

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20047

研究課題名(和文) 金属ナノ粒子によるメダカ腸内細菌叢と免疫機能に対する影響

研究課題名(英文) Effects of Metal Nanoparticles on Gut Microbiome and Immune System using Medaka

研究代表者

柏田 祥策 (Shosaku, Kashiwada)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：20370265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカの自然免疫、腸内細菌叢などに与える銀ナノ粒子(SNC)および二酸化チタンナノ粒子(TiO<sub>2</sub>-NP)の影響を包括的遺伝子解析および病原菌感染実験を行って評価した。皮膚および腸の短鎖脂肪酸産生に関連する細菌叢が、SNCまたはTiO<sub>2</sub>-NP暴露によって影響を受けることを明らかにした。メダカに対する感染性細菌*Edwardsiella piscicida*の感染実験の結果、SNC曝露では、メダカの生存率が明らかに低下したが、TiO<sub>2</sub>-NP曝露の場合では明らかな生存率の低下は無かった。少なくとも、SNC曝露では腸内の短鎖脂肪酸が減少することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の化学物質の生態リスク研究は個体に対する直接的影響に関する内容であった。しかし生物は、一個体と雖も共生細菌叢(マイクロ生態系)との調和の下にその健全性が維持されている。本研究は、金属ナノ粒子をプローブとして、メダカと腸内マイクロ生態系に係るsynbioticsのみならず、免疫機能に対する影響の一端を生態毒性学的に明らかにした。メダカのsynbioticsはヒトにおけるそれとは異なると予測されたが、モデル生物メダカを用いた本研究成果は、今後の関連研究に対して貴重な情報の提供を行うだけでなく、脊椎生物モデルとしての利用価値を高めた。

研究成果の概要(英文)：The effects of silver nanoparticles (SNC) and titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NP) on the innate immunity and intestinal flora of medaka were evaluated by comprehensive genetic analysis and pathogen infection experiments. The bacterial flora associated with short-chain fatty acid production in the skin and intestine was found to be affected by SNC or TiO<sub>2</sub>-NP exposure. Investigation of the medaka with the infectious bacterium *Edwardsiella piscicida* showed that SNC exposure significantly reduced medaka survival, but TiO<sub>2</sub>-NP exposure did not. At least, SNC exposure was found to reduce intestinal short-chain fatty acids.

研究分野：生態毒性学

キーワード：ナノ毒性 銀ナノ粒子 二酸化チタン メダカ 免疫毒性 腸内細菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1993年に単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)が発見されて以来(Iijima 1991)、ナノテクノロジー産業は、カーボンナノチューブを含む新規化合物あるいは既存化合物をナノサイズに加工した工業ナノ製品(単層・多層カーボンナノチューブ、フラーレン、量子ドット、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛、ナノ銀などのナノマテリアルを材料とする)を作り出し、瞬間に電気製品、食品、医薬品、衛生用品、化粧品、エネルギー関連部品、衣服、航空宇宙科学および農業分野へと飛躍的に応用された(注:ナノマテリアルとは、外寸の少なくとも1辺が100 nm以下の物体であり(National Nanotechnology Initiatives)、電氣的・物理化学的あるいは生物医学的な性質を持つように合成された固体・コロイド・イオンなどの化合物を指す(Shelley et al. 2005))。工業ナノ製品数は、2005年には100程度であったが、2010年には1400を超えるまでになった(Massarsly et al. 2014)。最近、その成長はやや鈍化傾向(2013年は1600程度)を示し、市場に成熟の兆しが見えているものの、市場経済規模は2011年には200億ドルを超え、2017年までに400億ドルを超えると予測されている(BCC 2012)。成熟していくナノ産業の一方で、その生産品の安全性については多くは不明確のまま、生産→流通→廃棄(環境への放出と拡散)の順路を辿っている。先進国においては国際市場に流通する化学物質は全てヒト健康と生態系への影響を評価することが義務付けられており、上市前にその生産量に応じて経済協力開発機構(OECD)の化学物質試験法に準拠した毒性試験を受ける必要がある。しかしながら工業ナノ製品については、ナノサイズ由来の物体としての物理化学的作用に起因する毒性作用が予測されてはいるものの、多くは既存化学物質(カーボン、重金属など)を材料として用いていることから、工業ナノ製品に新規に毒性試験を課す事の是非についての議論がある。そのような国際情勢の中で、重金属製品である銀ナノ粒子、酸化チタンナノ粒子などは、とくに高生産量化学物質として、OECD、ISO(国際標準化機構)などで毒性およびリスクが協議されている。

