

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04344

研究課題名(和文) マイクロプラスチックに起因する細胞影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Examination of cellular effects caused by microplastics and their mechanisms

研究代表者

堀江 祐範 (Horie, Masanori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：30514591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロプラスチックの潜在的な生体影響を評価するため、修飾や吸着物質がないマイクロプラスチックの細胞に対する影響を評価した。ポリウレタン、ポリエチレン及びポリ乳酸粒子を、ヒト腸管上皮Caco-2細胞とマクロファージ様THP-1細胞に対する影響を検討した。100 µg/mlのポリウレタンおよびポリエチレン粒子を投与したとき、細胞生存率が10%程度減少した。また、ポリウレタン粒子を投与したマクロファージでは、顕著なケモカイン(IL-8)の誘導が認められた。投与した粒子は細胞に取り込まれていた。マイクロプラスチックによる細胞影響は、粒子の種類のほか、個数濃度も影響することが示唆された。

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の細胞影響は、粒子の化学的な種類により引き起こされる応答が異なった。マイクロプラスチックの細胞毒性は小さかったものの、顕著なサイトカインの誘導を引き起こした。また、重量濃度に加え、個数濃度が重要であることが示唆された。従来、マイクロプラスチックの生体影響では、環境中の有害物質の吸着が重要であることが提唱されていたが、マイクロプラスチックそのものにも潜在的な生体影響があることが示された。また、細胞応答は科学的な種類によって大きく異なり、化学種ごとに影響を検討する必要がある。これらの結果は、マイクロプラスチックの毒性を考える上で学術的及び社会的意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the potential biological effects of microplastics, the cellular effects caused by microplastics without modifications or adsorbents were examined. The effect of polyurethane, polyethylene and polylactic acid particles on human intestinal epithelial Caco-2 cells and macrophage-like THP-1 cells were examined. When 100 µg/ml of polyurethane and polyethylene particles were administered to cells, cell viability slightly decreased. In macrophages to which polyurethane particles were administered, significant induction of chemokine (IL-8) was observed. The administered particles were taken up by the cells. It was suggested that the effect of microplastics on cells is affected not only by the type of particles but also by their number concentration.

研究分野：毒性学、微生物学

キーワード：マイクロプラスチック 培養細胞 細胞毒性 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロプラスチックは粒径 $1\mu\text{m}\sim 5\text{mm}$ のプラスチック粒子とされる。環境中に排出され、海洋に流出したプラスチックから、摩擦や劣化によってマイクロプラスチックが生じ、環境中の様々な物質を吸着することによって、生体に悪影響を及ぼすとされていたが、マイクロプラスチック自身によって引き起こされる潜在的な生体影響は不明であった。また、マイクロプラスチックには $1\sim 100\text{nm}$ のナノスケールの粒子径を持つ「ナノプラスチック」と呼ばれる粒子が含まれる可能性がある。ナノスケールの粒子は、主に金属酸化物やカーボン粒子による細胞影響についての研究が多くあり、微粒子よりも大きな影響を引き起こす。従って、マイクロプラスチック、特にナノプラスチックと呼ばれる粒子径範囲にある粒子では、より大きな細胞影響を引き起こされる可能性が否定できないが、研究開始当初はマイクロプラスチックによる生体への影響について、信頼性の高いエビデンスが知られていなかった。このため、吸着物質による影響を検討する前提として、マイクロプラスチックそのものによる生体影響を理解する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロプラスチックそのものが生体にどのような反応を引き起こすかを、粒子の物理状態を把握しつつ、最も基本的な細胞レベルのキーイベントを明らかにすることを目的とする。このために、1. マイクロプラスチックによって引き起こされる生体応答の細胞レベルでの評価、2. マイクロプラスチックの物理状態と細胞影響の関連性の評価、3. マイクロプラスチックの細胞取り込みの評価を行い、マイクロプラスチックの潜在的な影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料

