

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

薬剤処理やアンチセンス核酸注射によるゼブラフィッシュの 後天的アルビノ個体の作製方法の探索

茂木和枝^{1,4} 永井 敦² 日野晶也^{1,2,3} 豊泉龍児^{1,2,3}

Screening for an Efficient Procedure to Generate Non-Congenital Albino Zebrafish using Chemical Compounds or Antisense Oligonucleotides

Kazue Mogi^{1,4}, Atsushi Nagai², Akiya Hino^{1,2,3} and Ryuji Toyoizumi^{1,2,3}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ High-Tech Research Center, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyoik02@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Zebrafish is a good model organism for developmental biology and biomedical research. In its early developmental stages, zebrafish is very transparent, and the speed of development is rapid, however, its larva is highly pigmented, and thus it is almost impossible to observe the internal organs using non-invasive methods. Here we report the effects of antisense morpholino oligonucleotides (MO) and organic compounds which target zebrafish melanogenesis. Antisense MO for zebrafish *tyrosinase* and phenyl-thiourea (PTU) are highly effective to reduce the pigmentation of melanosomes in melanophores. Arbutin and Kojic acid are partially effective, and Fullerene C₆₀ is not effective for inhibiting zebrafish melanogenesis. Except for pigmentation, all these reagents did not disrupt normal embryogenesis and the left-right specification of the heart. After 8-day treatment with PTU, we succeeded in visualizing the shape of the brain ventricle by injecting with Qdot 655 (red nanocrystal). The inhibition of melanogenesis is useful for the study of brain development using zebrafish larvae.

Keywords: melanocyte, melanin, zebrafish, cerebral ventricle, Qdot

序論

哺乳類はメラニン細胞(melanocyte)に酵素 Tyrosinase を発現し、体表などの黒色素(melanin)を産生している。ヒトは美容のために、皮膚の Tyrosinase 活性や Tyrosinase 産生の抑制に有効な成分を含む化粧品を塗布するが、各有効成分の安全性の検定には主に培養細胞や哺乳類の成体を用いられている。しかしながら、成体が無反応のレベルの僅かな毒性にも敏感に反応する形態形成期の胚を用いてその発生毒性を検定することが、安全性のチェックのために重要である。

zebrafish (*Danio rerio*)は、neural crest 由来の色素細胞、即ち黒色素胞(melanophore)、黄色色素胞(xanthophore)、虹色素胞(iridophore)の3種類

の色素細胞を持っている。zebrafish 胚においては、受精後 72 時間程度でほぼ全ての器官が形成され、黒色素胞の分化も 48 時間後には視認され、72 時間後には十分な量の melanosome(黒色素胞内で産生される黒色〜黒褐色の細胞小器官)が形成される。従って、zebrafish 胚は Tyrosinase 阻害剤の安全性の検定には好適な実験系となる。本研究では、Tyrosinase 阻害剤として既に安全性が確認済みとされ、多くの化粧品に含まれる Arbutin ならびに Kojic acid について発生毒性の検定を行った。Arbutin^{1,2)} や Kojic acid³⁾は、メラニン形成の初期段階において重要な Tyrosinase の合成とその活性を抑制する効果があるとされている。また、最近、

melanosome 形成の抑制効果、つまりは美白効果があるとされ一部の化粧品において使用され始めた Fullerene C₆₀⁴⁾ の発生毒性の検定も行った。Fullerene は炭素原子(C)が複数個結合し球状構造を形成した分子の総称であり、物理的に安定しており、化学的には僅かな反応性を示す非水溶性の分子である。

メラニン色素の生合成において Tyrosinase が重要な役割を果たしているが、Tyrosinase の合成阻害や活性阻害が、胚の形態形成に及ぼす影響についてはあまり研究されていない。そこで我々は、*tyrosinase* mRNA の翻訳を阻害する morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を卵割期胚の割球に微量注射し、Tyrosinase の生成を阻害した上で胚の形態を観察した。また、Tyrosinase 阻害剤として知られている 1-phenyl-2-thiourea (PTU)^{5,6,7)}を用いて、zebrafish 胚の黒色色素形成と形態形成、心臓の左右性への影響についても調査した。

材料と方法

14 時間-10 時間の明暗周期、水温 28°C で飼育中の zebrafish 雌雄成魚から採卵し、良卵と思われる卵を選択した。1-2 細胞期の割球中に、zebrafish *tyrosinase* の翻訳開始点領域に相補的な配列(5'-TGG AGA GAC ATG ATG ATG AAG AGT C-3')を有する人工核酸 morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を 8.3mg/ml の濃度で 2.3nl (注射量 19ng)を微量注射し、48 well plate の 1 穴に 1 胚ずつ入れ、28.5°C で 48 時間、Fish Ringer 溶液中で発生させた。同腹胚を同様に Fish Ringer 溶液を満たした 48well plate 中に 1 胚ずつ入れ無処理群として、同一孵卵器内で発生させた。培養 48 時間後の孵化直後に外部形態、心臓の左右性、黒色色素胞の大きさと色濃度(色の黒さ)について各個体を判定した。判定に際し、0.1%(w/v) MS222 を 3.5-9cm ペトリ皿に満たした Fish Ringer 溶液に数滴滴下した溶液で稚魚に麻酔をかけ、観察を行った。対照実験として、*human β-globin* のスプライシング領域に相補的な配列(5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3')を有する MO を、卵割期胚の割球に 2.8mg/ml の濃度で 2.3nl (注射量 6.4ng)微量注射し、同様に 48 時間培養し、形態形成および色素分化について観察した。

Fullerene C₆₀、1-phenyl-2-thiourea (PTU)、Arbutin、Kojic acid の化合物投与実験は、採卵直後または 24-28°C で 1 日間飼育した上で、sphere 期 (Fullerene C₆₀ 処理群)、dome 期 (PTU 処理群)、90% epiboly 期 (Arbutin, Kojic acid 処理群)に達した胚を

用いた。実験群は、4 種類の化合物のいずれか 1 種類を含む 0.5-1ml の Fish Ringer 溶液中で発生させた。無処理群は、これらの化合物を無添加の Fish Ringer 溶液中で発生させた。孵化直後に、胚の外部形態、心臓の左右性、黒色色素胞の大きさと色濃度(色の黒さ)について各個体を判定した(一部は孵化前に判定した)。胚は、受精膜に囲まれた状態で、あるいは受精膜をピンセットで除去した後に、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) に装着した写真撮影装置 (同 DP-12) または高感度冷却 CCD カメラ (KEYENCE VB-7000/7010) を用いて写真撮影した。

Fullerene C₆₀ 処理においては、実験群の胚は Fullerene C₆₀-DMSO (dimethylsulfoxide) 飽和溶液を Fish Ringer 溶液で 100 倍希釈した溶液中で、対照群の胚は 1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で、無処理群の胚とこれらを同時に発生させた。

PTU 処理においては、PTU を DMSO に溶解し 20mM の stock solution 溶液とし、これを 100 倍希釈した 200 μM 溶液中で実験群の胚を発生させた。対照群の胚は 1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で、無処理群の胚とこれらを同時に発生させた。Arbutin と Kojic acid は超純水に溶解し、Arbutin 処理や Kojic acid 処理実験を行った。7.3mM または 73 mM Arbutin/Fish Ringer 溶液、あるいは 10 mM または 20mM Kojic acid/Fish Ringer 溶液を用いて胚を培養し、同時に採卵した無処理群(両処理で共通)の胚と同じ温度で同調させて発生させた。

Dome 期から PTU 処理し、8 日間 PTU 存在下で培養した稚魚を用い、赤色蛍光を発する超微粒子(量子ドット)懸濁液である Qdot655 溶液 2.3nl を脳室内に微量注射した。背側頭部の中央部分に注射針を刺し、背側表皮よりもやや下側にある脳室内に、針の先端部分が存在していることを確認しながら注射した。注射直後に、高感度冷却 CCD カメラ (KEYENCE VB-7000/7010) を装着した蛍光顕微鏡下で B 励起を行い、脳室内における Qdot の分布を観察した。

結果

以下、観察結果を処理のカテゴリ毎に記す。全ての実験系において特定の型の奇形が多く生じることは無かった。また、各処理の内臓形成に対する影響の指標として心臓の左右性の判定を行ったが、実験群の心臓逆位発生率は対照群や無処理胚と大きな差はなかった。

アンチセンス核酸の微量注射

Tyrosinase の生成を阻害するために、*tyrosinase*

mRNA の翻訳を抑制する morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を卵割期胚の割球に 19ng 微量注射し 48 時間培養したところ、実験群では、黒色色素胞の低形成がはっきりと観察された (n=14)。黒色色素胞の形成が殆ど生じず、白化した胚も観察された(n=4/14, 図 1A)。

一方、Fish Ringer 溶液のみに入れて培養した無処理群の胚では、すべての胚に黒色色素の高濃度の形成が観察された(n=56/56, 図 1B)。対照実験として、1 細胞期胚の割球に *human β-globin* MO を 6.4ng 微量注射し、48 時間培養したところ、すべての胚において、同腹の無処理胚と同様に、黒色色素胞の形成に変化は見られなかった(*human β-globin* MO 注射胚; n=4, 無処理胚; n=48; 図 1C, D)。

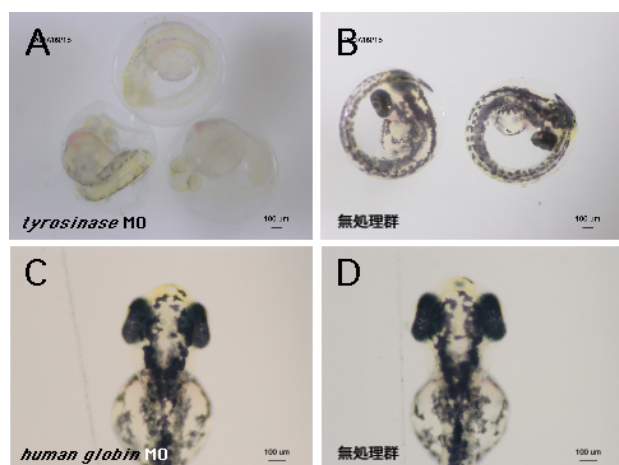


図 1. zebrafish *tyrosinase* の翻訳開始点領域に相補的な antisense morpholino oligonucleotide の melanin 形成に対する効果。

Fullerene 処理

Fullerene C₆₀は、zebrafish の黒色色素胞の大きさや色の濃さに変化をもたらさなかった(n=435, 図 2A)。1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で培養した対照群の胚(n=193)、Fish Ringer 溶液のみで培養した無処理群の胚(図 2B; n=301)のいずれにおいても、すべての胚で黒色色素の形成が観察された(表 1)。

Fullerene C₆₀ 処理を行った実験群では、無処理群や対照群に比べ奇形の発生率が高くなっていた。

PTU 処理を行ったすべての胚において、melanin 色素合成が非常に強く阻害されていた。培養 48 時間後に、白化した胚を顕微鏡下で観察したところ、黒色色素胞の着色を確認することはできなかった(n=133, 図 2C, 表 1)。PTU 処理は胚を白化させたが、稚魚の外部形態の形態形成に大きな影響を与えることはなかった(表 1)。白化した稚魚を、PTU 溶液に入れ培養を続けると、判定時の培養 48 時間後には、黄色色素胞(xanthophore)と虹色素胞

(iridophore)の色素が観察され、稚魚の体表には黄色と白銀色の斑点が生じた。PTU 処理を行った場合には、dome 期まで発生させた胚を用いても(n=133)、3-10 体節期の胚を用いても(n=36)、黒色色素胞の発色前に PTU 処理しさえすれば、処理開始発生段階にかかわらず胚は白化することがわかった。対照実験として、1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で培養した胚は、無処理胚(図 2D)同様に黒色色素胞が観察され、形態形成にも大きな異常は見られなかった(表 1)。

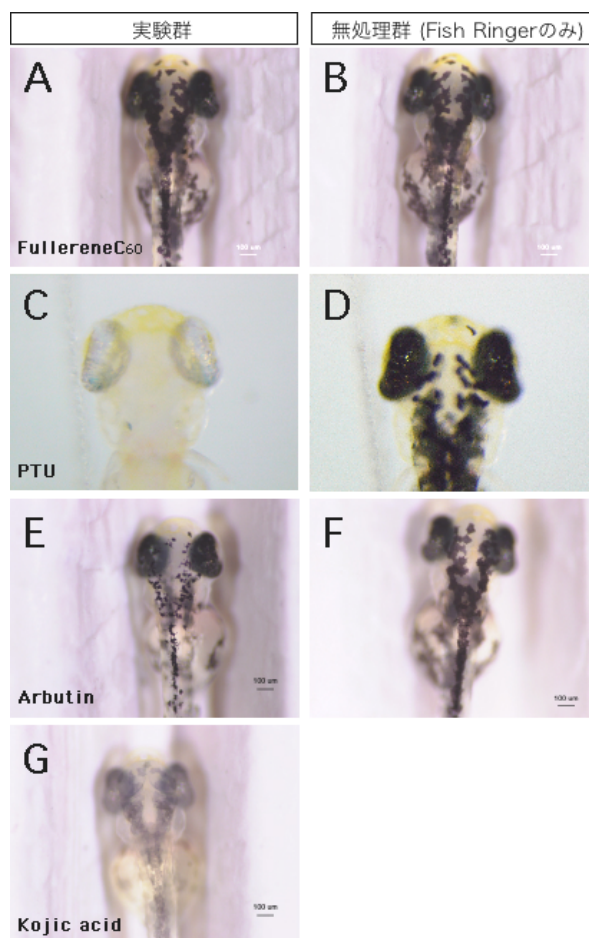


図 2. 各種有機化合物の zebrafish 黒色色素胞に対する効果。PTU は黒色色素胞のメラニン合成を完全に抑制し、Arbutin と Kojic acid は完全ではないが抑制した。

Arbutin 処理

Arbutin 処理胚では、無処理胚と比較すると、黒色色素胞の色(黒さ)自体には変化はないが、黒色色素胞の表面積が小さくなるという変化が主に観察された。特に、73mM の Arbutin 処理胚では、色素判定を行った胚のうち、25%(n=34/135)の胚において、黒色色素胞の大きさが小さくなる効果が現れた(図 2E; 図 2F は同時に培養した無処理群)。その効果を主因として、黒色色素胞に覆われる面積が減り、体表全体が明るく感じられた(n=39/135, 表 1)。一方、

このような効果に関しては個体差が大きく、黒色色素胞に変化が認められない個体も多かった (n=101/135, 表 1)。

Kojic acid 処理

Kojic acid 処理胚では、主に黒色色素胞の色濃度が薄くなった。20mM 処理胚においては、眼の色素性網膜を含む体全体の黒色色素胞の色が薄くなり (n=103/142, 図 2G, 表 1)、Arbutin よりも白化効果が高いことと、その効果に個体差が少ないことが分かった。Arbutin あるいは Kojic acid 処理後、奇形や心臓逆位が無処理群より増加することはなかった。

PTU 処理後の稚魚への Qdot 注射

PTU 溶液に浸し 28.5°C で 8 日間培養し続けた稚魚を観察したところ、黒色色素胞の形成が完全に抑制された状態が保たれ脳神経系は外部から容易に観察することができた。そこで我々は、白化した稚魚の脳室内に Qdot 溶液 2.3nl を微量注射し、蛍光顕微鏡下で Qdot の脳室内での分布を観察した。zebrafish の脳室はチューブ状に細長く、注射した Qdot は注射と同時に脳室内に素早く拡散した。稚魚は白化し、頭部はかなり透明化していたことから、可視光下で観察した場合にも、脳室内における赤色の Qdot 溶液を容易に観察することができた(図 3A)。また蛍光顕微鏡下では、脳室内に拡散した Qdot 溶液を非常に明るい赤色蛍光として観察することができ、可視光下よりも鮮明かつ詳細に Qdot の分布を観察できた(図 3B)。しかしながら、PTU 処理した 8 日目の稚魚では、脳室は非常に狭く、Qdot の拡散をもとに脳室内液流の流動パターンを観察することはできなかった。

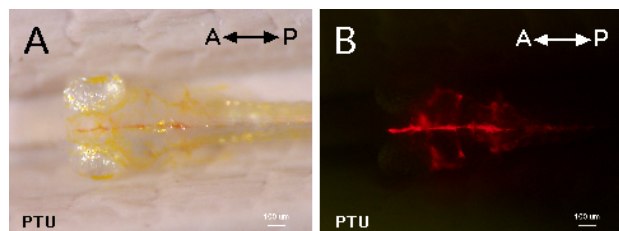


図 3. PTU 処理を 8 日間継続した稚魚の脳室内に Qdot を微量注射。左は通常の冷光を用い明視野下で観察した。脳室内に Qdot が認められる。右は B 励起波長下での蛍光観察。脳室内の Qdot の分布が鮮明かつ詳細に観察される。

討論

melanin 生成には、Tyrosinase が関与していることが知られている。Tyrosinase は、その最初の段階である tyrosin から DOPA への水酸化反応と、DOPA から DOPA キノンへの酸化反応を触媒し、この反応

が melanin 生成の律速段階とされている。今回、tyrosinase mRNA の翻訳を阻害する tyrosinase MO を卵割期胚の割球に微量注射し Tyrosinase タンパク質の合成を阻害した実験は、黒色色素胞の着色を阻害して胚を白化させ、先行研究⁸⁾の結果を支持した(図 1A)。また、dome 期から Tyrosinase 阻害剤 PTU で処理した実験は、tyrosinase MO 注射胚の場合と同様に胚の白化を誘導し、黒色色素胞の着色を完全に抑制した(図 2C, 表 1)。これらの結果は、melanin 色素合成経路の一箇所を遮断すると melanin 生成は抑制され、melanosome の形成ないしその黒化に影響を及ぼすことが示唆された。

黒色色素胞の着色が実験的に抑制され白化した実験群の胚/稚魚において、これらの多くはほぼ正常に胚発生し、心臓の左右性も対照群や無処理群と同程度に保たれていた。従って、黒色色素胞の形成、特に melanin 合成の経路は、太陽光の紫外線から体を保護するために胚発生後期に重要な役割を担っているものの、胚の形態形成に直接関与する経路とはならないと考えられる。zebrafish 胚を 28.5°C で培養した場合に、24hpf(受精後 24 時間後)には、眼の色素性網膜に最初の黒色色素沈着が見られることから、黒色色素胞の形成は黄色色素胞や虹色素胞の形成よりも機能的に重要であり、それ故これらに先行して分化するのではないかと考えられる。

このように、黒色色素胞の形成は機能的には有用な生体反応であるが、我々の日常生活においては肌を白く保ちたいという美への願望があり、これに基づいた消費者のニーズに対応するために melanin 生成を抑制する様々な化粧品が開発されている。今回実験に用いた PTU、Arbutin、Kojic acid は、白化に有効な濃度のアッセイでは胚発生に殆ど影響せず、黒色色素胞の形成を抑える結果を示した。Arbutin と Kojic acid は黒色色素胞に対して異なる抑制効果を示したが(図 2E, G)、これは両化合物の Tyrosinase に対する作用機構の相違が原因だと思われる。Arbutin 単体のみで作用させた場合よりも、Aloesin と混合して作用させた場合には相乗効果が生じ、より一層黒色色素形成が抑制されたという報告がある⁹⁾。今回は単独で用いた Arbutin と Kojic acid の混合溶液に胚を浸漬することで、更なる白化効果が期待できるかも知れない。

一方、Fullerene C₆₀は、zebrafish 胚の黒色色素胞の着色に殆ど影響を与えることはなかったが(図 2A, 表 1)、これは魚類と(Fullerene が白化効果を示す)ヒトとの黒色色素の形成機構の差異を反映している可能性がある。調製直後の Fullerene C₆₀-DMSO 飽和溶液のスペクトルを測定したとこ

表 1. 各種有機化合物の zebrafish 黒色色素胞形成、ならびに形態形成、心臓の左右性に及ぼす影響

		処理胚数	生存数	黒色色素胞の大きさ			黒色色素胞の色濃度						
				正常	心臓逆位	奇形	小	やや小	正常	なし	薄い	やや薄	正常
FullereneC ₆₀	Fish Ringerのみ	361	301 (83)	208 (69)	52 (17)	48 (16)	0 (0)	0 (0)	301 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	301 (100)
	1% DMSO/FR	222	193 (87)	111 (58)	45 (23)	37 (19)	0 (0)	0 (0)	193 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	193 (100)
	実験群	557	435 (78)	206 (47)	80 (18)	189 (43)	0 (0)	0 (0)	435 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	435 (100)
PTU	Fish Ringerのみ	192	143 (74)	100 (70)	22 (15)	21 (15)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	1% DMSO/FR	138	109 (79)	78 (72)	15 (14)	16 (15)	0 (0)	0 (0)	109 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	109 (100)
	200 μ M	186	133 (72)	90 (68)	21 (16)	22 (17)	ND	ND	ND	133 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Arbutin	Fish Ringerのみ	144	143 (99)	105 (73)	30 (21)	9 (6)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	7.3mM	144	142 (99)	120 (85)	20 (14)	2 (1)	2 (1)	6 (4)	134 (94)	0 (0)	0 (0)	5 (4)	137 (96)
	73mM	143	135 (94)	110 (81)	18 (13)	9 (7)	17 (13)	17 (13)	101 (75)	0 (0)	22 (16)	17 (13)	96 (71)
Kojic acid	Fish Ringerのみ	144	143 (99)	105 (73)	30 (21)	9 (6)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	10mM	144	143 (99)	120 (84)	13 (9)	10 (7)	0 (0)	7 (5)	136 (95)	0 (0)	0 (0)	10 (7)	133 (93)
	20mM	144	142 (99)	106 (75)	21 (15)	15 (11)	0 (0)	0 (0)	142 (100)	0 (0)	7 (5)	96 (68)	39 (27)

大きさと色濃度に分けて判定

()内の数字は、生存率は処理数を、他は生存数を分母とした割合 (%)

ND; not detected

ろ、260 nm と 330 nm に吸収極大がある波形が得られ、この波形は同溶液を 1 週間以上室温保存した場合にも変化しなかった。従って、Fullerene が分解し、黒色色素胞に対する効果を失ったとは考えにくい。Fullerene と Arbutin または Kojic acid との混合実験を行い、zebrafish 黒色色素胞形成に相乗的な抑制効果を示すか検討したい。水酸化フラレンは水に可溶であるので、これを用いれば(中間溶媒として有用であるが高濃度では毒性を示す)DMSO を用いずに溶液浸漬実験が可能となる。高濃度の水酸化フラレンを用いて黒色色素胞の形成/着色に対する影響を観察したい。

PTU 処理を胚期から長期にわたって行い持続的に黒色色素胞の形成を抑制した結果、本来頭部全体が黒色色素に覆われる培養 8 日目の稚魚において、脳室を外部から容易に観察しやすい状態が得られた。この状態下では、Qdot 溶液の脳室内注射により、zebrafish の狭隘で入り組んだ脳室形態が明瞭に可視化され、その内部の液流を観察できると期待される(図 3)。しかしながら、稚魚が生後 8 日目とまだ若いこともあり、脳室内の空間は大変狭く、ツメガエル幼生では比較的容易に観察することの出来た脳室内液流¹⁰⁾の有無を zebrafish 稚魚で観察するのは困難であった。PTU 処理個体を更に長期間培養し、より大きく成長させた稚魚を用いて実験するのが望ましいと考えられる。その場合には、PTU 処理による黒色色素胞の着色の抑制と共に、日増しに細胞数を増す黄色色素胞や虹色素胞の増殖分化や着色の抑制も考慮しなければならないと予想される。PTU 処理胚は黒色色素胞の着色は抑制したが黄色色素胞や虹色素胞の着色は抑制できなかったことから、PTU 処理単独では、成長した生後 10 日目以降の稚魚における脳室形態やその内部の液流を可視

化することは日増しに困難になると予想される。黄色色素胞や虹色素胞形成を薬剤等により抑制する方法は未開発である。今後は 3 種類の色素胞形成を共に抑制し、完全に透明化した胚を発生させ、zebrafish 胚/稚魚における脳内液流の観察を可能とする実験系を開発したい。

本研究は、大量の卵が年間を通じて得られ、成熟個体の飼育も容易なモデル脊椎動物の zebrafish の胚のみを解析系として用いたが、今後は研究を無脊椎動物、特にウニなどの棘皮動物に拡張し、他の実験動物の色素形成の抑制による内部構造の可視化の研究にも取り組みたい。

謝辞

本研究は、研究課題「薬剤による後天的アルビノ(白子) 個体の作製方法の探索」として 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成を受けて行いました。所長ならびに所員各位に深謝いたします。

文献

- 1) Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y and Fukuda M (1991) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 101: 609-613. (in Japanese)
- 2) Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K and Kuriki T (2004) Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 510-514.
- 3) Kang HS, Kim HR, Byun DS, Son BW, Nam TJ and Choi JS (2004). Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* 27: 1226-1232.
- 4) Xiao L, Matsubayashi K and Miwa N (2007) Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced

- melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. *Arch. Dermatol. Res.* **299**: 245-257.
- 5) Karlsson J, von Hofsten J and Olsson PE (2001) Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* (NY) **3**: 522-527.
 - 6) Elsalini OA and Rohr KB (2003) Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Dev. Genes Evol.* **212**: 593-598.
 - 7) Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH and Yoon TJ (2007) Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res.* **20**: 120-127.
 - 8) Pickart MA, Sivasubbu S, Nielsen AL, Shriram S, King RA and Ekker SC (2004) Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. *Pigment Cell Res.* **17**: 461-470.
 - 9) Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH and Lee SK (1999) Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **22**: 232-236.
 - 10) 松谷武嗣, 茂木和枝, 日野晶也, 小笠原強, 竹内重夫, 豊泉龍児 (2006) アルビノ-アフリカツメガエル胚に対する微量注射技術を用いた半透明な脳室形態並びに脳室内液流の可視化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **17**: 53-61.