

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：32663

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651028

研究課題名(和文) 銀ナノ粒子の魚類生態毒性に関する網羅的な詳細リスク評価

研究課題名(英文) Comprehensive risk assessment of silver nanoparticles on fish molecular ecotoxicology

研究代表者

柏田 祥策 (Kashiwada, Shosaku)

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：DNAマイクロアレイの結果、118の遺伝子が発現上昇、117の遺伝子が発現減少した。そこから形態形成に係る5つの遺伝子を選び、qRT-PCR解析を行った結果、ctslおよびtpm1は発現抑制、atp2a1およびhoxb6bは発現昂進、rbpでは顕著な差は見られなかった。発現抑制した遺伝子において、RNAiを行った結果、頭部および眼の形態形成異常、脊索の湾曲、血栓および虚血の個体を得た。ctsl、tpm1およびrbpの3遺伝子がSNCsの標的遺伝子である可能性が明らかになった。SNCsの毒性影響は、解離した銀イオンが高く寄与していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated silver nanocolloids (SNCs) effects on gene expression with DNA microarray analyses. 118 genes were up-regulated and 117 genes were down-regulated. Since severe morphological defects and damage of central nervous system were observed in SNCs-exposed medaka embryos, we chose five genes that were relevant to vertebrate embryogenesis and/or morphogenesis and well-studied in mammalian systems. Cathepsin L (ctsl), tropomyosin 1 alpha (tpm1), and retinol-binding protein (rbp) were significantly down-regulated in SNCs exposed embryos, while sarcoplasmic / endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA1, atp2a1) and homeobox B6b (hoxb6b) were both up-regulated. These genes were validated with qRT-PCR. We performed gene knockdown techniques of RNAi. We observed the deformities in medaka embryos injected with siRNA of ctsl, tpm1 or rbp. We considered the three genes are target gene candidates of SNCs.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：生態系影響評価 ナノマテリアル メダカ

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーを用いた医薬・工業品の開発は年々増加しており、ナノテクノロジーは多くの利益をもたらすと期待されている。一方で、ナノ物質の生体影響の作用機序および環境健康リスク評価は不十分であるため、ナノ物質の曝露によって生じる環境生態系ならびにヒト健康へのリスクが懸念されている。国際ナノ物質市場の80%を占める医薬品・衛生用品部門において、銀ナノ粒子はその高い抗菌作用が有望視されて同部門の60%を占めている。そのためOECDなどでは、使用・廃棄後に排水などを經由して環境を汚染する新規環境汚染物質として危惧されている。ナノ粒子の水圏環境挙動研究としては、柏田(研究代表者)らによる金ナノ粒子(65 nm x 15 nm)の河口域生態系メゾコズム内挙動研究が唯一であり、金ナノ粒子が食物連鎖内で分布することを明らかにしている(*Nature Nanotechnology* 4 (7): 441-444, 2009)。さらに生物体内挙動研究としては、柏田(同)による蛍光ラテックスナノ粒子(直径40 nm)の透明メダカ体内挙動研究が代表的な研究事例である(*Environmental Health Perspectives* 114 (11) 1697-1702, 2007)。銀ナノ粒子を用いた生体影響研究としては、銀ナノ粒子曝露がゼブラフィッシュの胚発達に影響を与えて孵化率が低下した報告(*Nanotechnology* 19: 255102, 2008)があるが、作用機序は不明確である。最近、米国のScientific Americanは、銀ナノ粒子は魚類奇形を誘導すると報じた(<http://planetearth.nerc.ac.uk/news/story.aspx?id=738>)が、英国のNatural Environment Research Councilは「銀ナノ粒子は魚類に毒性を示さない」(<http://planetearth.nerc.ac.uk/news/story.aspx?id=738>)と発表するなど現在評価が分かれている。一方柏田は、銀ナノ粒子(直径3.6nm)をメダカ受精胚に6日間曝露(0.5mg/L)した結果、酸化作用および胚発達への強い毒性作用(心臓血管前膜水腫、管状心臓形成、血栓、虚血症、脊索発達障害、脳視神経発達障害など)を確認した。さらに一部メダカ・マイクロレイ分析を行った結果、細胞膜上に存在するCa²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子群および形態形成関連遺伝子群の発現に有意な変化を確認した。しかしpH依存的に解離する銀イオンの作用機序が不明確であるので、他要因を全く含まない「銀イオンのみ」での試験が今後は非常に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究において重要なことの一つに、毒性がナノ粒子に直接起因するのか解離銀イオンに起因するのかを明確にすることである。そこで新たに開発した「銀ナノ粒子固相化ウェルプレート」を用いて、銀ナノ粒子および解離銀イオンの生態毒性を区別して評価す

