士 専攻 生物多様性学、比較生理学 (有鬚動物門マシコヒゲムシの形態学・生理学・生態学を研究している)
准 教 授	鈴木信雄 (nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp) 博士 (理学) 専攻 環境生物学、比較生理学、骨学 (生理活性物質、環境汚染物質及び物理的刺激の骨に対する作用と海産無脊椎動物・海産魚類の生理活性物質の分子進化を研究している)
技術専門職員	又多政博 (matada@ca2.luckynet.jp) 専門 海産無脊椎動物一般
事務補佐員	曾良美智子(msora@ca2.luckynet.jp)

### 2) 学生

4年生

松本高大

山岸功典



金沢大学  
環日本海域環境研究センター

環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

〒927-0553 石川県鳳珠郡能登町小木ム4-1

TEL (0768) 74 - 1151 FAX (0768) 74 - 1644

Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Ogi, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, JAPAN