

魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：宇宙実験に適したウロコの培養法の検討

金沢大学 鈴木信雄、東京医科歯科大学 田畑 純、JAXA 大森克徳、東京大学 井尻憲一、金沢大学 北村敬一郎、根本 鉄、清水宣明、染井正徳、岡山大学 池亀美華、早稲田大学 中村正久、富山大学 近藤 隆、古澤之裕、松田恒平、田淵圭章、高崎一朗、和田重人、九州大学 安東宏徳、有人宇宙システム (株) 笠原春夫、千代田アドバンスト・ソリューションズ (株) 永瀬 睦、久保田幸治、東北大学 鈴木 徹、東京海洋大学 遠藤雅人、竹内俊郎、東京医科歯科大学 奈良雅之、服部淳彦

Fish Scale Study for Space Biology: Application of Scale Culture Method in the Space Environment

Nobuo Suzuki¹, Makoto J. Tabata², Katsunori Omori³, Kenichi Ijiri⁴, Kei-ichiro Kitamura⁵, Tetsu Nemoto⁵, Nobuaki Shimizu¹, Masanori Somei⁶, Mika Ikegame⁷, Masahisa Nakamura⁸, Takashi Kondo⁹, Yukihiko Furusawa⁹, Kouhei Matsuda¹⁰, Yoshiaki Tabuchi¹¹, Ichiro Takasaki¹¹, Shigehito Wada¹², Hironori Ando¹³, Haruo Kasahara¹⁴, Mutsumu Nagase¹⁵, Koji Kubota¹⁵, Tohru Suzuki¹⁶, Masato Endo¹⁷, Toshio Takeuchi¹⁷, Masayuki Nara¹⁸, Atsuhiko Hattori¹⁸

¹Inst. of Nat. and Environ. Technol., Kanazawa Univ.; ²Grad. Sch. of Tokyo Med. Dent. Univ.; ³Japan Aerospace Exploration Agency; ⁴RI Center, Univ. of Tokyo; ⁵Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ.; ⁶Grad. Sch. of Nat. Sci and Technol., Kanazawa Univ.; ⁷Grad. Sch. of Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.; ⁸Fac. of Edu. and Integ. Arts and Sci., Waseda Univ.; ⁹Grad. Sch. of Med. and Pharmaceut. Sci., Univ. of Toyama; ¹⁰Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama; ¹¹Life Sci. Res. Center, Univ. of Toyama; ¹²Fac. of Med., Univ. of Toyama; ¹³Grad. Sch. of Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.; ¹⁴Japan Manned Space Systems Co.; ¹⁵Chiyoda Advanced Solutions Co.; ¹⁶Grad. Sch. of Agr. Sci., Tohoku Univ.; ¹⁷Fac. of Marine Sci., Tokyo Univ. of Marine Sci. and Technol.; ¹⁸Coll. of Liberal Arts Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.

Correspondence: Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan (Nobuo Suzuki)

E-Mail: nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

Abstract: Fish scale is a calcified tissue that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix, all of which are similar to those found in mammalian membrane bone. Recently, we developed a new *in vitro* model system using goldfish scales. This system can detect the activities of osteoblasts and osteoclasts with alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) as respective markers and can analyze the co-relationship between osteoblasts and osteoclasts. Using this system, we previously indicated that osteoblastic and osteoclastic activities in the scales responded to simulated microgravity with a three-dimensional clinostat. As these activities in the scales were not changed by stimulation with a two-dimensional clinostat, we believe that the response to simulated microgravity in scale osteoblasts and osteoclasts is a specific phenomenon. Thus, to analyze bone metabolism in scales under microgravity conditions such as those experienced during space flights, we examined culture conditions in goldfish scales. We found that normal scales and regenerating scales treated by hypochlorous acid could be cultured in Leibovitz L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum for 1 week at 25°C. After these scales were kept in the above medium at 4°C, the response of hyper-gravity loading under acceleration by vibration (3 G, 10 min) was examined. The TRAP activities in the normal and regenerating scales kept at 4°C for 1 week significantly decreased, while ALP activities in these scales significantly increased. These responses in the scales kept at 4°C for 1 week were very similar to those in the untreated scales just after collection from goldfish. We concluded that fish scales are a suitable material for the analysis of bone metabolism under microgravity conditions, such as those experienced during space flights.

Key words; Fish scale; Osteoblasts; Osteoclasts; Regenerating scale; Culture; Hyper-gravity

1. 本WGの目的

魚類のウロコは、膜性骨に似た硬組織であり、I型コラーゲンからなる線維層とI型コラーゲンとハイドロキシアパタイトから構成される骨質層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、骨代謝を行っている^{1,2,3,4,5)}。そこで我々はウロコの特徴に注目し、キンギョのウロコを用いて培養・評価システムを開発した^{6,7,8)}。

昨年度は、このシステムを用いて3次元クリノスタットによる擬似微小重力下でウロコを6及び24時間処理した結果、骨芽細胞の活性が低下し、破骨細胞の活性が上昇した⁹⁾。一方、1軸(2次元)でクリノスタットを6時間回転させたが、骨芽細胞及び破骨細胞の活性は変化しなかった⁹⁾。したがって、ウロコは3次元クリノスタットによる擬似微小重力に応答し、宇宙空間で進行する骨密度が低下したような状態になったと考えられる。

宇宙実験では骨芽細胞の培養株を用いた実験はあるが、破骨細胞は多核の活性型に誘導する必要があり、培養した破骨細胞を用いた宇宙実験は実現していない。また宇宙飛行士及びラットによる宇宙実験(*in vivo*)や、後肢懸垂ラット等を用いた地上実験(*in vivo*)では、骨芽細胞の活性低下はいつも起こるが、破骨細胞については結果に一致を欠いており、変化しなかったという報告とその活性が上昇したという報告がある¹⁰⁾。*in vivo*では、ホルモン等の様々な生理活性物質の影響を受けるため、宇宙空間における微小重力の直接的な影響を解析するには、*in vitro*で実験を行う必要がある。哺乳類の骨芽細胞と破骨細胞の共存培養は、地上では可能な技術であるが、宇宙空間では不可能に近いのが現状である。

一方、魚類のウロコには骨芽細胞と破骨細胞が共存しており、長期培養及び低温保存も可能であることから、ウロコは宇宙実験に適した材料であると思われる。以下に本WGの活動内容及び実験成果を報告する。

2. WGの本年度の活動

平成20年11月30日に東京医科歯科大学教養部、12月1日～2日に筑波宇宙センターでWGの会合を行った。その後、E-mail等で連絡を取りながら、実験結果等について論議している。さらに、平成20年2月下旬から3月上旬にWGの会合を計画しており、

来年度の活動について論議する予定である。

3. これまで得られた実験成果

本年度のWGの実験成果を順に示す。これらの研究成果は、宇宙生物科学会の機関誌である *Biol. Sci. Space* に投稿する予定である。なお、ウロコの培養条件に関する研究成果の一部は、2008年宇宙生物科学会(奈良大会)で発表した。

①ウロコの滅菌方法の検討

本研究では、キンギョ(*Carassius auratus*)の正常ウロコ(無処理のウロコ)に加えて、再生ウロコを実験材料として用いた。ウロコの摘出と滅菌は下記の要領による。

- (1) 使用するキンギョを2日前からグリーンFゴールドで薬浴。
- (2) 麻酔したキンギョの魚体表面を70%エタノールで清拭。
- (3) ウロコを抜去、抜去したウロコを0.1-0.4%次亜塩素酸ナトリウム-PBSで30秒～1分浸漬(抗細菌)。
- (4) ファンギゾン-PBSで5-10分洗浄(抗真菌)
- (5) 滅菌PBS、Leibovitz L-15培地で洗浄後、10%FBS-Leibovitz L-15培地に換えて培養を開始する。

この滅菌方法で正常ウロコを培養すると、最大2週間は細菌・真菌のコンタミがなく、培養することができた。また、この条件は、再生ウロコでも適用できる。なお、実験目的に応じて、(2)のステップを省略できることも判明した。

②再生ウロコの細胞活性の測定法の改良

再生10日目の再生ウロコは正常ウロコと比較してカルシウムの沈着量が低く、これまで3,4枚の再生ウロコを用いて重量当たりの細胞活性を算出していた¹¹⁾。そこで再生ウロコ1枚でも細胞活性の測定を可能にするため、水温25℃で10日飼育したキンギョの再生ウロコの表面積当たりの細胞活性を求めて、評価システムの開発を行った。さらにこのシステムを用いて、バイブレーションによる加速度重力の影響を解析した。即ち、正常ウロコで骨芽細胞と破骨細胞の応答性が最もよい条件(3G, 10分間負荷)¹²⁾で処理し、その後15℃で6時間恒温において、再生

ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を測定した。

再生ウロコの表面積当たりの細胞活性で計算すると、再生ウロコ1枚でも測定可能であり、骨芽細胞及び破骨細胞の活性値の変動が非常に少ないことがわかった。そこで再生ウロコの場合は、表面積を基準として細胞活性を算出することにした。次にこの評価系を用いて、バイブレーションによる加速度重力の影響を解析した。その結果、バイブレーションの加速度重力により、正常ウロコと同様に骨芽細胞の活性が上昇した。一方破骨細胞の活性は低下し、その応答性は、再生ウロコの方が良いことが判明した。

