

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00569

研究課題名(和文)市販の日用品・化粧品に含まれるナノ粒子による腸内細菌への影響

研究課題名(英文) Effects of nanomaterials contained in commercially available daily necessities and cosmetics on bacteria

研究代表者

峯木 礼子 (MINEKI, Reiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40317475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子の生育への影響をグラム陰性菌(G-)及びグラム陽性菌(G+)で調べた。汎用されるカーボンブラックや、活性酸素生産が比較的低いとされるルチル型酸化チタンでさえG-の生育を特異的に阻害した。そこで、生育阻害を起こしたG-である大腸菌とコントロールの大腸菌のタンパク質の網羅的比較定量解析で発現タンパク質の相違を調べた。疾病に関与する総抗酸化能測定では生育阻害された大腸菌の総抗酸化能はコントロールと比較すると30%程度低下した。さらに、有機酸測定ではグルコン酸が大幅に減少した。大腸菌自体の健康度や他細菌との相互作用、細胞レベルでの関連性の有無、腸管クロストークなどへの影響に興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：The influence on the growth of the nanoparticles were investigated with gram-negative bacteria (G-) and gram-positive bacteria (G+). Commercially used carbon black and even rutile type titanium oxide, which is said to have relatively low active oxygen production, specifically inhibited the growth of G-. Therefore, differences in the expressed proteins were examined by comprehensive comparative quantitative analysis of E. coli which is G- inhibiting growth and E. coli of control. In the total antioxidant capacity measurement involved in the disease, the total antioxidant capacity of the E. coli inhibited growth decreased by about 30% as compared with the control. Furthermore, gluconic acid was greatly decreased in organic acid measurement. We were interested in the health of E. coli itself, the interaction with other bacteria, the existence of relevance at the cell level, the influence on intestinal crosstalk and so on.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ナノ粒子 環境影響 健康影響 腸内細菌 プロテオミクス メタボロミクス ストレス

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーは、比較的新しく、まだ発展途中の分野である。現在、多量に用いられているナノ粒子は、カーボンブラックやシリカ粒子、チタン粒子などであり、今後カーボンナノチューブ、フラーレンと増えていくことが予想される。積極的な研究開発が国際的に進められ、我々の生活に多大な恩恵を与えている。ナノ粒子は組成単位が小さいことから従来の材料にない優れた性質を有する。近年では工業用品・化粧品・医薬品などの多量にわたる商業用品に多用され、私たちはナノ粒子に暴露される機会が大変多くなってきた。発展が著しいがためにナノ粒子製品の毒性に関しての知見は少ない。サイズが小さくなることで、ヒトの健康への影響が懸念される。近年では、期待して使われていたアスベストが中皮腫を引き起こすなど、社会的な問題になったことは記憶に新しい。同様に超微細なナノ粒子が体内に入ると肺などに蓄積し、アスベストのような健康被害が起こるのではないかと危惧されている。マウスの実験では直接気管内投与されたナノ粒子がマウスの肺に対しDNA損傷性や突然変異原性を示され(Kato, T et al.: *Nanotoxicology*, 7: 452-461, 2013) 吸入、気管内、点鼻、皮下など投与法に関わらずナノ粒子が妊娠した母マウスの血流に入りナノ粒子は胎盤を通じ胎児へと移動し、さらに胎児の脳関門を通過する(Onoda, A et al. *PLoS One*; 9(4):e94336, 2014) ことが報告された。一方で炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪肝炎、大腸癌、2型糖尿病、肥満など腸内細菌が多種にわたる疾患に関与する報告がある。ナノ粒子が有害であるという理由として粒子のサイズが小さいほど生体内、細胞内に取り込まれやすい、また表面積が大きいため毒性が強くなるのではないかという指摘がされているが、ナノ粒子のリスク評価は未だはっきりとしていないのが現状である。しかし、ナノテクノロジーの発展・進化は目覚ましいものがあり、より小さな粒径のものや様々な形状のナノ製品が生産されている。それによって、生産現場や廃棄等による環境へのナノ粒子の放出が深刻な結果を招く前に、早急にナノ粒子の環境アセスメントが必要とされる。工業的に生産されるナノ粒子・ナノ材料と生物との分子・細胞レベルでの相互作用、環境との相互作用、環境中での移行や変質、曝露評価や毒性の研究が必要とされ、多くの研究が現在進行している。ナノ粒子の影響研究ではマウスなどの動物実験や動物細胞によるものが主に行われてきたが、ナノ粒子と微生物の研究はあまりされていないのが現状である。

2. 研究の目的

人類はナノテクノロジーの発展の恩恵を受けた豊かな生活を築いているが、環境中に放出されるナノ粒子は工業の発展と共に急増

しており、ナノ粒子の毒性機構の解明は重要かつ喫緊の課題である。微生物は環境変化を感知し、変化に適応しながら生きている。ナノ粒子製品に対しても刺激応答や順応、適応現象が起きるであろうとの考えのもと、市販の日用品・化粧品に含まれるナノ粒子の毒性機構を解明するため、食物連鎖の下位に位置する細菌や上位動物の腸内細菌を研究対象とし、ナノ粒子製品の環境毒性とナノ粒子製品の生態系への影響を解明することを目的として、微生物に及ぼす市販ナノ粒子製品の影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) 生育テスト

多種の細菌を用いて系統的に広範囲にナ

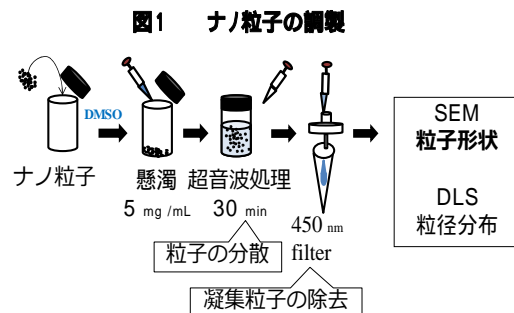
表 1 使用したナノ粒子

名前	Special Black 250	Printex 90	TiO ₂ (ルチル型)
購入先	Degussa 社		Aldrich 社
大きさ	95 nm	14nm	100 nm
利用例	黒色顔料、トナーなど		日焼け止めなど
変異原性 *(Ames 法)	あり	なし	なし

** Mineki et al., *Material Technol.*, 26, 303-310 (2008)

ノ粒子製品(Carbon Black special black250、Carbon Black printex90、Titanium()oxide (rutile))の生育阻害を調べた。実験には消費産物に多く利用されているナノ粒子3種類を使用した。(表1)

ナノ粒子は図1の手順に従い処理をした後



に使用した。

各菌を OD₆₀₀ = 0.3 になるまで培養後、希釈した菌液にナノ粒子はナノ粒子を添加した。Mycobacterium sp. H2-5, Deinococcus radiodurans は TSB 培地、それ以外は NB 培地で培養した。菌液をプレートに播き 2 日間培養し、コロニーカウントを行ない生育テストとした。

次に Ames 試験では変異原性が示されなかった Carbon Black Printex90 を用いて、Printex90 添加培地で培養した E. coli でナノ粒子が細菌の細胞内のタンパク質に与える影響を調べた。サンプルは腸内細菌のグラ

Δ陰性菌である *E. coli* に Printex90 を暴露して作成した。

(2) プロテオミクス

BugBuster® Protein Extraction Reagent(メルクミリポア社)で細胞を溶解し、等電点/SDS-PAGE の二次元電気泳動後銀染色し細胞内の総タンパク質の発現差異を比較した。また同じサンプルを用い Saturation 法による 2D-DIGE や Native-PAGE/SDS-PAGE でも発現差異を比較した。*E. coli* に Printex90 を暴露後、網羅的なタンパク質の発現解析とサンプル間での比較定量解析をするため AB SCIEX 社の iTRAQ 試薬を用いて標識し、LC/MS/MS 解析を行い、得られたデータをデータベースと比較するショットガンプロテオミクス解析をおこなった。

(3) メタボロミクス

細菌が作り出す有機酸は腸内細菌叢を変化させ、生育阻害へと繋がり、腸内細菌叢は病気との関係が問題となっているため CE/MS でフーズドシリカカラムを用いたアニオンモードとカチオンモード測定をして有機酸の種類がナノ粒子を暴露させることでどのように変化するかを検証した。

(4) レドックスアッセイ

生体の総抗酸化能はストレスの抵抗力の指標となるので、Metallogenics 社のキレート定量法であるレドックスアッセイを用いて総抗酸化能(TAC)を測定した。

4. 研究成果

5 種類のグラム陽性菌と 4 種類のグラム陽性菌を用いて生育テストをおこなった。(図 2 参照) 生存率とは、各濃度でのコロニー数をコントロール(ナノ粒子濃度 0 mg/ml)のコロニー数で割り、パーセントで表示したもの。

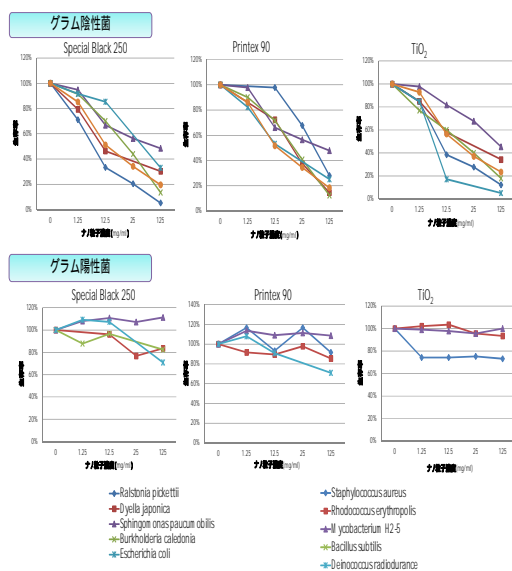


図2. 生育テスト

その結果、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べて、いずれのナノ粒子でも大きく生育が阻害された。一般的に細菌は負に帯電しているものが多くナノ粒子は正に帯電しているため、ナノ粒子が細菌に吸着すると考えられ、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べてペプチドグリカン層が薄く脂質が多い細胞壁を持つことから、ナノ粒子製品が細胞壁に傷害を与え、その傷害や取り込みによって生育が阻害されるのではないかと考えられる。肥満やガン、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患、自閉症などの病気の人々の腸内ではグラム陽性菌が多くなるとの報告が多数ある。

図 3 に示すのはナノ粒子の影響を受けたグラム陰性菌の *E. coli* の総タンパク質の発現差異をみたもの。左側が銀染色した等電点/SDS-PAGE による二次元電気泳動で総タンパク質を分離したパターンを示す。右側が Saturation 法を用いた等電点/SDS-PAGE による 2D-DIGE のパターンを示す。黄色のスポットは量的に変化のないものを示す。一方発現差異があったとされる赤いスポットはナノ粒子の影響を受けて減少したタンパク質を示し、緑のスポットはナノ粒子の影響をうけ

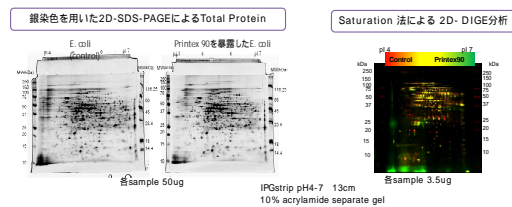


図3. 総タンパク質の比較

て増加したタンパク質を示す。どちらのパターンを見ても違いがある。すべてのパターンは 13 cm IPGstrip(pH4 ~ 7)、10 %アクリルアミドゲルで分離した。

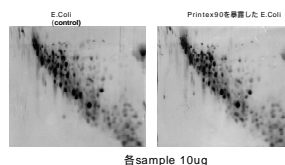


図4. Native/SDSの二次元電気泳動

図 4 には総タンパク質を一次元目に Blue Native PAGE 二次元目に SDS-PAGE を

行ったパターンを示す。Blue Native PAGE は中性に近い pH と界面活性剤の適合性により 15 kDa ~ 10 MDA の広い分子量範囲が分離でき、各タンパク質の等電点(pI)に関係なくゲル中のタンパク質を分離可能な泳動法である。

表 2 には iTRAQ によるショットガン分析の結果を示す。

E. coli に Printex90 を暴露後、網羅的なタンパク質の発現解析とサンプル間での比較定量解析をした。Printex90 を暴露した *E. coli* で増加したタンパク質はピンク系で表

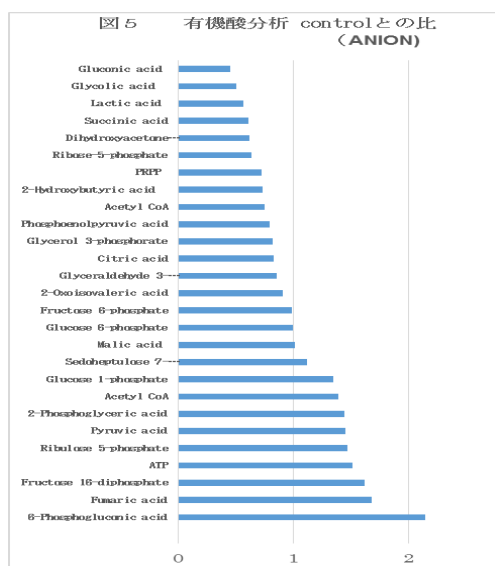
Accession #	Name
1 P0ABU0	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=menB PE=1 SV=1
2 P0A6M8	Elongation factor G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fusA PE=1 SV=2
3 P0A850	Trigger factor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tig PE=1 SV=1
4 P0AAB6	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=galf PE=1 SV=1
5 P36659	Curved DNA-binding protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cbpA PE=1 SV=2
1 P27248	Aminomethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gcvT PE=1 SV=3
2 P0A7Z0	Ribose-5-phosphate isomerase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpiA PE=1 SV=1
3 P0ADB1	Osmotically-inducible lipoprotein E OS=Escherichia coli (strain K12) GN=osmE PE=2 SV=1

表2 iTRAQによるショットガン分析の結果

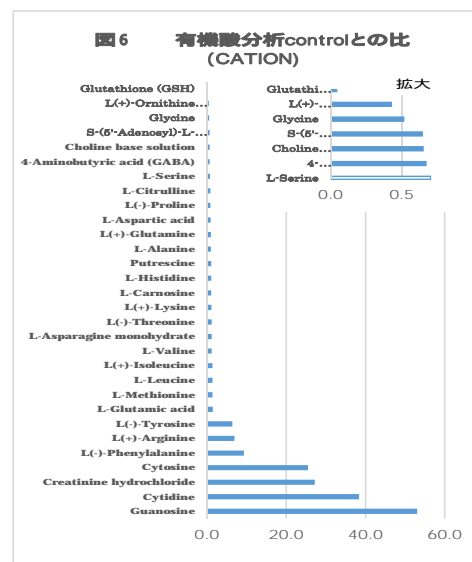
示し減少したタンパク質は青系で表示した。

その程度が強いほど濃い色を使用した。ナノ粒子を暴露することで解糖系や酸化還元酵素が増加している。生育阻害となった影響が現れているのではないと思われる。また真正細菌の翻訳に必要な因子である伸張因子とリボソームタンパク質の増加が認められた。細菌のタンパク質の生合成に影響を及ぼしていると思われる。またナノ粒子の暴露により 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase が上昇を示した。メナキノン合成経路の酵素で、腸内細菌叢との関連についての報告はないが、この物質の急激な過剰は貧血や血圧低下、慢性は呼吸困難や胃腸障害を引き起こすという報告がある。ナノ粒子の暴露により Aminomethyltransferase が低下を示した。自閉症に関与するタンパク質といわれ、腸内細菌叢の変化が発達障害に関与するという報告がある。ナノ粒子の暴露により Ribose-5-phosphate isomerase が低下を示した。腸内細菌叢との関連についての報告はないが、欠損症は末梢神経障害をひきおこす。

E. coli に Printex90 を暴露後、CE/MS で有機酸分析を行った。フーズシリカカラムを用いたアニオンモードとカチオンモード測定の結果を図5、図6に示す。



アニオン測定モードではナノ粒子の暴露により、有機酸はコハク酸、乳酸、グルコン酸と短鎖脂肪酸の水酸化物（ヒドロキシ酢酸、2-ヒドロキシ酪酸）の低下がみられた。6-ホスホグルコン酸がコントロールに比べ 2.15 倍増加し、グルコン酸は比が 0.3 と最も減少した。グルコン酸は強力なキレート剤であり、腸内の善玉菌であるビフィズス菌を増やす働きがあり、腸の免疫力を高めるのに効果を発揮する。6-ホスホグルコン酸はペントースリン酸回路の中間体である。核酸の合成に不可欠な各種の5単糖の合成に関与する物質である。また脂質の産生にも関与している。



カチオン測定モードでは *E. coli* に Printex90 の暴露によりグルタチオンの比は 0.05 と減少した。グルタチオンは、3つのアミノ酸からなるペプチドで、すべての細胞にある重要な抗酸化物質であり、細胞代謝の重要な調節因子である。肥満や、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、非アルコール性脂肪肝疾患、栄養不良などは、ヒトの腸内細菌叢のアンバランスな状態と関連がある。それゆえ、腸内細菌叢と、消化管や他の末梢組織の間の相互作用は、食事と同様に、宿主の健康と高い関連性があることが知られている。また、グルタチオンが欠乏すると酸化ストレスの影響を受け易くなると言われている。

レドックスアッセイを行い、総抗酸化能を測定した。ナノ粒子を暴露した *E. Coli* の総抗酸化能はコントロールと比較して3割程度低下した。抗酸化物質と活性酸素のバランスが崩れることで、酸化ストレスとなり、様々な疾病の原因になることが知られている。

これらによる大腸菌自体の健康度や他細菌との相互作用、また細胞レベルでの関連性の有無、さらに腸管クロストークなどへの影響

に大いに興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Amino-group carrier-protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*.
Hasebe F, Matsuda K, Shiraishi T, Futamura Y, Nakano T, Tomita T, Ishigami K, Taka H, Mineki R, Fujimura T, Osada H, Kuzuyama T, Nishiyama M.
Nat Chem Biol. 2016 Nov;12(11):967-972. doi: 10.1038/nchembio.2181 (査読有)
- Prostaglandin E receptor 4 inhibition restores UVB-induced downregulation of ATP2A2/SERCA2 in cultured normal human keratinocytes.
Kamijo M, Wada A, Mineki R, Sakanishi T, Ikeda S.
J Dermatol Sci. 2016 Jan;81(1):69-71. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.10.010. (査読有)
- Secreted tyrosine sulfated-eIF5A mediates oxidative stress-induced apoptosis.
Seko Y, Fujimura T, Yao T, Taka H, Mineki R, Okumura K, Murayama K.
Sci Rep. 2015 Sep 8;5:13737. doi: 10.1038/srep13737. (査読有)
- Cysteine protease antigens cleave CD123, the subunit of murine IL-3 receptor, on basophils and suppress IL-3-mediated basophil expansion.
Nishikado H, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Ogawa H, Okumura K, Takai T.
Biochem Biophys Res Commun. 2015 May 1;460(2):261-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.022. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 加賀麻弥、和田章乃、峯木礼子、阪西珠美、池田志幸
「ダリエー病患者の紫外線暴露による悪化機序 Prostaglandin E receptor4 が関与するATP2A2発現制御について」
第31回 角化症研究会 (海運クラブ: 平成28年7月)
2. 峯木礼子、峯木茂、「市販の日用品・化粧品に含まれるナノ粒子による微生物への

影響」

第89回日本生化学会大会(仙台国際センター:平成28年9月)

3. 赤池慶祐、末原義之、高阪真路、石井翠、窪田大介、田邊雄、峯木礼子、数野彩子、金子和夫、八尾隆史、齋藤剛
「胞巣型横紋筋肉腫のタンパク質発現解析: PP2A パスウェイの腫瘍増殖能の検討」
第75回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜:平成28年10月)
4. 田邊雄、末原義之、高阪真路、向井原健太、赤池慶祐、石井翠、窪田大介、数野彩子、峯木礼子、金子和夫、ラダーニーマーク、齋藤剛
「ユースング肉腫のタンパク質発現解析: IRE1 /XBP1 パスウェイの腫瘍増殖能の検討」
第75回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜:平成28年10月)
5. 峯木礼子、峯木茂、
「市販の日用品・化粧品に含まれるナノ粒子による微生物への影響」
第90回日本生化学会大会(神戸ポートアイランド:平成29年12月)
6. 高宮新三郎、数野彩子、峯木礼子、三浦芳樹、美田敏宏
「回虫成虫筋ミトコンドリアのプロテオーム解析:自活性線虫との比較」
第90回日本生化学会大会(神戸ポートアイランド:平成29年12月)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/lab/oratory/lab/seitai_bunshi/

6. 研究組織

(1)研究代表者

峯木 礼子(MINEKI, Reiko)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号:40317475

(2)研究分担者

峯木 茂(MINEKI, Shigeru)
東京理科大学・理工学部・教授
研究者番号:40120216