

氏名(本籍地)	片岡知里(埼玉県)		
学位の種類	博士(生命科学)		
報告・学位記番号	甲第437号(甲(生)第37号)		
学位記授与の日付	平成30年3月25日		
学位記授与の要件	本学学位規程第3条第1項該当		
学位論文題目	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		
論文審査委員	主査	教授	博士(農学) 柏田祥策
	副査	教授	博士(理学) 梅原三貴久
	副査	教授	博士(水産学) 宮西伸光
	副査	岐阜大学教授 農学博士 岩橋均	

【論文審査】

片岡知里氏は、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銀ナノコロイド(silver nanocolloid: SNC)の生態毒性と生態リスクについて、小型魚類モデルメダカを用いて、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数量的に評価した。

【第1章 序論】では、OECDあるいはISOなどで行われている国際的な化学物質安全性管理におけるテストガイドラインとして論じられていない盲点である試験液を調整する際に用いる溶媒「水」の問題について重要な指摘を行っている。テストガイドラインでは、使用する水として、「天然水、調整水あるいは飲料水を使用することを推奨」しているが、水質(塩分、pH、硬度等)は試験化学物質の溶解性をはじめとして化学的挙動を支配する重要な環境要因であり、毒性発現にも影響することが知られている。さらに、化学物質の生態リスク評価では、従来生物の生死のみを判定基準としており、特に致死のみを評価対象としてきたが、片岡氏は、「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。」と述べ、個体の致死評価ではなく、個体の生存可能性と個体群の存続可能性評価が、生態系リスク評価には重要であること主

張している。

【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】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 SNC の毒性評価を行っている。

1) 塩濃度が SNC の毒性発現に与える影響評価： 試験溶媒の塩濃度が SNC の物理的、化学的性質に与える影響評価するために、SNC 粒子から解離する溶存態銀の化学スペシエーションの推定を行った。その結果、塩濃度に依存して、SNC から解離・生成する溶存態銀濃度は増加し、淡水条件におけるスペシエーションは $[\text{AgCl}]^0$ および $[\text{AgCl}_2]^-$ がそれぞれ 39.3% および 55.8% を占めていた。スペシエーションは塩濃度の増大とともに変化し、海水条件においては $[\text{AgCl}]^0$ は減少して、 $[\text{AgCl}_2]^-$ 、 $[\text{AgCl}_3]^{2-}$ および $[\text{AgCl}_4]^{3-}$ がそれぞれ 11.3%、14.7% および 73.7% を占めるようになった。次に、SNC の毒性に与える塩濃度の影響を評価するために、メダカ受精卵を用いた毒性試験を行った。その結果、SNC は塩濃度に依存してメダカ受精卵に対して致死毒性を示し、淡水条件におけるメダカ受精卵の死亡率は 0% であったが、海水条件での死亡率は約 98% となった。

2) 異なる pH が SNC の毒性発現に与える影響評価： 酸性 (pH 4)、中性 (pH 7)、および塩基性 (pH 9) 条件で、試験溶媒の pH が SNC の物理的、化学的性質に与える影響評価するために、SNC 粒子から解離する溶存態銀の化学スペシエーションの推定を行った。その結果、淡水条件下にて SNC から解離・生成する溶存態銀のスペシエーションは、試験溶媒の pH に係わらず Ag^+ が 0.9%、 $[\text{AgCl}]^0$ が 33.0%、 $[\text{AgCl}_2]^-$ が 64.5%、 $[\text{AgCl}_3]^{2-}$ が 1.6% の割合であった。次に、SNC の毒性に与える pH の影響を評価するために、メダカ受精卵を用いた毒性試験を行った。その結果、SNC は酸性条件下においてメダカ受精卵に対して致死毒性約 40% を示したが、中性および塩基性条件におけるメダカ受精卵の死亡率は 0% であった。

片岡氏は、銀の異なる塩濃度あるいは pH 下における銀のスペシエーション (塩化銀錯体の生成) について数量的評価を初めて行うだけでなく、その毒性評価を行うことで毒性本体について理論データおよび実証データを提示することで、生態毒性研究において化学環境を考慮することの重要性を示した。さらに SNC の生態リスクが淡水域よりも海水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初めて論じた。

【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】では、環境要因によって異なる毒性を示す SNC が、平常環境 (淡水, pH 7.0) において生物の生存可能性に与える影響を明らかにするために、生物の生体恒常性維持を担う免疫系に与える影響を

評価した。実際の水環境には、無数の病原性細菌、ウイルス、カビ等の病原体が存在しており、野外生物は常にそれら病原体による感染リスクに直面している。一方で、病原体の宿主である生物は、免疫機能の働きにより病原体を排除することで生体防御を行う。しかしながら、化学汚染地域においては、この「宿主生物」対「病原体」の構図に、新たに「汚染化学物質」が追加されることになる。そこで、SNC もまた宿主生物の免疫系に負の影響を与えて生体防御機能を低下させ、その結果として、宿主生物の病原体感染リスクを増大させる可能性が考えられた。

片岡氏は、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 *TNF α*) に与える曝露影響を評価した。その結果、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*; *nfkb1*, *nuclear factor kappa B subunit 2*; *nfkb2* および *tumor necrosis factor-like*; *TNF α*) 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* に対する抵抗性を与える 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。成魚においてより顕著な免疫への影響が見られた原因として、“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が関係する一化学物質の免疫毒性は免疫系の発達に依存する一”と、片岡氏は考察している。

免疫機能の成長と発達に関して、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。そこで片岡氏は、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ことを明らかにした。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を明らかにした。SNC を曝露されたメダカの各臓器における 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。さらに片岡氏は、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、*E. tarda* はメダカの鰓、消化管、心臓、食道、血液に広く分布していたことを明らかにしている。片岡氏は、これらの結果から、SNC 曝露はメダカの腸管内微生物生態系を攪乱し、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察している。

【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】では、SNC曝露によって免疫系が攪乱されたメダカは病原菌抵抗性が低下することを明らかにしている。片岡氏は、個体群の存続可能性に与えるSNCの影響を明らかにするために、SNCに曝露されたメダカの再生産試験を行い、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）の取得を行った。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曝露によって、死亡する個体は全く確認されなかったが、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ること、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、片岡氏は、SNC曝露は雄の生殖に影響する可能性を指摘した。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を明らかにした。さらに片岡氏は、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を明らかにした。本再生産試験では、試験溶媒として1×ERM（淡水相当の塩濃度）を採用したが、これまでの本研究で明らかになったように、塩濃度に依存してSNC毒性作用が増大することを考慮すると、淡水域よりも海域に生息する生物において、SNC汚染を起因とするより高い絶滅リスクがもたらされると考察した。

本学位論文研究は、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の生態毒性と生態リスクについて、小型魚類モデルメダカを用いて、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数量的に評価した。特に、宿主生物と腸内共生細菌間の共生関係を対象とした研究は、メダカのみならず、殆ど全ての生物に共通してみられる関係である。他の生物と共生関係を築き、相互に利益を与えることで健全な健康状態を維持する生物にとって、共生関係の破綻は健康状態に負の影響をもたらし、健康の低下や寿命の短縮を引き起こす要因になると考えられる。本研究は、従来その重要性を示唆する研究はあったが、誰も着手しなかった化学物質の生態リスク評価に「共生細菌」と「宿主生物」の関係を考慮した「試験生物－共生細菌－化学物質」間の応答評価を行うとともに、その重要性を改めて再評価した。化学物質の生態リスク評価においては、「汚染された環境に棲息している生物の生存可能性と個体群の存続可能性」を評価することが重要である。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

値ある研究と認められる。

【審査結果】

メダカを用いた化学物質の生態毒性とリスクは古くから研究されているが、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数量的に評価した研究事例は殆ど無い。特に、共生関係に由来する免疫系発達と生態毒性に係る病原菌易感染性に関する研究については、過去には化学汚染が野生生物に対して免疫機能の攪乱を惹起したとする報告があり、研究の重要性が主張されてきたが、現在までそれを科学的に実証する研究は殆ど無かった。共生は宿主生物の免疫系に有益な作用を及ぼすことが知られるようになったが、魚類における共生細菌叢の報告事例もまた殆どなく、本研究において、メダカ腸内細菌叢、細菌叢の代謝物であり免疫に有益な作用を及ぼす短鎖脂肪酸の存在が明らかにされ、かつ SNC によるそれらの攪乱が免疫毒性を誘導したとする科学的知見は、単に生態毒性学のみならず比較生物学的にも重要な知見を与えることになった。さらに、再生産試験を通じて、SNC がメダカ個体群に対して、個体群増殖速度を低下せしめて、絶滅リスクを高めるという結果は、従来の致死毒性評価を基礎とする生態リスク評価手法では全く検出できない結果であり、化学物質汚染から生態系を健全に保全するための革新的な手法および結果であると評価できる。

片岡氏の本研究成果は、国際誌に5編の主論文（原著論文）として出版されている。また本論文で論じられている化学物質の免疫毒性については、総説を1編著している。また共著論文が別途3編出版されている。本成果は、国際学会では14回（ポスター発表10回、口頭発表4回）および国内学会では3回（全て口頭発表）の学会講演を行い、海外3回、国内2回、計5回の研究受賞歴を持つ。さらに学術振興会から2件を含む計4件の外部研究資金獲得歴をもつ。

【原著論文】

1. Comparative toxicities of silver nitrate, silver nanocolloids, and silver chloro-complexes to Japanese medaka embryos, and later effects on population growth rate, *Environmental Pollution*, vol. 233, pp 1155-1163. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.10.028 (2018).
2. Salinity-dependent toxicity of water- dispersible, single-walled carbon nanotubes to Japanese medaka embryos, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 37 (4), pp 408-416. DOI: 10.1002/jat.3373 (2017).
3. Three-dimensional visualization of GFP-labeled *Edwardsiella tarda* in whole medaka

- larvae, Journal of Fish Disease, vol. 40 (4), pp 479–484. DOI: 10.1111/jfd.12522 (2017).
4. Salinity-dependent toxicity assay of silver nanocolloids using medaka eggs, Journal of Visualized Experiments, (109), e53550, DOI: 10.3791/53550 (2016).
 5. Salinity increases the toxicity of silver nanocolloids to Japanese medaka embryos, Environmental Science: Nano, vol. 2, pp 94-103. DOI: 10.1039/c4en00175c (2015).

【総説】

1. 環境汚染に起因する水生生物に対する免疫影響と生態リスク, 環境毒性学会誌 vol. 20 (1), pp1-19 (2017) .

【受賞歴】

1. 第6回エヌエフ基金 研究開発奨励賞および優秀賞受賞 (2017年)
2. 第23回日本環境毒性学会研究発表会・若手奨励賞受賞 (2017年)
3. Student Best Presentation Award from 19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Japan (2017).
4. Travel Support Award from 18th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Norway (2015).
5. First Place Award, the MS/BS Poster Presentation Category from 7th Aquatic Animal Models of Human Disease Conference, USA (2014).

以上、片岡知里氏の研究内容は、東洋大学生命科学研究科生命科学専攻の博士学位審査基準に照らしても妥当であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を以って片岡知里氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。