③ウロコの培養方法の検討

①の殺菌方法で正常ウロコ及び再生ウロコを処理して、26℃で培養し、細胞の染色（破骨細胞：酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色、骨芽細胞：アルカリフォスファターゼ染色）により解析した。その結果、少なくとも1週間は染色性の低下は見られないことが判明した。

④低温保管後の過重力応答

低温（4℃）で1週間保管後、バイブレーションによる加速度重力に対する応答を解析した。即ち、加速度重力（3G, 10分間負荷）で処理し、その後15℃で6時間、恒温において、正常ウロコと再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を測定した。

再生ウロコの方が、正常ウロコよりも応答性がよかったが、正常ウロコ及び再生ウロコ共に、骨芽細胞の活性が有意に上昇して、破骨細胞の活性が有意に低下することがわかった。

⑤実験成果のまとめ

これまで宇宙飛行や、後肢懸垂ラット等を用いた実験では、破骨細胞に対する作用は結果の一致を欠いており、実験条件により異なった結果が報告されている。その理由の一つとして、良い *in vitro* のモデル系の欠如が上げられる。ウロコは平たい骨基質の上に骨芽細胞、破骨細胞が共存しており、骨のモデルとして使用可能である。本研究において、ウロコは1週間の長期培養が可能であり、1週間の低温（4℃）保存も可能だということが判明した。さらに4℃で保管後のウロコ（正常ウロコ及び再生ウロコ）

は、バイブレーションによる加速度重力に応答することが判明した。したがって、宇宙実験の技術的な面からも、ウロコは最良の実験材料である。このモデルを用いれば、宇宙空間における微小重力の骨代謝に対する影響を正確に解析できる可能性が高いと思われる。

4. 今後の予定

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に採択され、本WGのテーマは宇宙実験に向けて準備中である。本研究により培養及び低温保存の条件が決定され、計画通りに実験成果をあげている。ウロコはバイブレーションによる加速度重力¹²⁾に加えて、遠心機の過重力にも感度良く応答する¹³⁾。そこで遠心機の過重力応答の詳細な機構を調べていくため、アレイ解析を行っている最中である。

一方、新規プロモメラトニン（1-benzyl-2,4,6-tribromomelatonin）は、ウロコの骨芽細胞の活性を上昇させ、破骨細胞の活性を低下させることが判明した¹⁴⁾。この化合物は骨疾患のモデルとして用いられている卵巣摘出ラットや低カルシウム食を与えたラットを用いた動物実験でも効果を確認した⁵⁾。したがって、宇宙空間で進行する骨密度低下の治療薬として有望であり、「きぼう」船内実験室第2期利用において、その効果を調べていきたい。

5. 引用文献

- 1) 鈴木信雄, 田畑 純, 和田重人, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた新しい骨モデル系の開発と歯科医療への応用. *Dental Diamond*, 31: 68-73 (2006)
- 2) 服部淳彦, 鈴木信雄, 染井正徳: メラトニン Up to Date—骨とメラトニン. *日本抗加齢医学会雑誌*, 2: 78-86 (2006)
- 3) 田畑 純, 鈴木信雄, 服部淳彦: 魚鱗—硬組織研究と再生研究のフロンティア. *細胞*, 39: 55-57 (2007)
- 4) Azuma, K., Kobayashi, M., Nakamura, M., Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S., Ikegame, M., Yamamoto, T. and Hattori, A.: Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362: 594-600 (2007)

- 5) 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)
- 6) Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T.: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler (seawater teleost). *Peptides*, 21: 115-124 (2000)
- 7) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 8) 鈴木信雄 : 魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
- 9) 鈴木信雄, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 清水宣明, 田畑 純, 池亀美華, 中村正久, 近藤 隆, 松田恒平, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬 睦, 久保田幸治, 奈良雅之, 服部淳彦 : 擬似微小重力及び過重力下における骨代謝制御: 培養ウロコを用いた解析. *Space Utiliz. Res.*, 24: 230-233 (2008)
- 10) Carmeliet, G., Vico, L. and Bouillon, R.: Space flight: A challenge for normal bone homeostasis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 11: 131-144 (2001)
- 11) Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A.: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, 76: 2699-2709 (2005)
- 12) Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., Kondo, T., Tabata, M.J., Sodeyama, F., Ijiri, K. and Hattori, A.: Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv. Space Res.*, 40: 1711-1721 (2007)
- 13) Suzuki, N., Omori, K., Nakamura, M., Tabata, M.J., Ikegame, M., Ijiri, K., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Matsuda, K., Ando, H., Kasahara, H., Nagase, M., Nara, M. and Hattori, A.: Scale osteoblasts and osteoclasts sensitively respond to low-gravity loading by centrifuge. *Biol. Sci. Space*, 22: 3-7 (2008)
- 14) Suzuki, N., Somei, M., Kitamura, K., Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.*, 44: 326-334 (2008)