

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19336

研究課題名（和文）マイクロプラスチックのリスク評価基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of the Risk Assessment Framework for Microplastics

研究代表者

堤 康央（Tsutsumi, Yasuo）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：50263306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：環境中の1 mmよりも小さなプラスチック微粒子であるマイクロプラスチック（MP）のヒト健康影響が懸念されている。一方で、環境中のMPは、素材のみならず、サイズ、形状、表面性状が多様な状態で存在しているものの、研究室レベルの検討ではそれらが反映されていない。そこで本研究では、実環境中の物性を示す多種多様なMP標準品を作製し、動態・存在様式解析手法の確立を試みた。その結果、複数素材を対象として、様々なサイズ、表面性状を有するMP標準品の作製、将来的な動態解析に資するMP標準品の蛍光標識に成功した。さらに、MP標準品を用いた検討により、表面劣化によってMPの細胞毒性が増加することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実環境中のMPは、多種多様な状態で存在しているにも関わらず、研究室レベルでは、偏った製品を用いたものが殆どであり、実環境を反映していない。その点、本研究にて作製したMP標準品は、表面性状などの観点から実環境中に存在するMPを反映しており、今後のMPのヒト健康影響評価に大きく貢献し得る。また、本研究にて作製した蛍光標識MP標準品は、将来的に環境中MPの体内動態解析に資するものである。このように、本研究にて確立した実環境中におけるMPの存在様式を反映した標準品の作製基盤は、将来的なMPの安全性情報集積に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Microplastics (MP), plastic particles smaller than 1 mm in the environment, are concerning for their potential impact on human health. However, in the environment, MPs exist in diverse states, including variations in material, size, shape, and surface properties, which are often not reflected in laboratory studies. This study aimed to obtain standardized MP samples exhibiting diverse properties. As a result, we successfully produced standardized MP samples with various sizes and surface properties using several types of materials and established labeling methods for MP standards to contribute to future dynamic analyses. Furthermore, we identified increased cellular toxicity due to surface degradation using standardized MP.

研究分野：衛生薬学

キーワード：マイクロプラスチック 安全性研究

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国連総会にて採択された「持続可能な開発目標 (SDGs)」にて警鐘が鳴らされているように、溢れ出したプラスチック製品による海洋環境や生態/生体系への負の影響が世界的に危惧されている。中でも近年、海洋環境の汚染で問題となっているのが、1 mm よりも小さいサイズのプラスチック微粒子であるマイクロプラスチック (microplastics: MP) である。MP は海洋環境中のみならず、飲料水 (Koelmans et al., 2019) や、ヒト肺、血液、胎盤から検出されるなど、ヒトはその曝露を避け得ない (D Barceló, et al., 2023)。このような背景から MP のヒト健康影響が懸念されている一方、プラスチックの有用性を考慮すると、一律の規制は社会に混乱をもたらしてしまう。そのため今こそ、MP のハザード (固有の生物活性・毒性) と動態 (生成過程とその後の体内・細胞内挙動や曝露量、曝露時間) を明らかとし、未解明であるヒト健康リスク (ハザードと動態の積算) を慎重に見極める必要がある。その点、環境中の MP は、波や紫外線などの外的要因により劣化が進んでおり、サイズや形状なども加味すると、その存在様式は多種多様である。研究代表者らはこれまでに、微粒子のハザードや動態は、「微粒子の大きさや表面形状」といった存在様式 (物性) の違いにより運命付けられることを認めている。従って、「ブラックボックスである MP のヒト健康リスク」を解き明かすうえで、極めて重要なポイントは、MP の毒性やその時空間的な存在量を理解することに加え、MP の存在様式 (物性) をも併せて把握することにある。しかしながら、MP については、その動態解析手法および存在様式解析手法は世界的に未だ確立できておらず、その原因として、MP の存在様式が多岐にわたり、質的・量的観点から照らし合わせるための MP 標準品が存在しないこと (定量したり、形を推定するためのスタンダードが無いこと) が挙げられる。従って、環境中 MP の物性を反映した MP 標準品を整備することで、将来的な MP の安全性情報の集積が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、グローバルな MP 問題への挑戦として、多岐にわたる MP の標準品を作製し、動態解析手法および存在様式解析手法の確立を試みた。また、環境中の MP は曝される環境や時間に依存して、微少化や鋭利化などの形状変化に加え、酸素原子の添加や構造の開裂などの表面性状変化を示すため、種々条件における MP 標準品を作製し、データベースの構築を試みた。さらに、MP を定量的に解析するため、蛍光修飾を施すことで、動態情報データの集積を併せて図り、MP のリスク評価基盤をパイロット的に構築するものである。

3. 研究の方法

(1) MP 標準品の作製

ポリエチレン (PE) をモデルとした検討では、中位粒径 231 μm の粉末サンプル (Sumitomo Seika, Osaka, Japan) を用い、ポリ塩化ビニル (PVC) をモデルとした検討では、中位粒径約 100 μm の粉末サンプル (Wako, Osaka, Japan) を用いた。PE、PVC サンプルの劣化実験には、FLAT EXCIMER EX-mini (Hamamatsu Photonics K.K.) を用い、波長 172 nm の真空紫外光を照射することで表面劣化を促進させた。また、1 μm 以下のプラスチック微粒子であるナノプラスチック (nanoplastics: NP) の作製にも着手し、既報 (K Tanaka, et al., Small, 2021) を参考に粒子を作製し、表面劣化処理を同様に施した。さらに、各 MP の蛍光標識には Nile Red を用いた。

(2) 減衰全反射赤外分光 (ATR-IR) 測定

減衰全反射赤外分光 (ATR-IR) 測定は、FT/IR-4700 (JASCO) を使用した。測定範囲は 4000 ~ 500 cm^{-1} 、分解能は 4 cm^{-1} 、スキャン回数は 32 回ですべてのスペクトルを測定した。

(3) 細胞培養

マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) とヒト単球細胞株 (THP-1) は、ATCC (Manassas, VA, USA) より購入した。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 (A549) とヒト結腸癌由来細胞株 (Caco-2) は RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入した。ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) は大阪大学乾先生より提供していただいた。RAW264.7、A549、HaCaT の維持培養には、10% ウシ胎児血清 (FCS, Biosera, Nuaille, France)、1% 抗生物質 (Wako) を含む DMEM (Wako) を用いた。THP-1 細胞の維持培養には、10% FCS、1% 抗生物質、0.1% 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific) を含む RPMI-1640 (Wako) を用い、Caco-2 細胞の維持培養には、10% FCS、1% 抗生物質を含む EMEM (Wako) を用いた。すべての細胞は 37 °C、飽和蒸気圧、5% CO_2 条件下で培養した。

(4) 細胞毒性評価

各種細胞株を用い、各種 MP・NP 標準品を所定の時間曝露させた後、3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を添加し、2.5 時間後に培養液を取り除き、DMSO を加えて 570 nm の吸光度を測定した。DMSO

のみを添加したウェルの吸光度をバックグラウンドとして差し引き、サンプルを添加していないウェルの吸光度を生産率 100%として各濃度の細胞生存率を算出した。

4. 研究成果

環境中 MP の紫外線による表面劣化に着目し、環境中の MP の劣化状態を反映したサンプルの作製方法の開発を試みた。PE 粉末の表面を劣化させるため、波長 172 nm の真空紫外光 (VUV) を使用して劣化促進実験を行った。波長 172 nm の VUV によりオゾンと活性酸素が生成し、サンプル表面の C-H 結合が切断されて、ケトン、カルボキシル基、エステルによるカルボニル基、ヒドロキシ基などが形成された。ATR-IR で IR スペクトルを測定し、劣化前後を比較した結果、カルボニル基とヒドロキシ基が導入されたことが確認され、化学的に劣化した PE サンプルの作製に成功した。なお、これらのサンプルについては、環境中 MP と表面性状が同等であることを確認している。

作製した劣化 PE の細胞毒性を複数の細胞株 (THP-1、RAW264.7、A549、HaCat、Caco-2) にて評価したところ、いずれの細胞株においても未劣化の PE においては細胞毒性が認められず、劣化処理を施した PE 曝露によって細胞毒性が認められた。中でも強い細胞毒性が認められた THP-1 と RAW264.7 を用いて、異なる素材、異なるサイズの MP・NP 標準品を用いた検討を実施した。その結果、PVC を用いた検討やサイズの異なる NP を用いた検討においても、MP・NP は表面劣化することで細胞毒性を示すことを明らかとした。さらに、詳細に劣化 MP・NP が示す細胞毒性の発現機序を解析したところ、2012 年に提唱された鉄依存的な過酸化脂質の蓄積によって生じる細胞死フェロトーシスが誘導されていることを明らかとした。

将来的な体内動態・細胞内動態解析に向けて、MP 標準品について蛍光標識を試みた。蛍光標識には、MP の素材ごとの識別や環境中 MP の検出に用いられる蛍光染料 Nile Red を用いた。その結果、PE、PVC 共に未劣化、劣化 MP 標準品について、Nile Red による染色が可能であり、表面劣化状態 (表面酸化による親水性の増加) に応じて蛍光が長波長側に変化することを見出した。

本研究にて確立した環境中の種々物性を示す MP 標準品の作製基盤は、将来的な MP 標準品を用いた生体影響評価への展開が期待される。今後は、形状やサイズ等について環境中の MP の物性を考慮した標準品作製基盤を構築すると共に、これら MP 標準品や蛍光標識 MP 標準品を用いた生体影響評価・体内動態解析を進め、MP のリスク評価を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikuno Yudai, Tsujino Hirofumi, Haga Yuya, Asahara Haruyasu, Higashisaka Kazuma, Tsutsumi Yasuo	4. 巻 2
2. 論文標題 Impact of Degradation of Polyethylene Particles on Their Cytotoxicity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microplastics	6. 最初と最後の頁 192 ~ 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microplastics2020015	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ikuno Yudai, Tsujino Hirofumi, Haga Yuya, Manabe Sota, Idehara Wakaba, Hokaku Mii, Asahara Haruyasu, Higashisaka Kazuma, Tsutsumi Yasuo	4. 巻 277
2. 論文標題 Polyethylene, whose surface has been modified by UV irradiation, induces cytotoxicity: A comparison with microplastics found in beaches	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 116346 ~ 116346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ecoenv.2024.116346	査読の有無 有
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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 環境中のマイクロプラスチックの劣化状態を考慮した細胞毒性評価
3. 学会等名 第49回日本毒性学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 環境中の表面性状を模擬したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 表面劣化したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堤 康央, 辻野博文, 浅原時泰, 東阪和馬, 芳賀優弥
2. 発表標題 はじめに -生体外微粒子としてのナノ・マイクロプラスチックの生体影響評価-
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堤 康央, 芳賀優弥, 東阪和馬, 浅原時泰, 辻野博文
2. 発表標題 終わりに -薬学的観点からのナノ・マイクロプラスチックの安全性評価-
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 実環境中のマイクロプラスチックの生体影響評価の基盤構築
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 井上 豪, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 実環境中を模したマイクロプラスチックの細胞毒性評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 浅原時泰, 生野雄大, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 マイクロプラスチックの細胞毒性及び遺伝毒性評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 紫外光により劣化したマイクロプラスチックはオートファジー依存的な細胞死を誘導する
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Manabe S., Haga Y., Tsujino H., Asahara H., Ikuno Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.
2. 発表標題 The mechanisms of autophagy-dependent cell toxicity caused by degraded microplastics
3. 学会等名 The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出原若葉, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 真鍋颯太, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央
2. 発表標題 劣化したマイクロプラスチックの細胞内取り込み機構の解明に向けた検討
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haga Y., Manabe S., Tsujino H., Ikuno Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y.
2. 発表標題 The Mechanisms of Degraded Microplastics-Induced Cell Toxicity
3. 学会等名 American College of Toxicology 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芳賀優弥
2. 発表標題 多種多様なマイクロプラスチックによる毒性発現機序の理解
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔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	浅原 時泰 (Asahara Haruyasu) (20632318)	大阪大学・大学院薬学研究科・准教授 (14401)	

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
---------	---------