### 2. 研究の目的

化学物質のリスク評価には、そのハザードとしての致死毒性を直接評価することが一般的とされているが、近年、重金属などによる化学汚染が環境生物の免疫機能を低下させて生物個体数の減少を招く可能性が指摘された(Beineke et al. 2009)。この可能性を支持する傍証研究として、銅汚染水のウナギへの曝露がピブリオ病の発症を増加させた報告(Rødsæther et al. 1977)または鉛やカドミウムなどの曝露がマウスの結核菌感染率を高めたという報告(Cook et al. 1975、Ek et al. 2000、Dyatlov et al. 2002)などがある。さらに最近、腸内共生細菌叢に含まれるprobiotics(有用菌)が宿主個体の免疫機能に大きく貢献すること、またprobioticsの成長を促すprebiotics(オリゴ糖等)の存在とそれらの相乗効果を示すsynbioticsが知られるようになり(Littman & Pamer 2011)。上述した重金属曝露による病原細菌抵抗性の低下の要因として、元来抗菌性を持つ重金属が、宿主の腸内細菌叢に影響を与えた可能性が考えられた。そこで本研究の目的は、高い抗菌活性/酸化活性をもつ銀ナノ粒子および酸化チタンナノ粒子を用いて、環境指標生物であるメダカの腸内共生細菌叢および免疫機能に与える影響を、synbioticsへの影響も含めて明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 金属ナノ粒子のメダカ免疫系への影響(柏田)(図1)

銀ナノ粒子のメダカ免疫系への影響については、柏田(代表研究者)による予備検討の結果、銀ナノ粒子(平均粒径40 nm、0.05 mg/L)曝露区において、Toll様受容体シグナル・カスケードに関与する転写因子NFκBおよびサイトカインTNFαの遺伝子発現が攪乱を受けることを見出している。攪乱の程度は、メダカ受精卵、孵化仔魚および成魚の各成長段階においてそれぞれ異なるが、成魚において影響が最も顕著であった。さらに、銀ナノ粒子曝露区では魚病菌*Edwardsiella tarda*に対する易感染性が増大して、対照区(銀ナノ粒子非曝露区)の感染率20%と比較して、感染率が80%に増大していた。この予備検討結果を踏まえて、本研究ではまず、銀ナノ粒子同様に酸化活性を有するが、ほとんどイオン化しないとされる酸化チタンナノ粒子(平均粒径40 nm、0.05 mg/L)のメダカ免疫系への影響について同様な検討を行い、イオン化して塩化銀錯体が毒性本体とされる銀ナノ粒子およびほとんどイオン化しないが高い酸化活性を有する酸化チタンナノ粒子のメダカ免疫関連遺伝子への影響を比較検討する。



図1. 金属ナノ粒子によるメダカ免疫系の攪乱。

#### (2) 金属ナノ粒子のメダカ腸内共生細菌叢に与える影響と糖鎖生物学的評価(柏田・宮西)(図2)

Littman および Pamer (2011) により、免疫機能は共生細菌叢とくに腸内細菌叢の繁茂とともに成熟することが知られている。免疫と腸内細菌との関連性は古くから研究されており、腸内細菌は単なる共生ではなく腸内細菌叢の平衡を改善することで宿主の健康に有利に作用するという“synbiotics”として知られるようになり、最近、Abidら(2013)によってこのsynbioticsは魚類の健康維持にも貢献していると報告されている。そこで、メダカの成長に伴う腸内細菌叢の健全な

変遷・成熟に対する、銀ナノ粒子または二酸化チタンナノ粒子の影響を、DNA メタゲノム解析を行い評価する。その際、水中およびメダカ体表面（上皮粘膜）に存在している細菌叢についても同様に解析して、腸管上皮粘膜に存在している細菌叢との相違を解析するとともに、発酵によって産生するとされる脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸など）の有無を HPLC 分析して細菌叢の機能を評価する。次いで MALDI-TOF-MS を用いて、腸管上皮に発現している粘質物（糖タンパク）あるいは炎症シグナル（レクチンなど）を分析してナノ粒子曝露影響を糖鎖生物学的に評価する。

