

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06236

研究課題名(和文) 組織透明化法を用いた生物体内マイクロプラスチック可視化技術の開発

研究課題名(英文) Development of a visualization method for microplastics inside an organism by tissue clearing

研究代表者

紺野 在 (Konno, Alu)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20573059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では様々な水生生物についてそれぞれに適した組織透明化法を開発し、その手法を用いて生物を解剖することなく体内のマイクロプラスチックを可視化できることを示した。さらに、無色あるいは透明のプラスチックを可視化するための染色法についても検討し、透明化とプラスチック染色の併用が可能であることを示すことで透明化法の有用性をさらに向上した。本研究で開発を行った技術は、マイクロプラスチックが生物体を与える影響を研究するための新たなツールになることが期待できるだけでなく、多様な非モデル生物に適用可能な透明化法を複数開発した点で基礎研究における組織化学、組織学、解剖学の発展にも寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロプラスチックによる水環境の汚染が問題になりつつある。しかし、生物が微小なプラスチック片を摂取することによる影響については不明な点が多い。本研究ではマイクロプラスチックの摂取状況および生体を与える影響を調査するための新手法として、水生生物の形状を保ったまま透明にし、体内のプラスチックを可視化する手法の開発を試みた。その結果、ウニや魚類といった様々な生物種に対する組織透明化法を開発し、自然環境中でそれらが摂取したプラスチックを検出することに成功した。本研究の成果は現在の環境問題に取り組むための新技術となるとともに、生物組織を扱う様々な基礎科学においても有用であると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed tissue clearing protocols for various aqueous organisms. With those protocols, we successfully visualized ingested microplastics without dissection. We also showed some lipophilic dyes for plastic staining are compatible with tissue clearing. The combinatorial use of tissue clearing and plastic staining methods would improve the detectability of colorless plastic fragments inside an organism. We expect that the methodology developed in the present study is a useful tool to study the effects of microplastic ingestion. Furthermore, those new histochemical techniques, which are applicable to a wide range of organisms, would benefit various fields of basic biological researches.

研究分野：組織化学

キーワード：マイクロプラスチック 組織透明化 環境問題 水生動物

## 1. 研究開始当初の背景

海洋環境中には多量のプラスチックデブリが蓄積しており、そのうちサイズが 5 mm 未満のプラスチック小片を一般にマイクロプラスチックと呼ぶ。様々な海洋生物がマイクロプラスチックを摂取することが知られているが、生物体内でのマイクロプラスチックの挙動、および摂取の影響については不明な点が多い。現在、海産動物の摂取したマイクロプラスチックの検出には主に解剖および全生物組織溶解後の残存プラスチック検出が行われている。しかし、前者は労働集約的かつ小型の生物への適用が困難、摂取量を過小評価するなどの問題が考えられ、後者は局在情報が失われるという欠点がある。

## 2. 研究の目的

マイクロプラスチック汚染が生物に与える影響を調査するための新技術として、組織透明化法の応用を試みる。近年主に哺乳類で開発が進んでいる組織透明化法は比較的温和な条件下で組織、器官、あるいは個体全体の物理化学的性質を改変することで透明化し、それと関心物質の特異的染色色を併用することで、目的の生物構造や生体物質を三次元的な組織の文脈の中で可視化する技術である。これらの技術の有効性は主に哺乳類の軟組織で示されており、より脆弱な軟組織や殻などの鉱物化した構造を持つ多様な水生生物に適した手法は検討が進んでいない。そこで本研究は棘皮動物、軟体動物、魚類といった様々な水生生物に対して有効な透明化法の開発を試みた。また透明化した生物種体内のプラスチックを特異的に染色するための手法についても検討した。

## 3. 研究の方法

本課題では生体内のマイクロプラスチックの局在を可視化するための新手法として、様々な水生生物種に適した組織透明化法および、透明化した生物組織中のプラスチック片を可視化するための染色法の開発を行った。

