

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19843

研究課題名(和文)生物組織中のナノプラスチックの同定・定量と添加剤の同時測定による化学物質曝露評価

研究課題名(英文) Simultaneous measurement of nano-plastics and additives in biological tissue and evaluation of plastic-associated chemical exposure

研究代表者

高田 秀重 (Takada, Hideshige)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70187970

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)：血液や生体組織中のマイクロ/ナノポリスチレン(PS)とPCBsおよびベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BUVs)を同一試料から測定する方法を開発した。試料をアルカリ加水分解し、液液抽出によりジクロロメタンで抽出し、抽出物をゲルクロマトグラフィーによりポリマーとモノマーに分け、ポリマーは熱分解GC-MSによりPSを、モノマーは精製・分画しGC-MSによりPCBsとBUVsを定量した。本手法をカメの血液およびヒト検体(血液および臓器)に適用し、ヒト検体からもポリスチレン、PCBs、BUVsを検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスチックが微細化し、ヒトも含む生物体内に蓄積することは懸念されていたが、信頼ある分析法の欠如から、報告例は少なく、特に添加剤を含むプラスチック関連物質との同時測定例は報告されていなかった。そのような学術的な背景のもと、本研究ではマイクロ/ナノプラスチックと関連化学物質の同時測定法を開発したことの意義は大きい。今回、ヒト血液中からマイクロ/ナノプラスチックとプラスチック添加剤が検出されたことから、プラスチックという素材が微細化してヒトに影響を及ぼす可能性があることが社会的に認識される契機となった。今後この手法で測定を行われることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study developed simultaneous analytical method of micro/nano-polystyrene and plastic-associated chemicals in biological samples and applied to human blood and tissue samples (liver, kidney, and lung) obtained through pathological autopsy and through comprehensive health screening. All the samples fulfilled the human-ethical guidelines. One mL of blood samples were extracted with DCM. The extracts were hydrolysed and were subjected to GPC to separate monomers/oligomers and polymers. Polymer fraction was analyzed by pyrolysis GC-MS. Monomers/oligomers fraction was further purified and analyzed for PCBs and benzotriazole UV-stabilizers by GC-ECD and GC-MS. In 4 among 11 blood samples, polystyrene was significantly detected with range from 40 ng/g to 555 ng/g. PS was not significantly detected in the tissue samples, while BUVs (UV-P, UV-326, UV-327, UV-329) with several ng/g-wet and PCBs with several tens ng/g-wet were significantly detected in some tissue samples.

研究分野：環境化学

キーワード：プラスチック汚染 マイクロプラスチック ナノプラスチック ヒト血液 PCBs 添加剤 ベンゾトリアゾール 熱分解GC-MS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラスチックは使用の時点から劣化が始まり、マイクロプラスチック (MP : <5mm) やナノプラスチック (NP : <1 μ m) を放出する。特に、野外で使用されるプラスチックや野外に廃棄されたプラスチックは紫外線や物理的摩耗によりマイクロ/ナノプラスチック (MNP) を環境中に放出し、その汚染は大気、陸域、河川、海洋へと広がり、一部は海洋生物に蓄積し、食物連鎖を通して、生態系全体を汚染している。飲食容器等のプラスチックの日常生活における使用、水、大気、魚貝類を通して、マイクロ/ナノプラスチック (MNP) は人間に曝露されている。NP はその小ささから生物の組織や血液に侵入しやすく、ポリマー自体による免疫毒性や添加剤による内分泌かく乱を引き起こす可能性がある。特に、微細化の過程で添加剤は溶出・生物濃縮し易くなる。しかし、分析の困難さから生体組織中の NP の報告例は限られており、関連化学物質との同時測定例は見あたらない。

2. 研究の目的

本研究では生体試料中の MNP と添加剤等のプラスチック関連化学物質の同時定量法を開発することを第一の目的とした。本研究では、関連化学物質の同時測定と精製の必要上、抽出後の操作を有機溶媒中で行うため、常温で有機溶媒 (ジクロロメタン : DCM) に可溶性ポリマーであるポリスチレン (PS) を対象とした。PS は世界のプラスチック生産量の 5 % を占める汎用ポリマーの 1 つであり、モノマーによる毒性も懸念される。マイクロ/ナノポリスチレンは毒性実験のモデル粒子に利用されることも多い。そこで、本研究では、マイクロ/ナノポリスチレンを対象とし、その生体試料中での分析法の開発を行った。開発された方法を、ヒト試料に応用することで MNP のヒト体内への移行・蓄積を明らかにし、さらに MNP を介した化学物質への曝露機構を考察することを本研究の第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

生体試料中のマイクロ/ナノポリスチレンの分析法の検討は、コイ (*Cyprinus carpio*) の血液および筋肉試料を用いて行った。コイは 2022 年 12 月に東京都野川において網で捕獲し、採血を行った。コイは研究室にて解剖し、筋肉組織を得た。

開発した生体試料中マイクロ/ナノポリスチレンの分析法をヒト血液および組織に適用した。ヒト試料は、筑波大学附属病院つくばヒト組織バイオバンクセンターおよび東京農工大学倫理審査委員会での倫理審査を受けて、以下の試料の提供を受けた。3 症例の病理解剖から得た血液、肝臓、肺、腎臓および 8 名の人間ドック受診者の血液を用いた。すべての試料は、人間ドック受診者、病理解剖症例の残余検体である。病理解剖試料 (剖検試料) はガラス製あるいはステンレス製の器具を、人間ドック検体は PP 及び PET 製の器具を用いて採取され、蒸留水を用いたブランケット実験等により、試料の採取及び分析過程における潜在的な汚染 (コンタミネーション) を調べた。試料の分析は、0.2 g から 1 g の湿試料に 10 % KOH 水溶液を 6 mL 加えて 80 °C で 16 時間以上保ち生体有機成分を加水分解した。塩酸を加えたのち、回収率補正用内部標準物質 (surrogate) として重水素ラベルポリスチレンを加え、DCM で液液抽出し、オープントップカラムのゲルクロマトグラフ (Sephadex LH-20, ϕ 1 cm x 23 cm) にかけるポリマー画分とモノマー画分に分画した。ポリマー画分は熱分解 GC-MS にてポリスチレン (PS) の分析を行った。PS の分析では、ポリスチレンの熱分解生成物であるスチレントリマーのフラグメントイオン : $m/z=91$ を定量イオン、 $m/z=117$ を確認イオンとして用いたほか、スチレンジイマー、スチレンモノマーのイオンを定性に用いた。ゲルクロマトグラフにおけるモノマー画分は 5% H_2O 不活性化シリカゲルカラムで微極性各分と極性画分に分け、極性画分をアセチル誘導体化し、GC-MS を用いてベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 (BUVSs) を分析した。微極性画分は、さらに 100% 活性シリカゲルカラムで精製し、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) を GC-IT-MS を用いて分析した。

4. 研究成果

本研究では、生体有機物の分解条件、ポリマーの抽出法とその条件、ポリマーとモノマーの分画のためのゲルクロマトグラフの選択・検討、熱分解 GC/MS の定量条件、などを検討した。その中で、既存の研究にないユニークな点は LH-20 カラムによるゲルクロマトグラフィーである。ポリマーの熱分解 GC-MS による分析の妨害物質を減らすために、ダブルショットの熱分解装置を使って熱脱着で低分子成分を除去することは可能である。また、熱脱着させた低分子成分をオンラインで GC-MS に導入し定量分析することも可能である。しかし、誘導体化や精製等前処理が必要な成分や ECD など質量分析計以外の検出器で検出する成分はオフラインで分画して、モノマー画分を分取する必要がある。そのため、本研究では、オフラインでのポリマーとモノマーを分画する方法を採用し、ゲルクロマトグラフ充填剤を模索した。疎水性のゲルクロマト充填剤として汎用で用いられている充填剤はポリスチレンやスチレンジビニルベンゼンであるが、構造から予想される通り、ブランクが高く、PS の微量分析には適用できないことがわかり、デキストランベースの充填剤 LH-20 (Sephadex 社製) を本研究では採用した。クロスコンタミネーション

