

## 博士論文（要約）

### メダカを用いた銀ナノコロイド毒性発現に係る環境要因と免疫毒性に関する研究

主指導教員：柏田 祥策

副指導教員：梅原三貴久

副指導教員：宮西 伸光

副指導教員：岩橋 均

学籍番号：4910150001 片岡 知里

#### 【第1章 緒言】

環境問題は、人類の持続的発展を左右する国際的に解決すべき問題である。自然界に放出された人為由来の化学物質は地球の4大圏（地圏、大気圏、生物圏および水圏）を循環した末に、最終的には水圏に滞留する。そのため、水圏生態系および水生生物を汚染する化学物質の影響が問題視されてきた。産業革命以降の人類の歴史的発展すなわち科学文明の発達と共に、環境汚染化学物質の種類および量は変化し、これまでに、鉱山粉塵、重金属類、煤塵、有機塩素系化合物、排ガス、排水、農医薬品類等々による環境汚染が報告されている。そして新たに、既存の化学物質を原材料としながらも、外寸の少なくとも1辺が100 nm以下という超極小サイズに設計された化学物質—ナノオブジェクト—による水境汚染と生態影響が危惧されている。いわゆるナノ産業は、2000年米国において「National Nanotechnology Initiative（国家ナノテクノロジー・イニシアティブ）」の制定後、急速に成長・発展を遂げている産業分野であり、2005年には100程度であったナノ製品数は、2010年には1400を超える程にまで増加した。先進国においては、生産量が一定量を超える化学物質は、その上市前にOECD（経済開発協力機構）の化学物質試験法に準拠した毒性試験を受けることが定められている。ナノオブジェクトは、ミクロンサイズ以上の既存化学物質（バルク化学物質）とは異なる物理的・化学的・電気的な性質を持つことから、未知の毒性作用を持つ可能性が懸念されているが、その一方でナノオブジェクト素材の多くは、既に市場に流通している既存化学物質（カーボン、重金属等）であることから、新規に毒性試験を課すことの是非、さらにはその試験方法についての議論がある。

本学位論文研究で研究対象としている銀ナノ粒子は、高い抗菌性を持つことから衛生用品や農薬等として多用されているナノオブジェクトの一つである。2013年に生産されたナノオブジェクト関連製品の内、23.5%を銀ナノ粒子関連製品が占め、その生産量は年間500トンに達すると推定されている。また、銀ナノ粒子関連製品の使用により、環境に流入する銀ナノ粒子の存在が指摘されており、2008年における河川水および河川底質における予測濃度はそれぞれ40–320 ng/Lおよび2–14 mg/kgであるが、その濃度は今後増大すると考えられている。そのような背景から、ナノオブジェクトの中でも特に生産・使用量の多い銀ナノ粒子の生態毒性および生態リスクがOECD、ISO（国際標準化機構）等により国際的に協議されている。銀ナノ粒子の水環境中濃度が増大するとの将来予測から、水圏生態系に与える銀ナノ粒子の影響が危惧され、水生生物を用いた毒性試験・研究が数多く行われてきた。その結果、銀ナノ粒子が藻類、ミジンコ、ウニ、エビ、ウミウシ、サンゴ、ゼブラフィッシュ、メダカ等の水生生物に対して、致死毒性や催奇形性を誘導することが多数報告されている。ここで、OECDテストガイドラインに制定されている試験方法あるいは毒性評価手法は、主に試験生物の死をエンドポイントとして毒性の有無を評価している。これは「毒性が無い、あるいは非常に低い化学品のみが市場に流通できる」とした国際的な化学物質管理上の必要性を反映した結果である。しかし、生態系が、「死亡する個体と新たに誕生する個体」とにより維持されることに鑑みれば、人為由来化

学物質の生態毒性研究において評価すべきは、「生物に致死毒性を示す汚染化学物質の種類と濃度」ではなく、「多様な地球環境に棲息する様々な生物が、曝露後に如何にして生存し、次世代を産生して個体群、群集、さらには生態系の維持に寄与するか」を評価すべきである。

## 【第2章 塩濃度および pH に依存した銀ナノコロイドの毒性変化】

第2章では、水環境に流入した銀ナノ粒子の生態毒性研究として、1) 塩濃度が SNC の毒性発現に与える影響評価、2) 異なる pH が SNC の毒性発現に与える影響評価、に関して生態毒性学の試験生物として国際的に用いられているモデル小型魚類ニホンメダカ (*Oryzias latipes*, 以下メダカと表記) を用いた銀ナノコロイド (silver nanocolloid, 以下 SNC と表記) の毒性評価を行った。銀ナノ粒子の一つである SNC は、一般的な銀ナノ粒子に使用されるコーティング剤 (粒径 (形) 安定化剤) が不使用であるにも関わらず安定した粒径を持つ、という特徴を持つ。コーティング剤はナノ粒子表面を覆うことでその粒子の化学的安定性に寄与する一方で、その生態毒性発現にマスク効果を呈することが知られている。そこで本研究では、コーティング剤による毒性への影響を排除するために SNC を用いた。

1) 塩濃度が SNC の毒性発現に与える影響評価では、塩濃度の異なる改変 ERM (embryo-rearing medium, 1×, 5×, 10×, 15×, 20× および 30× ERM。1× ERM は淡水相当, 30× ERM は海水相当の塩濃度を含む。) を用いて、塩濃度が SNC の毒性に与える影響を検討した。その結果、メダカ受精卵に対する SNC (10 mg/l) の毒性は、濃度が一定であるにも関わらず試験液の塩濃度に依存して増大した。その影響は特にメダカ受精卵の生残率に顕著に現れ、淡水条件 (1× ERM) で SNC を曝露されたメダカ受精卵の死亡率は 0.0% であった。その一方で、海水条件 (30× ERM) で SNC を曝露された受精卵の死亡率は約 98% にまで達した。このように塩濃度に依存した SNC 毒性の原因を明らかにするために、塩濃度が SNC の物理的・化学的性質に与える影響を検討した。その結果、超純水中において分散していた SNC は、各改変 ERM に混合すると沈殿物 ( $[\text{AgCl}]^0$  と推定) が観察され、さらに錯体生成定数を用いた化学計算の結果、他の溶存態銀である塩化銀錯体 ( $[\text{AgCl}_2]^-$ ,  $[\text{AgCl}_3]^{2-}$  および  $[\text{AgCl}_4]^{3-}$  と推定) が生成すると考えられ、それらの濃度は、改変 ERM の濃度に依存して増大すると考えられた。さらに溶存態銀の化学種とその比率を算出した結果、生成される塩化銀錯体  $[\text{AgCl}]^0$ ,  $[\text{AgCl}_2]^-$ ,  $[\text{AgCl}_3]^{2-}$  および  $[\text{AgCl}_4]^{3-}$  の内、ERM 濃度の増大とともに高塩素化学種が優占となった。これらの結果から、ERM 濃度の低い条件では、難溶性の  $[\text{AgCl}]^0$  および塩化銀錯体  $[\text{AgCl}_2]^-$  が二大優占化学種として生成されるため溶存態銀濃度は低く、ERM 濃度の増大と共に難溶性の  $[\text{AgCl}]^0$  が占める割合は減少すると共に、可溶性の  $[\text{AgCl}_2]^-$ ,  $[\text{AgCl}_3]^{2-}$  さらには  $[\text{AgCl}_4]^{3-}$  が順次生成されるため、ERM 濃度の高い条件では溶存態銀濃度が増大すると考えられた。

2) 異なる pH が SNC の毒性発現に与える影響評価では、試験液 (溶媒として超純水または ERM を使用) の pH を 4.0, 7.0 および 9.0 に調整し、SNC の毒性を比較した。その結果、SNC の毒性影響は pH 7.0 および pH 9.0 よりも、酸性条件である pH 4.0 において強くなることを明らかにした。また、試験液溶媒に超純水を用いて SNC を曝露した場合、試験液に溶出した溶存態銀濃度は酸性条件において増大した。その一方で、試験液溶媒を超純水から ERM に変更すると、SNC の毒性影響が緩和された。金属毒性は、金属の化学形態に依存して変化することから、pH による銀毒性の変化および ERM による銀毒性の緩和は、試験溶液の pH および塩分に依存して、試験液中の溶存態銀の化学形態が変化することに起因すると考えられた。そこで、試験溶液の pH および塩の有無 (超純水または ERM) が銀の化学形態に与える影響を検証するために、各試験溶液における銀化学種を推定した。その結果、試験溶媒に超純水を用いた場合、溶存態銀の化学形態は pH に関わらず  $\text{Ag}^+$  が最優占 (それぞれ 99.9% 以上) であった。この pH 非依存的な傾向は、試験溶媒に ERM を用いた場合においても同様であり、全ての pH において  $[\text{AgCl}]^0$  および  $[\text{AgCl}_2]^-$  は二大優占化学種であった。

これらの結果から、超純水・酸性条件下では、SNC から溶出する  $\text{Ag}^+$  量が中性・塩基性条件下よりも増大するため、毒性作用が増大したと考えられた。しかし、試験溶媒に塩が存在する ERM 条件下では、 $\text{Ag}^+$  が塩（塩化物イオン）と反応して、難溶性である  $[\text{AgCl}]^0$  を含む塩化銀錯体を形成することから、溶存態銀の総濃度が低下した結果、毒性作用が緩和したと考えられた。また、毒性試験の結果、試験溶媒に超純水または ERM を用いた場合、総溶存態銀濃度が同程度であっても、超純水において毒性がより高かったことから、 $\text{Ag}^+$  の毒性は塩化銀錯体よりも高いことが示唆された。以上の塩濃度および pH を考慮した SNC の毒性研究の結果は、SNC の生態リスクが淡水域よりも海域においてより高いことを示すとともに、海洋酸性化等によって海水の pH が低下した場合には、SNC の生態リスクがさらに増大することを示唆するものであった。

### 【第3章 メダカの生存可能性に与える銀ナノコロイドの影響評価】

化学物質の生態毒性あるいは生態リスク研究の多くは致死毒性を中心とした研究であり、化学汚染環境に耐えて生存する生物あるいは生物個体群を対象とした研究事例は非常に少ない。化学物質の生態リスク評価においては、「死んだ個体」よりも「生き残った個体」の、生態系における個体群として役割が重要と考えられる。そこで、第3章では、生物の生存可能性に与える環境汚染化学物質の影響を明らかにするために、生体恒常性維持を担う免疫系に与える SNC の影響を評価した。まず、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 (*nfkb1*, *nfkb2*, および *TNFa*) に与える曝露影響を評価した。その結果、メダカの発生段階に依存した遺伝子発現の変動が見られた。すなわち、コントロールと比較して、発生段階 11 から SNC を曝露された卵は *nfkb1* の発現が抑制され、*TNFa* および *nfkb2* の発現が亢進された。発生段階 21 から SNC を曝露された卵においては、*nfkb1*, *TNFa*, および *nfkb2* の発現が亢進された。発生段階 30 から SNC を曝露された卵においては、有意な SNC 曝露影響は見られなかったものの、コントロールよりも遺伝子発現は抑制される傾向であった。発生段階 40 から SNC を曝露された仔魚においては、*nfkb1*, *TNFa*, および *nfkb2* の発現はコントロールよりも抑制された。SNC を曝露された成魚においては、曝露 24 時間後には SNC の曝露影響は見られなかったものの、清浄環境に移してさらに 24 時間経過した後に、鰓、肝臓、腎臓および脾臓において 3 つの遺伝子発現がコントロールよりも抑制された。次に、メダカの免疫機能に与える SNC の影響を評価するために、魚病細菌 *Edwardsiella tarda* に対する感染感受性試験を行った。感染感受性試験では以下の 4 条件を設けた（コントロール群、SNC 単独曝露群、*E. tarda* 単独感染群および SNC 曝露後 *E. tarda* 感染群）。その結果、感染感受性はメダカの成長段階に依存して変化することが明らかになった。すなわち、発生段階 11, 21, 30 および 40（孵化仔魚）を対象とした感染試験の結果、コントロール群および SNC 単独曝露群におけるメダカの生存率は、試験期間中を通じて 95 % - 100 % であり、両条件に有意な差は無かった。一方で、*E. tarda* 単独感染群および SNC 曝露後 *E. tarda* 感染群の生存率は共に 24 % - 40 % にまで低下し、両条件の生存率に有意な差は無かった。次に、成魚を対象とした感染試験の結果、コントロール群および SNC 単独曝露群におけるメダカの生存率は、試験期間中を通じて 100 % であり、両条件に有意な差は無かった。一方、*E. tarda* 単独感染群および SNC 曝露後 *E. tarda* 感染群の生存率はそれぞれ 80 % および 20 % であり、両条件間に有意な差が見られた。この結果から、成魚においては、SNC 曝露によりメダカの感染感受性が亢進することが示された。

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。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 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 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、メダカの腸内細菌に与える SNC の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、SNC 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。

#### 【第4章 メダカ個体群の存続可能性に与える銀ナノコロイドの影響評価】

化学汚染地域に生息する生物は、曝露下で再生産を行うことを強いられる。再生産は個体数の増加および個体群の維持を担う根幹であるため、再生産に対する汚染化学物質の影響は、個体群、群集、そして生態系にまで波及すると考えられる。そこで、第4章では、個体群の存続に与える SNC の影響を明らかにするために、以下の方法でメダカの再生産試験を行った。成魚（4ヶ月齢）のメダカを、11日おきに SNC 濃度を段階的に高め（0.05, 0.5 および 5.0 mg/L）ながら曝露飼育して、生命表データ（親魚の週齢、生残率、産卵数、受精卵数、孵化数および孵化仔魚の性比）を取得した。また試験終了後のメダカを用いて組織標本作製して、各臓器（肝臓、脾臓、腎臓、消化管、心臓および生殖巣）について組織学的観察を行った。その結果、SNC に曝露された雌よりも雄の各組織において多角形細胞からなる結節構造等が顕著に認められた。卵巣では変化は見られなかったが、精巣においては、病変（間細胞様細胞）が確認されたことから、SNC 曝露は雄の生殖に影響する可能性が示唆された。そこで、再生産試験期間中の産卵数、受精卵数および孵化数を確認した結果、SNC 曝露による減少傾向は確認できたが、統計上有意ではなかった。しかし、生命表データからメダカ個体群の内的自然増加率（いわゆる個体群増殖速度）を算出した結果、SNC 曝露は内的自然増加率を有意に減少させることが明らかとなった。さらにメダカ個体群の絶滅リスク評価を行った結果、SNC 曝露は環境収容力あたりの絶滅時間も同様に短縮させること、すなわちメダカの絶滅リスクを増大させることが明らかとなった。

#### 【第5章 総合考察】

SNC の毒性影響は、試験溶媒の塩濃度および pH 依存的事であることが明らかになった。また、その毒性影響は生物の成長段階にも依存しており、特に免疫毒性については、メダカの成長に伴って発達する免疫系、すなわちそれらを司る脾臓、肝臓、消化管等の器官機能の発達と共生腸内細菌の存在が関係することが明らかになった。さらに、再生産に与える SNC の影響については、個々の生命表データ（親魚の週齢、生残率、産卵数、受精卵数、孵化数および孵化仔魚の性比等）に統計上有意な差が見られずとも、個体群増殖速度の指標となる内的自然増加率や、環境収容力あたりの絶滅時間を求めることで、「SNC はメダカの絶滅リスクを増大させる」という曝露影響を検出可能となることが明らかになった。本研究成果は、増大する生産量と使用量から水環境汚染と生態毒性が危惧されている SNC の生態毒性が、環境要因に依存する致死毒性、個体成長が関係する免疫毒性と魚病菌感染リスク、さらには個体群絶滅リスクを増大させることを数値データと共に明らかにした。本研究は、化学物質の生態毒性研究において、曝露されて尚、生存する生物の健康状態・寿命、さらには個体数・個体群増殖を統合的に評価することの重要性を国際的にも初めて明確にした研究として学術的に価値ある研究である。