哺乳類組織の透明化では直面しない組織化学上の問題を理解、解決することが重要であると考えられるため、哺乳類の持たない鉱物化した殻を持つ生物種として棘皮動物のムラサキウニ、および軟体動物のアサリを用いた。また哺乳類より脆弱な軟組織を有する生物種として複数種の魚類を用いた。組織透明化法は哺乳類の軟組織を比較的短時間で高度に透明化することが報告されている界面活性剤ベースの透明化法 CUBIC 法をもとに各生物種に適した改変を加えた。

ムラサキウニは筑波大学下田臨海実験センターの屋外水槽に自然に着底した 2 cm 未満の個体を採集して 10%ホルマリン海水で固定し、使用まで冷蔵した。透明化法の開発用の個体は固定前に消化管内容物を空にするためガラス容器中で 2 週間絶食させた。透明化に際しては CLARITY 法の応用として組織をアクリルアミドゲルに包埋し、EDTA 溶液中での脱灰後に CUBIC 法による透明化を行った。透明化後の組織構造の保存性はヨウ化プロピジウムを用いた核染色を用いて確認した。プラスチックの蛍光染色にはナイルレッド染色を検討した。

魚類は 10%ホルマリンで 1 週間以上の浸漬固定を行ったのち、CUBIC 法の変法による透明化を行った。脱脂の前後で 10%  $H_2O_2$  in PBS による漂白を 2 回行ったほか、脱脂には CUBIC 法の Reagent 1 (25% Urea, 25% Quadrol, 15% Triton X-100 in  $H_2O$ ) を用い、一方透明化には長期保存と高屈折率を両立させた屈折率整合溶液 (Glycerol:Demethyl sulfoxide = 3:1) を用いた。

また、実験室下でマイクロプラスチックの取り込み実験を行い透明化および染色の検討を行った。マイクロプラスチックの取り込みモデルとして、デバスズメダイおよびアサリを用い、水槽でナイロン、アクリル、ポリエチレンテレフタレート (PET) の各マイクロプラスチックを 1 g/10 L による 2 日間の飼育を行い、モデル動物を作製した。各標本は固定した後、分散染料によるプラスチック染色とその後の CUBIC 法による組織透明化を行った。作製した標本は、肉眼解剖下および実体顕微鏡下で観察した。

## 4. 研究成果

### ムラサキウニの透明化とプラスチックの可視化

棘皮動物であるウニは石灰化した殻で形状を維持しており、殻の内部はほとんど空洞という特殊な体制を有する。予備検討において、その全身を透明化するためには脱灰の必要があるが、脱灰すると形状が維持できないという問題が生じることが分かった。そこで、CUBIC 法に加え、哺乳類用の別の透明化法である CLARITY 法を応用した。CLARITY 法は透明なゲル分子と生物組織を架橋することで、組織成分の流出を防ぐとともに脆弱な組織を機械的にサポートする手法である。CLARITY 法の応用でウニをゲル中に包埋し、脱灰および透明化を行ったところ、形状を維持したまま棘も含めた個体全体を透明化することに成功した (図 1)。海水を循環させている屋

外水槽のプラスチック基質上に非実験的に着底・成長した個体では、透明化により消化管内の大量のマイクロプラスチックが可視化された。これにより、透明化を用いた生物体内のマイクロプラスチック検出が可能であることが示された。またこの結果から自然条件下のウニがプラスチックを摂取すること、および大型のプラスチックを破砕してマイクロプラスチック化を促進する例が明らかになった。

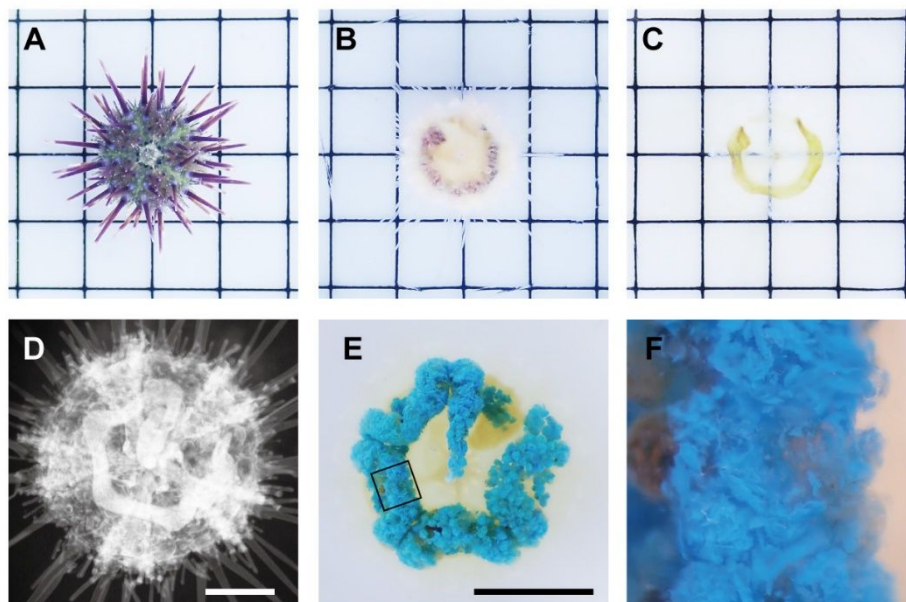


図1. ムラサキウニの透明化および体内のプラスチック可視化。A. 透明化前。B. ゲル包埋と脱灰後。C. 透明化後。D. 透明化したムラサキウニの細胞核染色。透明化後も内部組織が保たれている。E, F. プラスチック基質上から採集したムラサキウニの透明化。消化管内に大量のマイクロプラスチックが見られる。FはEの囲みを拡大したもの。グリッド = 5 mm (A-C), スケールバー = 2 mm (D), 5 mm (E)。

続いて、無色あるいは透明のプラスチック片の検出を容易化するため、透明化法と併用可能なプラスチックの蛍光染色法について検討した。その結果、環境中のプラスチックの染色に利用可能であることが報告されているナイルレッド染色が、透明化した生物試料中の少なくとも一部のプラスチック片を染色可能であることが明らかになった(図2)。

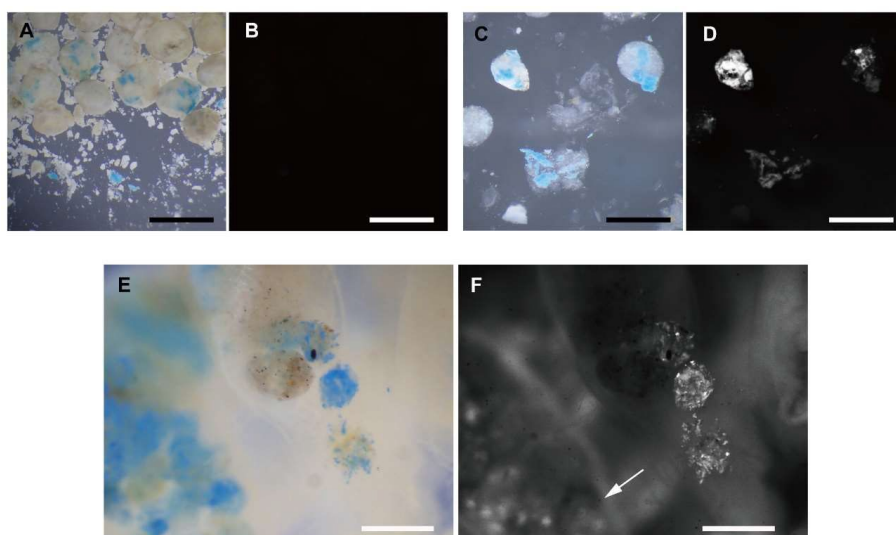


図2. 透明化適合性の蛍光プラスチック染色法の開発。A, B. 未染色のムラサキウニ消化管内容物(A)およびその蛍光像(B)。内在性の蛍光物質は存在しない。C, D. 透明化後の消化管内容物(C)およびそのナイルレッド染色蛍光像。青いプラスチック片は染色が弱い、表面のコートニングと思われる白色部分が強く染色される。E, F. 透明化後にナイルレッド染色を行ったムラサキウニの直腸付近の明視野像(E)および蛍光像(F)。消化管内のプラスチックが染色される。スケールバー = 1 mm。

### 魚類の透明化とプラスチックの可視化

魚類においては透明化の検討により、形態保持と透明度を両立した透明化に成功した(図3)。

特に外洋性肉食魚であるシイラにおいては、未解剖試料で骨格や消化管などの構造を観察することができた（図 3C）ほか、胃と思われる部位において黒色の漁網と思われるプラスチック片を観察することができた（図 3D）。これは魚類において組織透明化法による体内のプラスチック可視化を行った最初の報告であり、本法は魚類のマイクロプラスチック片を原位置のままに観察に適用可能であることがわかった。

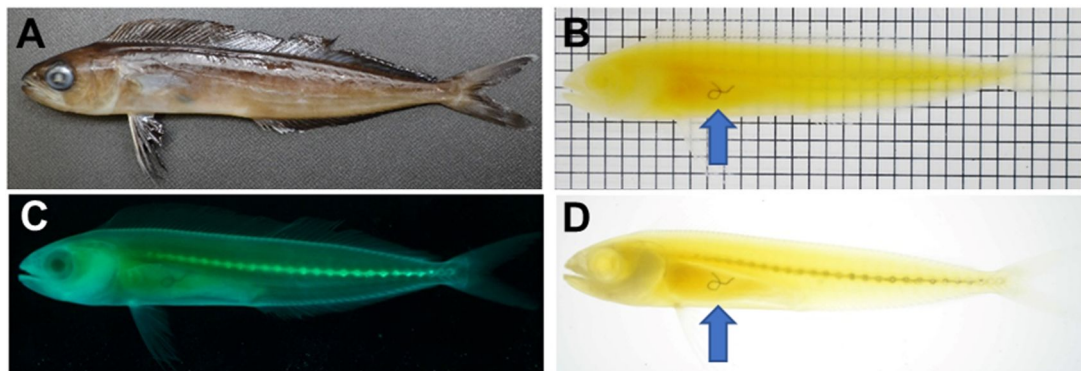


図 3 . 本法によるシイラ体内に存在する漁網の可視化。透明化前 (A)、透明化後の明視野落射撮影 (B)、透明化後の暗視野落射撮影 (C)、透明化後の明視野透過撮影 (D)、矢印は体内で観察された漁網と思われるプラスチック片。

#### 透明標本におけるマイクロプラスチックの染色法の確立

マイクロプラスチック摂取実験を行ったデバスズメダイについて分散染料を用いたプラスチック染色および透明化を行った。透明標本を扱う前にプラスチックペレット及び固定標本の肉片を用いた染色性の確認を行い、分散染料が 6 種のプラスチック (PET、熱可塑性ポリウレタン、ポリスチレン、ナイロン、アクリル、ポリカーボネート) を特異的に染色する条件を決定した。次に 3 種類 (アクリル、ナイロン、PET) のモデルと対照群 (プラスチック無し) において比較観察した結果、3 種のプラスチック取り込みモデルにおいてのみ、体内に赤色に染色されたプラスチック片が観察された (図 4)。特に腹腔の胃付近において、3 種類の取り込みモデルのいずれにおいても直径約 0.1 mm のプラスチック片が複数観察された (図 4)。以上から、本染色は体内に取り込まれたマイクロプラスチックの可視化に利用可能であることが示唆された。

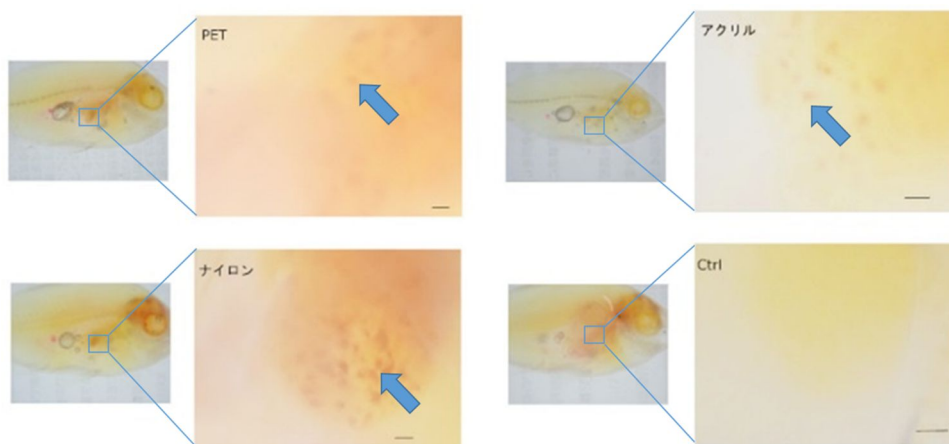


図 4 . マイクロプラスチックを取り込ませたデバスズメダイにおけるマイクロプラスチックの染色および可視化。矢印は染色されたマイクロプラスチックを示す。

アサリを用いたマイクロプラスチック摂取実験では、ナイロンを摂取させた 1 個体において腸と思われる部位に、アクリルは貝柱付近においてそれぞれ観察された (図 5)。魚類と比べると染色されたプラスチックの個数ははるかに少なかった。この理由として染色性の違い、もしくは取り込み量の違いのいずれかが考えられる。軟体動物におけるマイクロプラスチック染色については引き続きの検討が必要になると考えられる。

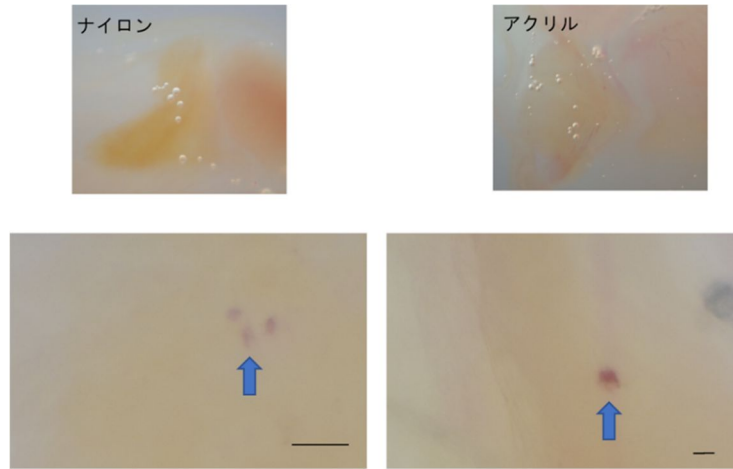


図5. マイクロプラスチックを取り込ませたアサリにおけるマイクロプラスチックの染色および可視化。矢印は染色されたマイクロプラスチックを示す。

### 全体の総括と今後について

本研究では透明化法が確立されていない様々な水生生物についてそれぞれに適した組織透明化法を開発し、それらの手法を用いることで、生物が摂取した体内のマイクロプラスチックを *in situ* で可視化できることを示した。本研究で開発を行った技術は、過去に研究代表者が報告した甲殻類の透明化法 (Konno and Okazaki, *Zoological Lett.* 2018, 4:13) と合わせ、広範な非モデル水生生物へ適用可能な方法論であることが期待される。また本研究は、生体試料中のマイクロプラスチックを、蛍光色素および分散染料を用いて染色することが可能であることも示した。今後は、マイクロプラスチックの生体への影響を調査する実験室研究、および野外で採集した自然生物のマイクロプラスチック摂取状況調査を行う野外研究への応用について検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Konno Alu, Okazaki Shigetoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Tissue Clearing for the Visualization of Microplastics Ingested by Sea Urchins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SSRN Electronic Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2139/ssrn.3724674	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武井史郎, 六車香織, 三上英希, 加門隼希, 水野雅玖, Jose Paitio, 矢野大地, 大場裕一, 遠藤広光, 高野雅貴, 奥村順哉, 中村亨, 前川陽一, 長谷川浩一, 森山昭彦, 紺野在.
2. 発表標題 魚類学研究に適した温和な組織透明化法の確立とマイクロプラスチック研究への応用展開の可能性
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紺野在
2. 発表標題 様々な生物組織への透明化技術の応用
3. 学会等名 医学生物学電子顕微鏡技術学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 武井史郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中部大学	5. 総ページ数 88
3. 書名 「マイクロプラスチック研究における生物学」, プラスチック社会を考える 産官学民によるSDGs都市づくりに向けて (中部大学ブックシリーズアクタ 33), 古澤礼太・宗宮弘明 編, pp56-60	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	武井 史郎  (Takei Shiro)  (60398576)	中部大学・応用生物学部・講師    (33910)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------