る。そして遺伝子発現解析データを組み込んだ個体群理論解析(生命表データ解析)を行い、銀ナノ粒子の詳細かつ網羅的な生態リスク評価を行う。

3. 研究の方法

生物の化学物質感受性は受精胚または孵化仔魚の時期が最も高く、影響も深刻である。卵膜で外部環境から守られているメダカ受精胚を用いた化学物質の卵膜透過性とそれに起因する胚および孵化仔魚への生態影響研究は、水生生物のみならずヒトを含む脊椎動物ならびに環境・生態系研究のために重要である。本研究では、メダカ受精胚を用いて毒性影響が不明確である銀ナノ粒子および銀イオンの生体内挙動、メダカ成長依存的な毒性メカニズムについて、網羅的遺伝子発現解析(マイクロレイ解析)を行い、銀ナノ粒子の生態影響について詳細かつ網羅的な研究を行う。とくに本研究では、独自に開発した「銀ナノ粒子固相化ウェルプレート」を用いて、銀ナノ粒子の生態影響研究で国際的懸案となっている解離銀イオンのみの影響についても詳細に検討する。

4. 研究成果

遺伝子レベルでの毒性発現解明のために、DNAマイクロレイ解析を行った。メダカ受精胚ステージ21からSNCs 0.05 mg/L(超純水溶液)で48時間曝露し、SNCsの遺伝子発現に対する影響を網羅的に調べた。そこから哺乳動物で既知である形態形成に係る5つの重要な遺伝子、ctsl, tpm1, rbp, atp2a1 および hoxb6b を抽出した。これら5遺伝子の発現への影響を、ステージ21から孵化まで、SNCs 0.05 mg/L(1×ERM溶液)で曝露し、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)を用いて再確認した。これまで高濃度のSNCs曝露で見られたような形態形成異常の表現形を得るために、発現減少の遺伝子でsiRNAを、1細胞期の受精胚にマイクロインジェクションし機能解析実験を行った。

SNCsからの銀イオンの解離は、酸性条件下で増加することがわかっている。メダカ胚とSNCsが最初に接するメダカ体表面のpH分布を調べるために、蛍光pH指示薬SNARF-1-AMで染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。

毒性発現メカニズム解明のため行ったDNAマイクロレイの結果、118の遺伝子が発現上昇、117の遺伝子が発現減少した。また、それらの遺伝子を機能別にグループ分けしたところ、発現上昇、発現減少ともに上位4グループを、タンパク質合成、細胞周期、シグナル伝達および転写が占めていることがわかった。そこから形態形成に係る5つの遺伝子を選び、定量的リアルタイムPCR法を行った結果、対照区と曝露区を比較して、ctsl および tpm1 は発現抑制、atp2a1 および hoxb6b は発現昂進、rbp では顕著な差は見

られなかった。この qRT-PCR の結果から ,DNA マイクロアレイ解析結果を支持する強固なデータを得た (図 1)。

Five Genes from Microarray and Validations				
Gene name	Protein name	Microarray ratio	qRT-PCR ratio	Physiological relatives
<i>atp2a1</i>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	2.1	1.4	Calcium pump on endoplasmic reticulum, heart dysfunction, heart abnormality.
<i>hoxb6b</i>	Homeo box B6b	1.8	1.6	Regulation of patterns of anatomical development (morphogenesis).
<i>ctsl</i>	Cathepsin L	0.68	0.65	Lysosomal cysteine proteinase. Implication in tumor invasion, bone resorption, myocardial ischemia, and growth regulation.
<i>tpm1</i>	Tropomyosin 1 alpha, brain	0.65	0.62	Calcium dependent regulation of vertebrate striated muscle contraction.
<i>rbp</i>	Retinol-binding protein, cellular	0.57	0.55	Carrier proteins that bind retinol related chemically to vitamin A and regulate epithelial cell growth, proliferation and differentiation, growth of bone tissue, immune function, and activation of tumor suppressor genes.

図 1 . 銀ナノ粒子の標的遺伝子候補

そこで, DNA マイクロアレイ解析で発現抑制した遺伝子において, siRNA を用いた機能解析実験を行った。その結果, *ctsl*, *tpm1* および *rbp* の 3 遺伝子に対する siRNA をインジェクションした個体で, 頭部および眼の形態形成異常, 脊索の湾曲, 血栓および虚血の個体を得た。この表現型の異常が, 高濃度の SNCs で曝露した際の表現型に類似している点から, *ctsl*, *tpm1* および *rbp* の 3 遺伝子が SNCs の標的遺伝子である可能性が高いことが明らかになった (図 2, 3, 4)。

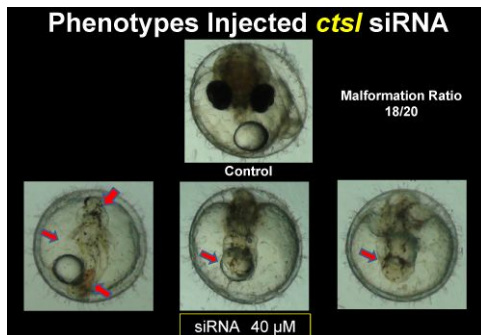


図 2 . *ctsl* の RNAi 結果

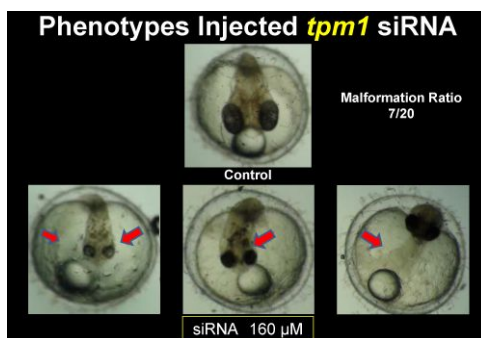


図 3 . *tpm1* の RNAi 結果

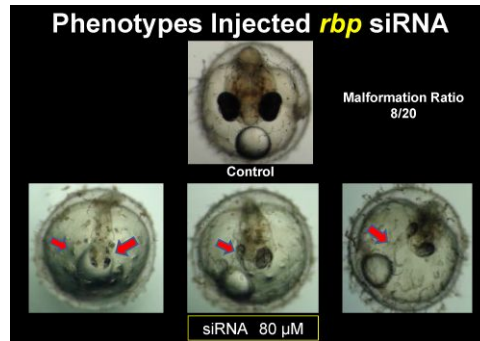


図 4 . *rbp* の RNAi 結果

蛍光 pH 指示薬 SNARF-1-AM を用いてメダカ体表面の pH 分布の視覚化のために共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った結果, メダカ受精胚上皮細胞の pH は約 6 付近であった (図 5)。

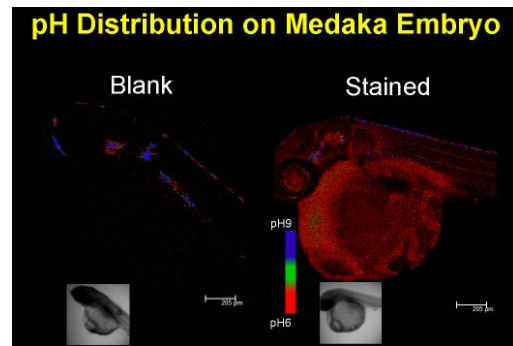


図 5 . メダカ受精胚における pH イメージング

これらの結果より, SNCs がメダカ体表面に付着した場合, 銀イオンが解離しやすい事が考えられた。これまで我々の研究グループでは, 銀イオンのみの影響を評価できる銀ナノ粒子固相化ウェルプレート (Silver Nano Particle Plate; SNPP) を作成した。この SNPP を用いた実験では, メダカ受精胚を高濃度の SNCs で曝露した際に見られたような形態形成異常の個体が得られた。(図 6)

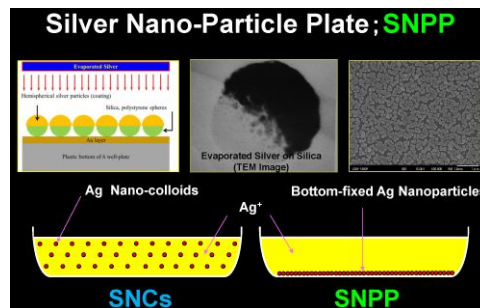


図 6 . SNPP 概念図

その結果から, SNCs の毒性影響は, 銀ナノ粒子自身によるものだけでなく, 解離した銀イオンが高く寄与していることが示唆された。環境中の淡水は pH 6 付近以下の弱酸性を示す。そのような酸性条件下の環境水中に

SNCs が放出された場合、銀イオンを解離しやすく、環境水中の生物への毒性が高まると考えられる。環境水中に放出された SNCs および体表面に付着した SNCs は銀イオンを解離すると考えられた。銀イオンが生成される場合電子が放出され、酸素と反応して活性酸素を生み出す。この活性酸素は酸化ストレスおよび DNA に損傷を与えることが知られている。すなわちメダカ受精胚の DNA 損傷が、標的 5 遺伝子の mRNA 発現に影響を与えた結果、形態形成異常が誘導されたと考えられる (図 7)。

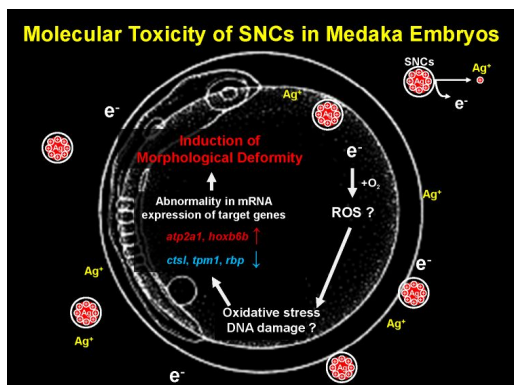


図 7. 銀ナノ粒子の分子毒性メカニズム (推定)

本研究の結果、SNCs がメダカ受精胚の遺伝子発現に影響を与えることが明らかになることができた。今後の銀ナノ粒子の毒性研究およびナノサイズの銀の規制に重要な知見を与えると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

柏田 祥策, 銀ナノ粒子が海洋環境に及ぼす毒性, 第 6 回海洋環境研究委員会, 神戸大学(兵庫), 2014 年 3 月 7 日
Takuto Niwa, Tadashi Ariyoshi, Hiroshi Nakamura, Yoshihiro Kagami, Misato Fujita, Shosaku Kashiwada, Functional Gene Analyses Of Medaka Embryo Exposed to Silver Nanocolloids, Thirty-Fourth Annual Meeting in North America, Nashville, Tennessee, USA. Nov 17-21, 2013.

柏田 祥策, 化学物質の生態リスク評価の今後 多様性ある生態系を理解することから始めよう, 第 19 回日本環境毒性学会研究発表会 企画シンポジウム, 東洋大学(東京), 2013 年 9 月 7 日

丹羽拓人, 中村 浩, 鏡 良弘, 柏田祥策: メダカ受精胚に対する銀ナノ粒子の毒性発現メカニズムの解明, 第 19 回日

本環境毒性学会研究発表会, 東洋大学(東京), 2013 年 9 月 7 日

T. Niwa, Y. Nakagame, T. Ariyoshi, S. Kashiwada: Silver nanocolloids and target genes analyses in medaka embryos. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 22nd Annual Meeting in Berlin, Germany (May 21-25, 2012).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.aqua-env.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
柏田 祥策 (Kashiwada, Shosaku)
東洋大学生命科学部・教授
研究者番号: 20370265

(2) 研究分担者 (0)

研究者番号:

(3) 連携研究者 (0)

研究者番号: