

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340030

研究課題名(和文) 銀ナノ粒子のメダカ発生毒性および自然免疫機能阻害に関する糖鎖科学研究

研究課題名(英文) Glycoscience on medaka development toxicity and innate immune function inhibition by silver nanoparticles

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノマテリアルの生態毒性は国際的な懸案事項の一つである。特に抗菌作用を持つことから保健衛生用品として国際市場の約半数を占める銀ナノ粒子は、生態リスクが最も高い物質の一つとされている。本研究では、銀ナノ粒子の中で使用量が多いとされる銀ナノコロイド(SNC)のメダカに対する銀ナノ粒子の発生および自然免疫に対する影響研究を行った。マイクロアレイ解析および定量PCRの解析から、SNC曝露により免疫に関わる異物認識、生体防御粘膜などに異常が確認された。Edwardsiella tardaを用いた感染実験を行った結果、SNC曝露によってメダカ成魚の感染が増大することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ecotoxicity of nanomaterials is one of the international concerns. Silver nanoparticles, which account for about half of the international market as health and hygiene products, are considered to be one of the most ecological risk chemicals, since they have antibacterial activity in particular. In this study, we investigated the influence of silver nanocolloid (SNC), which is considered to be frequently used as silver nanoparticles, on embryo development and on innate immunity to medaka. From analyses of microarray and quantitative PCR, gene expressions related to immunity, biological defense mucosa etc. were disrupted by SNC exposure. Infection experiments with Edwardsiella tarda revealed that the infection of medaka adults increased due to SNC exposure.

研究分野：生態毒性学

キーワード：銀ナノ粒子 メダカ 糖鎖 免疫 生態リスク

## 1. 研究開始当初の背景

環境汚染による環境・ヒト健康へのリスクの多くは、環境生態系で最も重要なクロスメディアである「水」の汚染に起因している。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。その一方で、使用・廃棄されたナノマテリアル（タテ・ヨコ・高さの少なくとも一辺が1億分の1メートル・ナノサイズ・の化学物質）によって生じる環境ならびにヒト健康へのリスクが懸念されている。ナノマテリアル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、ナノマテリアル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。現在1兆ドル規模を持つナノ粒子関連の世界市場（Nel et al. 2006）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約60%を占めている。そのためOECDなどでは、銀ナノ粒子は、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、申請者らによる金ナノ粒子（65 nm×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、申請者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）などがあるが、毒性発現機構について詳細に記載した研究報告はこれまでなかった。そこで申請者は、胚発生および形態形成に係る重要な遺伝子発現が銀ナノ粒子によって攪乱されることを初めて明らかにした（H23-25 挑戦的萌芽研究, *Environmental Science & Technology* 46(11): 6278-6287, 2012）。銀ナノ粒子の毒性本体についてはナノ粒子なのか銀イオンであるのかが現在も議論されているが、申請者らの開発した銀ナノ粒子固相化プレートを用いた毒性研究から、銀イオン曝露が銀ナノ粒子と同様な形態形成不全を伴う強い受精卵毒性作用を誘導したことから、銀イオンによる毒性が主であること、環境水の塩濃度が銀錯体形成および生物利用性に影響を与えることなどを明らかにした（H23-25 挑戦的萌芽研究, 投稿中）。さらに形態形成異常から発生時におけるタンパク質の糖鎖修飾異常が確認され、さらに自然免疫（TNF およびNF- $\kappa$ Bの異常亢進）への顕著な影響を確認した。また銀ナノ粒子の生態系における次世代影響として、F1世代の孵化率低下によるメ

ダカ個体群への影響が強く示唆されている（H23-25 基盤研究（B）, 投稿中）。タンパク質の糖鎖修飾は、生命現象に必須なタンパク質の機能発現に重要であり、これらが阻害されると発生・感染・免疫・癌・脳中枢神経・筋および再生に対して重篤な影響を与えることがすでに知られている。しかし糖鎖科学が化学物質の生態リスク評価研究に適用された事例はほとんどない。本研究に示す様に、モデル魚類メダカの受精卵に対する銀ナノ粒子曝露による毒性影響研究を糖鎖生物学的に評価すれば、従来評価が困難であった発生から再生産までの包括的な化学物質生態リスク評価に重要な情報を提供でき、化学物質を用いた持続社会構築のための環境保全に対して高い国際貢献が期待できる。以上の理由から本申請に至った。

## 2. 研究の目的

糖鎖科学は、発生・感染・免疫・癌・脳中枢神経・筋および再生に関わる重要な研究分野であるが、従来の生態毒性学分野ではほとんど研究されていない分野である。申請者は、銀ナノ粒子を用いてメダカ受精卵に対する胚毒性研究を行い、毒性発現には解離する銀イオンによる寄与が大きいこと、銀イオンの解離および毒性発現は塩濃度に依存することを明らかにしている（投稿中）。さらに胚毒性の表現型として、脳中枢神経系の発達障害、脊椎の未発達、心臓血管形成の障害など、パターン形成不全が引き起こされることを確認している（*Environmental Science & Technology* 46(11): 6278-6287, 2012）。メダカ胚発達における原腸形成過程では、エピポリー、収縮運動および伸長運動という3つの重要な細胞運動が行われる。とくに伸長運動では、4GalT2により合成される糖鎖が後期原腸形成期で正常な収縮伸長運動およびパターン形成に必須であることが知られている。そこで申請者および宮西（分担者）は、パターン形成を支配している糖鎖合成経路の上流部分が、銀ナノ粒子曝露によって大きな損傷を受けている可能性、とくに脳神経系軸索の形態形成に係る遺伝子4GalT2、および脳形成に係る2つの遺伝子GlcAT-PおよびGlcAT-Sの発現の異常亢進を確認している。さらに銀ナノ粒子がHeLa細胞のToll様受容体（TLR）の発現に影響を与えるという報告（オハイオ州立大学Eugenia M. Ariza 教授からの私信）を基に、メダカ受精卵における自然免疫機能への影響を検討した結果、TNF およびNF- $\kappa$ Bを異常亢進させることを明らかにした。自然免疫はTLRシグナルから端を発して、TNF およびNF- $\kappa$ Bの二因子がそれぞれサイトカイン発現に重要な役割を果たしている。さらに自然免疫における異物認識には、糖鎖修飾がタンパク質機能発現機構として重要であり、すでに明らかになっている糖鎖合成経路関連遺伝子の発現異常の結果からも、銀ナノ粒子曝露が形態形成異

常とともに自然免疫機能に対しても影響を与えていることが強く示唆されている。そこで本研究では、化学物質感受性が高いメダカ初期生活段階であるメダカ受精卵および孵化仔魚を用いて、胚発生および自然免疫に係る糖鎖機能発現に対する影響について精査する。さらに自然免疫機能攪乱が、メダカの感染防御機能にどの程度の影響を与えるのか、生態学的に明らかにする。

### 3. 研究の方法

生物の化学物質感受性は、未成熟期が最も高く、影響も深刻である。メダカを用いた化学物質の生態影響研究は、水生生物のみならず環境生態系研究のために重要である。本研究では、メダカの受精卵から孵化仔魚までの初期生活段階における銀ナノ粒子の毒性および自然免疫に対する影響について、糖鎖合成カスケードに関連する遺伝子異常発現を精査するとともに、二次元糖鎖マッピング法に基づく糖鎖構造解析、機器分析による構造決定など糖鎖生物学解析を行う。その後、タンパク質糖鎖修飾に関連する異物認識・自然免疫機能への影響について、TNF および NF- $\kappa$ B の発現影響を含む TLR シグナルの攪乱、さらには感染防御機能の低下など生命機能への影響について詳細に検討する。魚類の自然免疫機能および感染防御機能が、銀ナノ粒子毒性の新規かつ重要な標的であることを明らかにするとともに銀ナノ粒子の新規生態リスクを明らかにする。

### 4. 研究成果

qRT-PCRの結果、SNCs曝露により b4gal t2, tpm1, および hoxb6 の3遺伝子は発現亢進され、alg2, gns, b4gal t2 および rbp5 の4遺伝子は発現抑制されることを確認した。b3gat1 について曝露開始4日目では発現が抑制、6日目および7日目では発現が亢進された。atp2a1 については1日目に発現が亢進、3日目には発現が抑制された。ctsl については遺伝子発現の変化は認められなかった。特に糖鎖関連遺伝子は受精後1日目において対照区、曝露区共に発現量の減少が見られた。この結果から、糖鎖関連遺伝子は胚発生の初期に必須の遺伝子であることが示唆された。続いて、RNA in situ hybridization の結果、糖鎖関連遺伝子の4遺伝子 (alg2, gns, b4gal t2 および b3gat1) は胚発生の初期において胚体全体で発現が検出されたが、胚発生の進行に伴い頭部における発現が増加した。この結果から、糖鎖関連遺伝子の発現が中枢神経系の発達に重要であることが予想される。また、7日目において対照区と曝露区の間には差が見られており qRT-PCR の結果と一致していた。この結果から、銀ナノコロイド曝露が中枢神経系に影響を与えていることが示唆された。また、形態形成関連遺伝子については胚発達段階によって発現する部位が変化していくことが明らかとなった。胚発達

段階によって発現部位が異なることから、形態形成関連遺伝子の発現パターンは時間的および空間的に厳密に制御されていることが明らかになった。さらに、遺伝子の過剰発現の結果、alg2, b4gal t2 および hoxb6 のいずれにおいても形態異常を誘導した。誘導された症状は体サイズ縮小、眼球形成不全、血栓、虚血および管状心臓であった。alg2 および b4gal t2 は注入する RNA の濃度を 200 ng/ $\mu$ L に設定した際の死亡率は 6.7% および 3.3% であった。hoxb6 については死亡率が RNA 濃度依存的に増加しており、RNA 濃度を 10 ng/ $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L および 200 ng/ $\mu$ L に設定した際に誘導された死亡率は 23.3%, 90.0% および 100.0% であった。この結果より、alg2 および b4gal t2 よりも hoxb6 の方が遺伝子の過剰発現が表現型に与える影響が大きいことが明らかになった。hoxb6 はヒトをはじめとする多くの生物において転写調節因子を産生することで他の遺伝子発現を調節している。そのため hoxb6 の異常発現は、正常な胚発生に必要な遺伝子発現を阻害するため、形態形成異常および死亡を誘導すると考えられる。また、糖鎖関連遺伝子である alg2 および b4gal t2 は糖鎖合成の上流に位置する遺伝子である。このため、遺伝子の過剰発現を受けた際に下流の遺伝子が糖鎖合成を調節しているために形態形成に与える影響が小さいのではないかと考えられる。

銀ナノ粒子がメダカの免疫応答に与える影響を調べるために、メダカ胚発生段階 11期, 21期, 30期, 孵化仔魚および成魚(5ヶ月齢)のメダカに銀ナノ粒子を 0.05 mg/L となるように添加した embryo rearing medium (ERM) 中にて曝露した。卵については孵化するまで曝露を行い、曝露開始から 24 時間ごとの遺伝子発現量を定量した。孵化仔魚については7日間曝露を行い、曝露開始から 24 時間ごとの遺伝子発現量を定量した。成魚については 24 時間曝露を行い、曝露終了とともに解剖してエラ、肝臓、腸、腎臓および脾臓を摘出し、各臓器における遺伝子発現量の定量を行った。対象とした遺伝子は、免疫応答を担う主要な転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p105, NF- $\kappa$ B p100, およびサイトカイン tumor necrosis factor (TNF) とした。その結果、NF- $\kappa$ B p105 の発現は 21 期から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に亢進し、11 期, 30 期, 孵化仔魚および成魚から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に抑制された。NF- $\kappa$ B p100 の発現は 11 期および 21 期から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に亢進し、30 期, 孵化仔魚および成魚から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に抑制された。TNF の発現は 11 期および 21 期から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に亢進し、30 期, 孵化仔魚および成魚から銀ナノ粒子曝露を受けた場合に抑制された。

次に、上記3遺伝子の発現部位を確認するために、銀ナノ粒子曝露により最も遺伝子発

現の亢進が見られた条件である, 21 期から銀ナノ粒子曝露を受けた胚を RNA in situ ハイブリダイゼーションに供した。その結果, NF B p100 は内臓から検出され, NF B p105 は胚全体から検出された。TNF は血管と心臓から検出された。

銀ナノ粒子曝露により, メダカの免疫応答関連遺伝子の発現が攪乱されることが示された。そこで, 免疫機能に与える銀ナノ粒子の影響を明らかにするために, 病原体抵抗性を指標とした銀ナノ粒子曝露影響評価を行った。5 ヶ月齢の成魚を対象とし, メダカに感染する魚病細菌 *Edwardsiella tarda* をメダカの飼育水槽に添加することにより浸漬感染させた。実験条件は以下の4条件で行った。条件 銀ナノ粒子 0.05 mg/L 曝露のみ, 条件 *E. tarda* 浸漬感染処理のみ, 条件 銀ナノ粒子 0.05 mg/L 曝露後 *E. tarda* 浸漬感染処理, 条件 コントロール (清浄な飼育液で飼育)

その結果, メダカの生残率は, 条件 100%, 条件 80%, 条件 20%, 条件 100%であった。以上の結果から, 銀ナノ粒子はメダカの病原体抵抗性を低下させることが明らかとなった。

SNCs 曝露により *E. tarda* 感染時のメダカの死亡率が上昇したことから, SNCs 曝露がメダカ体内における *E. tarda* の挙動に影響を与えるのではないかと考えた。はじめに, *E. tarda* を可視化するために, GFP (Green Fluorescent Protein) コード配列を持つ pGFPuv vector をエレクトロポレーション法にて野生型 *E. tarda* に導入し, 395 nm の励起光の照射により 509 nm の蛍光を発する GFP 遺伝子組換え *E. tarda* を作出した。次に, メダカ孵化仔魚を 109 CFU/mL の GFP 組換え *E. tarda* に 48 時間浸漬感染させた後, 4%パラホルムアルデヒド固定, DAPI による核染色を経て, 共焦点顕微鏡および Lightsheet 顕微鏡を用いて観察を行い, 蛍光画像を取得した。

観察の結果, コントロール (GFP 組換え *E. tarda* 非感染区) のメダカと比較して, GFP 組換え *E. tarda* 感染メダカの腸管から最も強い強度の蛍光を検出した。また, 口, 鰓, 鰓, 心臓, 体節静脈, 尾動脈, 尾静脈からも GFP の蛍光を検出した。GFP の蛍光が血管から検出されたことから, *E. tarda* はメダカの血管に侵入し, 局所的ではなく体全身に感染することによって敗血症様の症状を呈することが考えられた。

## 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1件)

Chisato Kataoka, Haruka Tomiyama, Shosaku Kashiwada (2017): Three-dimensional Visualization of

GFP-labeled *Edwardsiella tarda* in Whole Medaka, *Journal of Fish Diseases* 40(4):479-484, DOI: 10.1111/jfd.12522

[学会発表](計2件)

Kaori Shimizu, Misato Fujita, Kensuke Fukao, Futaba Mogi, Yoshihiro Kagami, Nobumitsu Miyanishi, Shosaku Kashiwada (2016) *Toxico-Glycobiology: Silver Nanocolloids effects on Medaka Embryogenesis through Glycosylation Disruption*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia/Pacific 2016 Conference, National University of Singapore, Kent Ridge, Singapore (September 16-19, 2016).

Chisato Kataoka, Shotaro Izumi, Misato Fujita, Shosaku Kashiwada (2016) *Silver Nanocolloids Disrupt Medaka Immune System and Resistance against a Common Pathogen *Edwardsiella tarda**, 30th New European Society for Comparative Physiology and Biochemistry (30th ESCPB), CosmoCaixa, Barcelona, Spain, (September 4-7, 2016).

[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

宮西 伸光 (MIYANISHI, Nobumitsu)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号： 80372720

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )