

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21326

研究課題名（和文）マイクロプラスチックはアサリによってナノ化されるか？

研究課題名（英文）Possibility of destruction of microplastics by manila clams

研究代表者

小川 展弘（Ogawa, Nobuhiro）

東京大学・大気海洋研究所・技術専門職員

研究者番号：30626536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：海洋マイクロプラスチックによる海洋汚染が大きな社会的関心を集め、近年では多くの海洋生物による誤飲や生体への影響も評価されつつある。しかし体内に取り込まれた後の挙動に関しては技術的な問題から摂餌行動による微細化の可能性など不明な点が多く残されたままになっていた。本研究ではアサリを材料に体内での挙動について組織化学的にその解明を試みた。その結果、アサリは誤飲するマイクロプラスチックのサイズ依存的に取り込む臓器が異なることが示された。特にナノサイズのプラスチックは細胞レベルの消化吸収に関与することから栄養吸収に影響を与える可能性が示された。また、胃でマイクロプラスチックを破碎できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の完遂によってはいじめて、マイクロプラスチックの発生源である沿岸域に生息する海洋生物、特にアサリという歯を持たない濾過食者の摂餌行動であってもマイクロプラスチックがナノ化する可能性があることが示された。理論的には物質は細粒化されるほど有害化学物質の吸着能が高くなる。つまり海洋生物に与える有害性を飛躍的に増大する危険性を孕んでいるといえる。また、マイクロプラスチックの体内動態も明らかになり、海洋汚染による影響評価が高精度に実施できるようになる。今後、マイクロプラスチックの有害性が再認識され、ナノプラスチックによる海洋生態系の影響がより正確に把握されるように展開されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Marine pollution by marine microplastics has attracted a great deal of social concern, and in recent years, accidental ingestion by many marine organisms and their effects on living organisms have also been evaluated. However, regarding the behavior after being taken into the body, there were still many unclear points such as the possibility of destruction by feeding behavior due to technical problems. In this study, we attempted to elucidate the behavior in the body using manila clams using histochemical techniques. As a result, it was shown that clams take in different organs depending on the size of microplastics that they accidentally ingest. In particular, nano-sized plastics are involved in digestion and absorption at the cellular level, indicating the possibility of affecting nutrient absorption. We also discovered the possibility of crushing microplastics in the stomach.

研究分野：組織学

キーワード：マイクロプラスチック アサリ 水産無脊椎動物 摂餌生態 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

海洋中のマイクロプラスチックの存在が 1972 年に Science の論文 で初めて報告されて以来、現在では多くの水産生物の体内に取り込まれていることが広く報告されている。これはプラスチック生産量の急激な増加が主な原因である。また、その「難分解性」や近年注目されつつある「有害化学物質の高い吸着能」などから近い将来において海洋生態系を危機的な状況に追い込む可能性を秘めている。国際的な排出予防の取り組みは進められつつあるが、海洋中のマイクロプラスチック濃度の劇的な減少は期待できない。そのため海洋生態系の保全には科学的な根拠に基づく正確な影響予測が重要である。

2. 研究の目的

海洋マイクロプラスチックによる海洋汚染が大きな社会的関心を集め、近年では多くの海洋生物による誤飲や生体への影響が評価されつつある。マイクロプラスチックの生産の場である沿岸域には、微細な有機粒子を摂食する多種多様な動物が生息する。沿岸域における代表的な懸濁物食者である二枚貝は、ガラスの殻をもつ微細藻類である珪藻を主餌料とする。珪藻の中には著しく堅い細胞殻を有する種が存在するが、二枚貝は消化管内の「桿晶体」と「胃循」という破碎構造により、これらを磨り潰して破壊できる。一般にガラスの破断片は鋭利な刃となる。マイクロプラスチックが二枚貝によって摂食されれば、磨り潰す機構と珪藻殻の破断片によりナノプラスチックに細粒化されることが予想できる。しかし、それら体内に取り込まれた後の挙動に関しては不明な点が多く、摂食・消化によるプラスチックの破壊過程や破壊後の形状、大きさについての研究例は一切無い。これは誤飲したプラスチックの体内動態を評価するための技術がなかったことが原因として挙げられる。本研究課題では、さまざまな分析技術的な課題を解決しながら、二枚貝が誤飲したマイクロプラスチックを実際に微細化できるかなど体内での挙動に関する詳細な実態解明を試みた。

3. 研究の方法

アサリに餌として浮遊珪藻 *Cheatocecos gracilis* ととともに、マイクロプラスチックとして蛍光ポリスチレンビーズを与えて飼育することで、マイクロプラスチックの誤飲環境とした。まず摂餌による物理的ダメージの影響を評価できるようにするため、マイクロプラスチックの形態学的特徴をナノレベルで表面と内部構造ともに明らかにした。アサリが摂餌可能なマイクロプラスチックの大きさを調べるために飼育個体の糞を回収し、蛍光観察によってプラスチックの有無を調べた。次に、摂餌に伴うポリスチレンビーズに与えるダメージを評価するために回収した糞からプラスチックを回収・精製する技術の開発をおこなった。回収したプラスチック片の表面の傷など超微細構造はその物性から困難であったため、走査型電子顕微鏡で超高分解能観察するための試料調整技術の開発もおこない極微細な状態の解析を実現した。つづいて、生体内や糞内のマイクロプラスチックの分布や局在・形態を調べるための化学固定・組織切片の作製・観察条件の検討を光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡にそれぞれ実施し、その局在を解析した。またアサリの体内でプラスチックが受けたダメージを推定するために、上述の方法で観察した糞から精製したポリスチレンビーズの形態データをもとに物理試験を実施し、体内でマイクロプラスチックが受ける強度の定量化を試みた。

4. 研究成果

本研究で用いた蛍光ポリスチレンビーズの表面構造の解析をおこなったところ、表面は極めて平滑でほぼ真球であった。また内部構造を観察したところ、表面には基材となるポリスチレンのみが認められ、その内側に有機系の蛍光色素が均質に分散していた。また、強度保持・比重調整用フィラーとしてアルミニウムも観察された。

このマイクロビーズをアサリに摂餌させたところ、45 μ m以下の粒子をよく誤飲していた。次に、これら誤飲させたアサリから排出される糞に含まれるマイクロビーズを分離精製する方法を検討した。まずポリスチレンビーズを含む糞は、グルタルアルデヒドを用いた化学固定を施すことで飼育容器から採取が容易になることを見出した。この糞はトリプシンを用いた酵素処理でポリスチレンビーズを分散可能であり、さらにこの分散物は段階的のシヨ糖密度勾配遠心法を用いることで、簡単に一層に濃縮できることを明らかにした。図1。この濃縮したポリスチレンの層を回収し、フィルターでろ過して電子顕微鏡で観察したところ、表面は極めて清浄であり非常に高度に精製できることが明らかになった。一方で、オスミウム蒸着を利用した走査型電子顕微鏡用試料作製方法を開発し、フィルターに捕集したプラスチックを30万倍以上の倍率で観察できるようにした。この新技術を用いて摂餌により表面に残る傷など物理的な損傷を走査型電子顕微鏡で十分に解析可能な状態であることを明らかにした。これらの方法を組み合わせてアサリから排出されたマイクロビーズを3次元的に詳細に観察した結果、ごくわずかにではあるが摂餌行動による変形と思われる痕跡を検出した。

組織化学的な解析により、アサリは誤飲するマイクロプラスチックのサイズ依存的に取り込む臓器が異なることが示された。10 μ mより大きいマイクロプラスチックは口から食道、胃、腸を通り、糞として排出されることが明らかになった。10 μ mのプラスチックは一部が胃から延びる中腸線の導管に運ばれていた。1 μ mでは中腸線細管の近くまで運ばれていた。50nmのプラスチックは、中腸線細管の末端部を構成する貪食細胞に検出され、透過型電子顕微鏡観察により貪食細胞内のライソゾームに取り込まれていることが示された。また、これらのプラスチックは腸に運ばれた後に腸管上皮からの分泌物により押し固められて観察された。

最後に、これまで取得してきた走査型電子顕微鏡で観測された糞に含まれるプラスチックの形態変化量、組織化学的手法で検出された生体内におけるプラスチックの挙動、摂餌行動に関するこれまでの知見などを総合して検討することで、摂餌したプラスチックが受けるダメージは胃内の悍晶体と胃楯の間で押し付ける力が主であると推測された。そこで微小部用の押し付け強度試験機で糞に含まれるポリスチレンビーズの変形量を再現し、その試験強度を算出することで、アサリが破壊可能なプラスチックの押し込み強度を始めて定量化した。

以上より、アサリは誤飲するマイクロプラスチックのサイズ依存的に取り込む臓器が異なることが示された。特にナノサイズのプラスチックは細胞レベルの消化吸収に関与することから栄養吸収に影響を与える可能性が示された。最近、中国のグループがアサリにマイクロプラスチックを誤飲させることで栄養の吸収量の減少や成長速度の低下を示すことを明らかにしており、本研究の成果と合わせて考えるとマイクロプラスチックの誤飲により中腸線に機能障害を起こす可能性が示唆された。

Carpenter and Smith. 1972. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*, 175:1240-1241.

Jiang et al., 2022. Microplastics influence physiological processes, growth and reproduction in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Vol 293, 15, 118502

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 展弘、森下 保幸
2. 発表標題 アサリが誤飲したマイクロプラスチックの体内動態に関する組織形態学的解析
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 博久、小川 展弘、花園 誠
2. 発表標題 アサリ 3D模型を活用した海の環境学習プログラムの開発
3. 学会等名 日本生物教育学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 博久、小川 展弘
2. 発表標題 アサリの3D模型を活用したカリキュラム開発 -アサリから海のまなびへ-
3. 学会等名 日本学術会議オンラインワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 展弘、打田 麻夕子
2. 発表標題 摂餌されたマイクロプラスチックの微細構造を観察するための分離精製技術の検討
3. 学会等名 第4回東京大学技術発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 展弘、羽山 和美、打田 麻夕子
2. 発表標題 マイクロプラスチック研究で使う蛍光マイクロビーズの微細構造解析
3. 学会等名 第4回東京大学技術発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 展弘
2. 発表標題 zoomを利用したSEMリモート観察 -アサリが取り込むマイクロプラスチック-
3. 学会等名 電子顕微鏡技術研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 茅根 創、丹羽 淑博	4. 発行年 2023年
2. 出版社 成山堂書店	5. 総ページ数 210
3. 書名 東京大学の先生が教える海洋のはなし	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【標題】オスミウムコーターを使ったSEM用前処理技術：フィルター濾過試料の迅速かつ簡便な超高分解能観察法</p> <p>【発表者】小川 展弘、打田 麻夕子</p> <p>【発表形式】ホームページ・ダイレクトメール（メイワフォーシス株式会社）</p> <p>【公開時期】2023年6月予定</p>
--

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	伯耆 匠二 (Houki Shouji) (10809354)	三重大学・生物資源学研究所・助教 (14101)	

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