マイクロプラスチックサンプルとして、ポリエチレン、ポリウレタン及び生分解性プラスチックであるポリ乳酸粒子を用いた。本研究に使用した各サンプル粒子を表1に示す。粉体で入手した試料については、大きな凝集を防ぐための分散剤としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。10mg/ml の BSA 溶液に 10mg/ml の濃度となるように分散した後、さらに細胞用の培地で 10 倍ずつ、段階希釈した。水分散液として入手した粒子については、そのまま細胞用培地で 10 倍ずつ、段階希釈した。これらの培地分散液を細胞に投与するとともに、分散液の凝集状態、分散安定性、個数濃度を評価し、細胞がどのような物理状態の分散液に曝露されているのかを把握した。

表 1. 本研究で使用したマイクロプラスチック粒子

	材質	粒子径 (μm) *	本研究での	1mg/ml 培地分散液
			略号	中個数濃度 (particles/ml)
ポリエチレン	低密度ポリエチレン	9.3	PE-1	1.73×10^6
	高密度ポリエチレン	9.9	PE-2	8.87×10^5
ポリウレタン	架橋ウレタンビーズ	3.8	PU-1	4.98×10^6
		10.1	PU-2	4.52×10^5
ポリ乳酸	ポリ乳酸粒子	0.5	PL-1	3.16×10^9
		2	PL-2	5.53×10^6

*メーカーより入手したデータシートによる中位粒子径

(2) 培養細胞

2 種類の細胞、ヒト大腸がん由来上皮様 Caco-2 細胞、マクロファージに分化させたヒト単球由来 THP-1 細胞に対する影響を検討した。Caco-2 細胞は、20%ウシ胎児血清 (FBS) および抗生物質を添加した Minimum Essential Media (MEM) 中で、THP-1 細胞は 10%FBS および抗生物質を添加した RPMI1640 培地中で 5%CO₂ 雰囲気下、37 °C で培養した。THP-1 細胞は、PMA 処理によってマクロファージ様に分化させたのち、実験に用いた。細胞毒性は WST-1 法及び LDH 法により評価した。96 ウェルプレートに播種し接着させた細胞にマイクロプラスチック培地分散液を投与し、24 時間、CO₂ インキュベーター内で保持した。その後分散液を除き、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ) 溶液を含む培地に交換した。さらに 1 時間 37 °C で保持したのち、マイクロプレートリーダにより 450nm の旧交を測定した。LDH 法は、24 ウェルプレートに細胞を播種し接着させた細胞にマイクロプラスチック培地分散液を投与し、24 時間

後に Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いてプロトコルに従い測定した。24 ウェルプレートに細胞を播種し接着させた細胞にマイクロプラスチック培地分散液を投与し、24 時間後に上清を回収した。回収した上清について、IL-8, IL-1 および TNF- Human Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて ELISA 法により、それぞれ IL-8、IL-1 および TNF- を測定した。35 mmディッシュに細胞を播種し接着させた細胞に、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でマイクロプラスチック培地分散液を投与し、24 時間後に培地を除き、グルタルアルデヒドで固定した。透過型電子顕微鏡による観察は、東海電子顕微鏡解析において行った。

4. 研究成果

(1) マイクロプラスチック粒子の細胞毒性

マイクロプラスチックを 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で Caco-2 細胞およびマクロファージに分化させた THP-1 細胞に投与し、24 時間後に WST-1 法によって細胞生存率を測定した (図 1)。この結果、いずれの細胞でもポリウレタン及びポリエチレン粒子を投与した細胞で、細胞生存率が有意に低下した。細胞生存率は、ポリウレタン粒子およびポリエチレン粒子の投与細胞で、コントロール細胞に比べ、90%程度で生存率に対する影響は小さかった。また、ポリ乳酸の投与細胞では、生存率の低下は認められなかった。

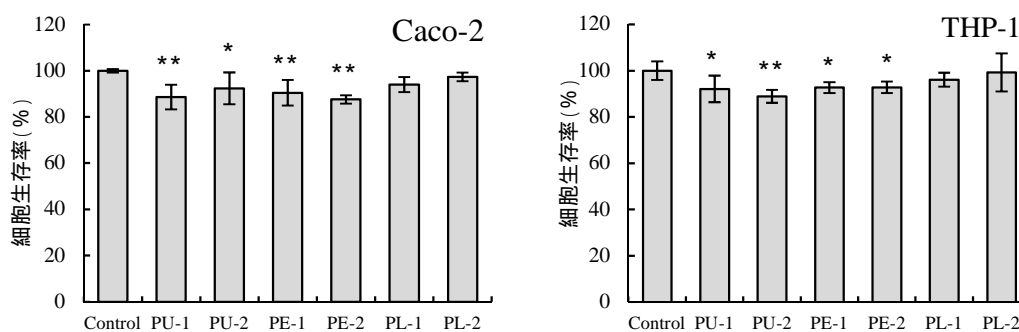


図 1. マイクロプラスチック粒子を投与した細胞の 24 時間後の生存率

Caco-2 およびマクロファージ分化 THP-1 細胞に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で各粒子を投与し、24 時間後に WST-1 法で細胞生存率を測定した。

多くの場合、粒子状物質の細胞影響評価は重量濃度で行われる。しかし、粒子径により単位重量当たりの粒子個数は異なる。本研究において、重量濃度が 1mg/ml のとき、粒子径 3.8 μm のポリウレタン粒子が約 5×10^5 個含まれていたのに対し、粒子径 10.1 μg の粒子では、 4.5×10^5 個であり、およそ 10 倍の差があった (表 1)。また、ポリ乳酸粒子では、同様に重量濃度が 1mg/ml のとき、粒子径 0.5 μm の粒子が約 3.2×10^9 個含まれていたのに対し、粒子径 2 μg の粒子では、 5.5×10^6 個で、1000 倍近い差があった。一方で、ポリエチレン粒子では、粒子径が 9.3 および 9.9 μm と近く、個数濃度も各 1.7×10^7 個および 8.9×10^6 個と差は 2 倍程度であった。重量濃度が同じとき、化学種に関わらず、10~2 μm の範囲では粒子径と個数濃度は比例した (図 2)。一方で、粒子径 0.5 μm の粒子では、単位重量当たりの粒子数が多かった。細胞生存率に対する影響は、化学種に依存し、個数濃度の影響はないと考えられた。

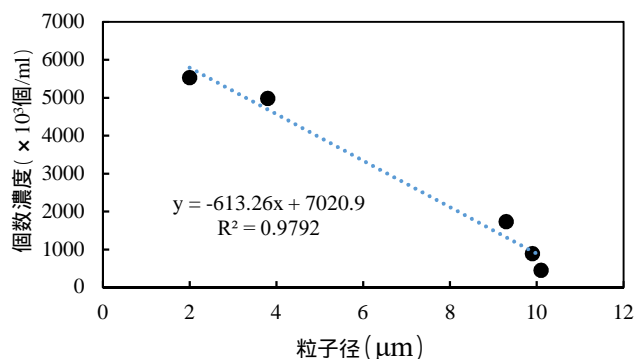


図 2. マイクロプラスチック粒子の粒子径と個数濃度との関係
重量濃度 1mg/ml の培地分散液中の算出された個数濃度

(2) マイクロプラスチックによるサイトカイン誘導

マイクロプラスチック粒子を投与した Caco-2 細胞およびマクロファージに分化させた THP-1 細胞について、好中球の遊走に關与するケモカインであるインターロイキン 8 (IL-8) の産生に対する影響を調べた (図 3)。Caco-2 細胞では、マイクロプラスチックの投与による IL-8 の顕著な誘導は認められなかった。一方で、THP-1 細胞ではポリウレタン粒子 PU-1 を投与したとき、著しい IL-8 の誘導が認められた。100 $\mu\text{g/ml}$ の PU-1 を投与したとき、24 時間後の培養上清中の IL-8 濃度は、粒子を投与していないコントロール細胞の 34 倍であった。そのほかの粒子では、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、IL-8 の誘導は認められなかった。また、PU-1 を投与した細胞では、IL-1 および TNF- α の誘導も認められた (図 4)。重量濃度で見た場合、1ml あたりの粒子の個数濃度は 10 ~ 1000 倍程度の差があると考えられたことから、個数濃度を揃えて、THP-1 細胞における IL-8 の誘導に対する影響を調べたところ、PU-1 と PU-2 でともに IL-8 の誘導がみられ、その差は小さかった (図 5)。これらの結果から、マイクロプラスチックは科学的な材質によりサイトカインを誘導する可能性があること、重量濃度に加え、個数濃度が重要であることが示唆された。

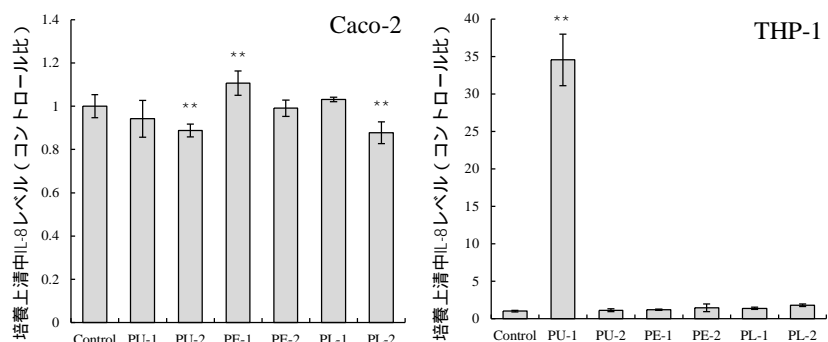


図 3 . マイクロプラスチック粒子を投与した Caco-2 および THP-1 細胞の IL-8 分泌レベル
濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ のマイクロプラスチック粒子を細胞に投与し、24 時間後の培養上清中の IL-8 濃度を ELISA で測定した。値は、マイクロプラスチックを含まないコントロール細胞の濃度を 1 とした時の相対値。

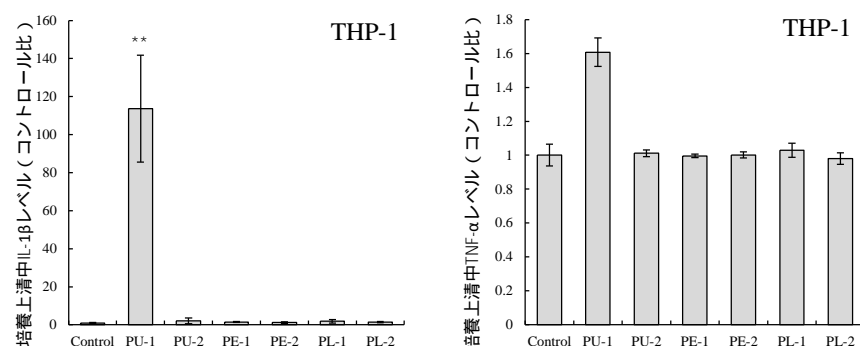


図 4 . マイクロプラスチック粒子を投与した THP-1 細胞の IL-1 および TNF- α 分泌レベル
濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ のマイクロプラスチック粒子を細胞に投与し、24 時間後の培養上清中の IL-1 および TNF- α 濃度を ELISA で測定した。値は、マイクロプラスチックを含まないコントロール細胞の濃度を 1 とした時の相対値。

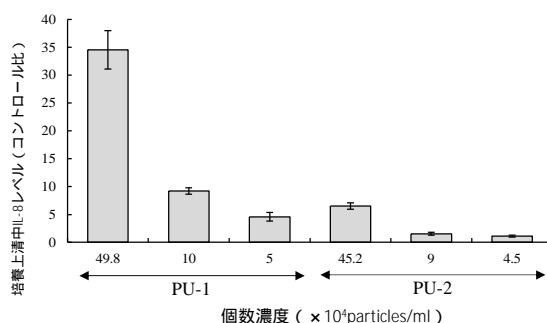


図 5 . 個数濃度を加味したマイクロプラスチック粒子を投与した THP-1 細胞の IL-8 分泌レベル
個数濃度をそろえたのマイクロプラスチック粒子を細胞に投与し、24 時間後の培養上清中の IL-8 濃度を ELISA で測定した。値は、マイクロプラスチックを含まないコントロール細胞の濃度を

1とした時の相対値。

(3) マイクロプラスチックの細胞内への取り込み

細胞影響が認められたポリエチレン粒子を Caco-2 細胞および THP-1 細胞に投与し、24 時間後に粒子の細胞内への取り込みを透過型電子顕微鏡により観察した(図6)。その結果、いずれの粒子でも THP-1 細胞内への粒子の取り込みが観察されたが、粒子径が $10.1\mu\text{m}$ である PU-1 に比べ、粒子径が小さい $3.8\mu\text{m}$ である PU-2 でより多くの粒子が取り込まれていた。また、Caco-2 細胞でも PU-1 で粒子の取り込みが認められたものの、THP-1 細胞に比べ、細胞内に取り込まれた粒子は少ない傾向があった。PU-2 を投与した Caco-2 細胞では、細胞内に取り込まれた粒子は、不明確であった。PU-1 は個数濃度が PU-2 の 2 倍程度で、上皮細胞である Caco-2 細胞に対し、マクロファージである THP-1 は貪食能が強いため、細胞により多くの粒子が取り込まれたと考えられた。

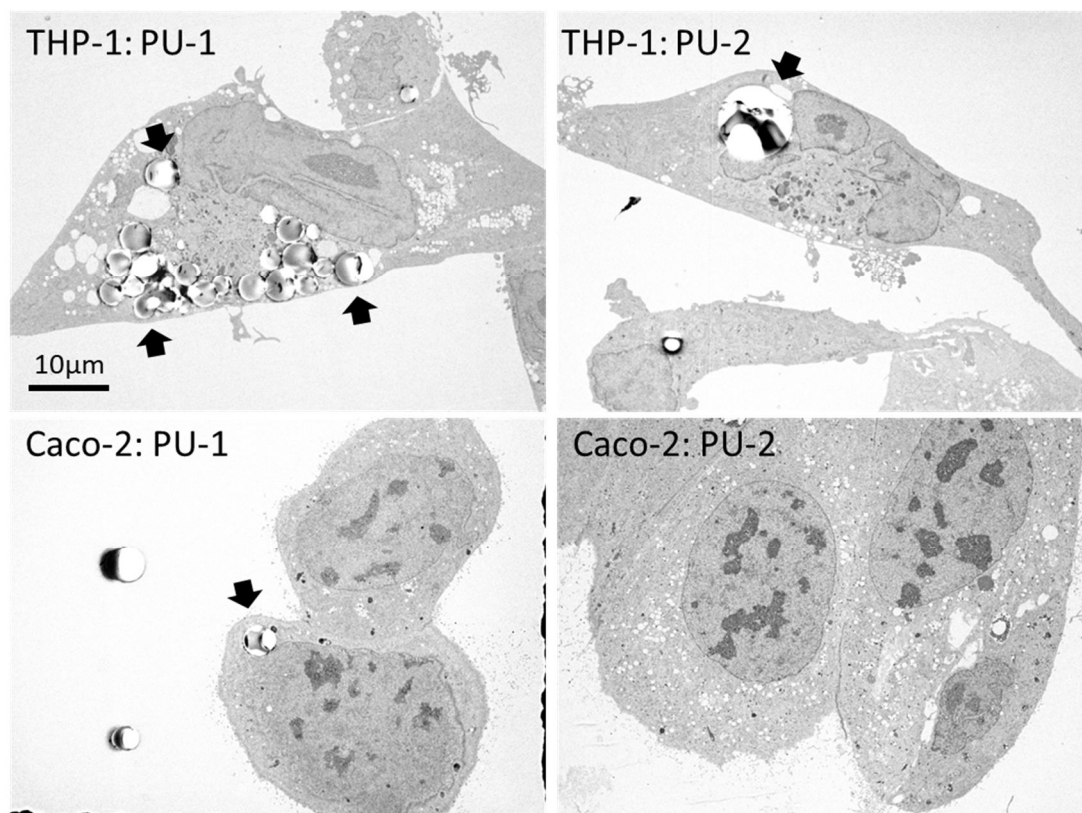


図6 . ポリエチレン粒子を投与した Caco-2 および THP-1 細胞の透過型電子顕微鏡による観察

以上の結果から、

- 1 . 本研究で用いたマイクロプラスチックの細胞毒性は小さかった。
- 2 . マイクロプラスチックの化学的な材質によって、ケモカインや炎症性サイトカインを誘導する可能性がある。
- 3 . 細胞影響評価には、重量濃度に加え、個数濃度も考慮する必要がある。
- 4 . マイクロプラスチックの細胞影響には、粒子の細胞内への取り込みが関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	加藤 晴久 (Kato Haruhisa) (10462839)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員 (82626)	
研究分担者	小川 道永 (Ogawa Michinaga) (80361624)	国立感染症研究所・細菌第一部・室長 (82603)	
研究分担者	田部井 陽介 (Tabei Yosuke) (40555083)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	

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