### （3）金属ナノ粒子のメダカ臓器特異的な免疫攪乱（柏田）（図2）

銀ナノ粒子および二酸化チタンナノ粒子のメダカ体内（臓器）への移行・蓄積については、曝露されたメダカの凍結切片を作成して、散乱光を観測する CytoViva 顕微鏡を用いて生体内分布観察を行う。さらに銀ナノ粒子または二酸化チタンナノ粒子を曝露されたメダカから各臓器（肝臓、脾臓、胆嚢、腎臓、小腸、生殖腺、脳および血液）を摘出する。それぞれの臓器について、最近開発された金属ナノ粒子の単一粒子を特異的に認識して定量分析する手法である SP-ICP-MS（単一粒子誘導結合プラズマ質量分析）法を用いて、銀ナノ粒子および二酸化チタンナノ粒子をそれぞれ定量分析する。免疫に係る臓器として、肝臓、脾臓、腎臓、小腸および血液については、RNAseq 解析を行い、銀ナノ粒子または二酸化チタンナノ粒子のメダカへの曝露が、健全な遺伝子発現に対してどの程度の影響を与えるのかを包括的に評価する。この結果は、臓器特異的な免疫毒性発現の評価に用いる。

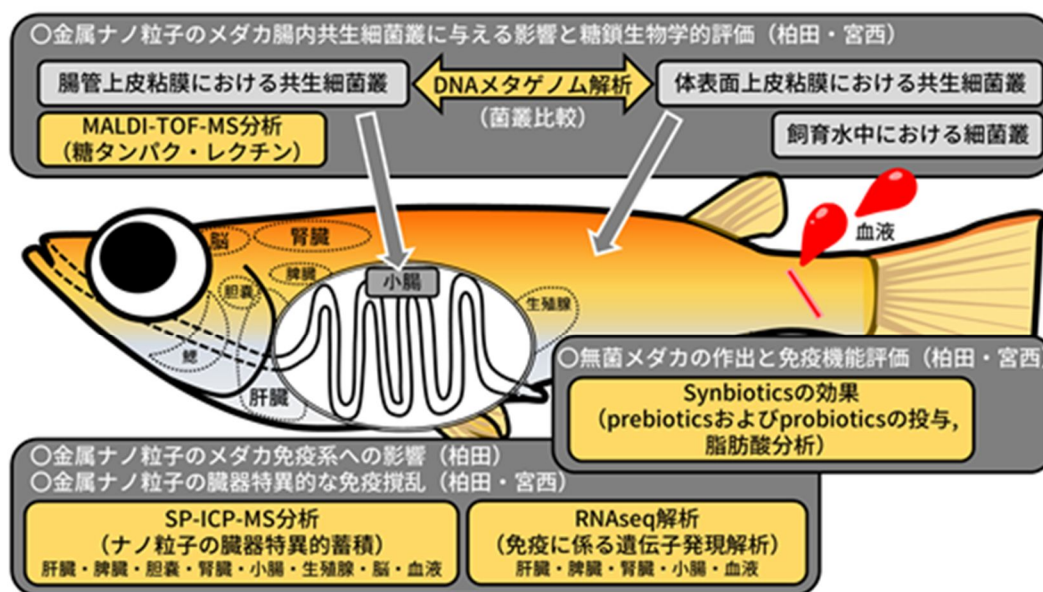


図2. 金属ナノ粒子による腸内細菌叢攪乱と免疫機能への影響.

## 4. 研究成果

### （1）金属ナノ粒子のメダカ免疫系への影響

SNC をメダカ受精卵、孵化仔魚および成魚に曝露してメダカの免疫関連遺伝子発現（nfbk1、nfbk2、および TNF $\alpha$ ）に与える曝露影響を評価した結果、メダカ受精卵、孵化仔魚および成魚に対する SNC 曝露は、それぞれの成長段階におけるメダカの免疫関連遺伝子（nuclear factor kappa B subunit 1; nfbk1、nuclear factor kappa B subunit 2; nfbk2 および tumor necrosis factor-like; TNF $\alpha$ ）の発現には、成長段階毎に異なる亢進と抑制が確認された。これを受けて、魚病細菌 Edwardsiella tarda に対する抵抗性に与える SNC の影響を評価した結果、SNC は初期生活段階（受精卵および孵化仔魚）のメダカよりも、成魚のメダカに対してより顕著な免疫毒性を呈し、魚病細菌 E. tarda 感染による死亡率を増大させることを明らかにした。一方で TiO<sub>2</sub>-NP 曝露群では、免疫関連遺伝子の発現が有意に亢進されたが、感染実験においても有意な影響を与えなかった。

### （2）金属ナノ粒子のメダカ腸内共生細菌叢に与える影響と糖鎖生物学的評価

16S RNA メタゲノム解析では、SNC あるいは TiO<sub>2</sub>-NP の曝露によって表皮および腸内細菌叢の種構成あるいは割合が変化した。そこから算出した  $\alpha$  多様性はコントロール（表皮：24、腸管：13）に対して SNC 曝露により減少傾向（表皮：21.0、腸管：7.0）を示した。一方、TiO<sub>2</sub>-NP 曝露により増加傾向（表皮：40.0、腸管：28.0）を示した。さらに MALDI-TOF-MS 分析の結果、SNC 曝露では腸内の短鎖脂肪酸が減少することが明らかになった。また、血液凝集活性法によるレクチン活性は、オスのメダカについてコントロールの最終凝集活性が128.0だったのに対し、SNC あるいは TiO<sub>2</sub>-NP を曝露した場合、両曝露ともに16.0へと減少した。さらに糖鎖構造解析へと詳細な実験に進めたところ、コントロールに対して SNC あるいは TiO<sub>2</sub>-NP の曝露によって

中性糖鎖および酸性糖鎖のピーク数が増加したため、糖鎖の崩壊あるいは減少といった何らかの異常をきたしている可能性が示唆された。

### (3) 金属ナノ粒子のメダカ臓器特異的な免疫攪乱

免疫機能の発達に関して、近年の研究によると免疫機能の発達は単に生物個体の成長にのみ依存するのではなく、共生する腸内細菌叢の存在が重要であることが明らかになりつつある。SP-ICP-MS 分析および CytoViva 顕微鏡分析の結果、SNC を曝露されたメダカの臓器における SNC 蓄積量を定量した結果、検出された SNC および TiO<sub>2</sub> NPs の 90%以上が消化管（腸）に蓄積していたこと、さらには SNC を曝露されたメダカの糞排泄量が増大したことから、抗菌活性を持つ SNC および TiO<sub>2</sub> NPs がメダカの腸内細菌叢に影響を与えた可能性が考えられた。そこで、特に高い抗菌活性を持つ SNC について、メダカの腸内細菌に与える影響を検証した結果、SNC はメダカの腸内細菌数を減少させるだけでなく、腸内細菌叢の種構成にも変化を与えていた。さらに、宿主の免疫系を活性化させる機能を持つ腸内細菌由来代謝物（酢酸および酪酸）の濃度も低下させることが明らかになった。また、本研究で感染実験に用いた魚病細菌 *Edwardsiella tarda* のメダカ体内における感染分布について、*E. tarda* の GFP 遺伝子組み換え体を用いて詳細な 3D マップを作製した結果、*E. tarda* はメダカの消化管（腸）に最も多く分布していた。これらの結果から、少なくとも SN の曝露はメダカの腸管内マイクロ生態系を攪乱し、メダカの生体防御機能を低下させることで魚病細菌 *E. tarda* の易感染性誘導の要因となったと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka Chisato, Kato Yumie, Ariyoshi Tadashi, Takasu Masaki, Narazaki Takahito, Nagasaka Seiji, Tatsuta Haruki, Kashiwada Shosaku	4. 巻 233
2. 論文標題 Comparative toxicities of silver nitrate, silver nanocolloids, and silver chloro-complexes to Japanese medaka embryos, and later effects on population growth rate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2017.10.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yumie Kato, Chisato Kataoka, Tadashi Ariyoshi, Kaori Shimizu, Hisato Takeuchi, Yoshihiro Kagami, Risa Horiuchi, Nobumitsu Miyanishi, Shosaku Kashiwada
2. 発表標題 Immuno-toxic effects of silver nanocolloids and titanium dioxide nanoparticles on medaka fish
3. 学会等名 31st Congress of New European Society for Comparative Physiology and Biochemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumie Kato, Chisato Kataoka, Tadashi Ariyoshi, Yoshihiro kagami, Shosaku Kashiwada
2. 発表標題 Comparative toxicity of silver nanocolloids and titanium dioxide nanoparticles using medaka
3. 学会等名 Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 28th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumie Kato, Chisato Kataoka, Tadashi Ariyoshi, Kaori Shimizu, Hisato Takeuchi, Yoshihiro Kagami, Risa Horiuchi, Nobumitsu Miyanishi and Shosaku Kashiwada
2. 発表標題 Environmental Risk of Silver Nanocolloids and Titanium Dioxide Nanoparticles on Immune Function and Pathogenic Tolerance of Medaka
3. 学会等名 第21回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumie Kato, Tadashi Ariyoshi, Chisato Kataoka, Shosaku Kashiwada
2. 発表標題 Comparative toxicity of silver nanocolloids and titanium dioxide nanoparticles using medaka
3. 学会等名 SETAC EU (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kana Suzuki, K. Shimuzu and S. Kashiwada
2. 発表標題 Toxico-bio-imaging of silver nanocolloids using medaka, <i>Oryzias latipes</i>
3. 学会等名 The International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東洋大学生命環境科学研究センター
------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮西 伸光  (Miyanishi Nobumitsu)  (80372720)	東洋大学・食環境科学部・教授    (32663)	