ンを抑えるために、ガラスカラムに LH-20 を充填し、充填剤の汚れ具合を目視し、汚れ度合いに応じて再充填を行った。LH-20 を用いたゲルクロマトグラフィーにおけるポリスチレン、PCBs, および BUVSs の流出量の検討結果に基づき、分画条件を決定した。その他の検討項目についても検討を行い、以下の分析法を開発した。

開発した方法の分析操作の再現性と回収率はコイ筋肉試料 DCM 抽出液を用いて検討した。3 連の分析で再現性は PS : 7 %, PCBs : 2-13 %, BUVSs : 0.9-10 % であり、抽出液に標準物質を添加して行った回収率試験での回収率は PS : 103 %, PCBs : 89-120 %, BUVSs : 91-104 % であった。本研究の PS 分析の定量限界 (30 ng/g - 500 ng/g) は先行研究(1100 ng/mL)¹⁾よりも低く、精密な分析が可能となった。ヒト試料の分析を行う前に、コイの血液試料の分析を行い、全血のヘパリン処理を施した試料から 398 ng/g-wet のポリスチレンを有意に検出した。

ヒト試料について、ブランク実験により、剖検試料の採取器具からの汚染はほとんど確認されなかった。人間ドック試料の採取器具にプラスチックの使用は避けられないが、人間ドックの採血キットの材質を FTIR で確認した結果、採血管は PET、採血チューブはナイロン、注射筒は PP 製で、PS は使用されいなかった。チューブと注射筒のコネクターが ABS 製であった。人間ドック採血キットで蒸留水を採血管に採取し、分析を行ったが、PS, PCBs についてはブランクを超える検出は確認されなかった。BUVSs については、UV-326, UV-327, UV-328 についてブランクの 3 倍を超えて検出されたが、いずれの成分も 1ng 以下の検出と微量であった。本研究では、PS に対象ポリマーを絞ったためブランク値を抑えることが可能であった。

ヒト血液試料の分析では、11 試料中 4 試料からブランク値の 3 倍を超える有意な PS を検出し、濃度範囲は湿重量当たり 40 ng/g - 555 ng/g だった (図 1)。この PS 濃度レベルは、オランダの先行研究¹⁾で報告された値より 1 桁低い。同じ検体でも 2 連の分析で検出濃度が大きく異なる点は、先行研究¹⁾と同様の傾向であり、疎水性のプラスチック微粒子が親水溶液である血液中不均質に存在していることが要因の一つと考えられる。3 検体全ての血液中からは PCBs が 0.12 - 3.1 ng/g-wet のレベルで検出された (図 2)。PCBs 濃度は P1 検体で高く、P3 検体で低く、PS (図 1) とは異なる傾向を示した。PCBs 組成は高塩素側が優占する生体試料に特有な傾向であった (図 2)。3 検体全ての血液中から BUVSs(UV-P, UV-329, UV-327)が検出された (図 3)。検出された BUVSs の組成 (UV-P>UV-329) は日本人の母乳についての報告例²⁾と類似していた。UV-P は PS(図 3)と同様に検体 P3 で高く P1 からは検出されなかった。人間ドック血液試料の多くから UV-P と UV-329 が検出されたが BUVSs の濃度は、剖検試料に比べて低かった。採血キットで使用されたプラスチックへの吸着の可能性も考えられた。

血液中の PS 濃度が比較的高かった検体 (P3) の腎臓、肝臓、肺を分析したところ、PS は有意に検出されなかった。しかし、いくつかの組織で BUVSs の一部 (図 4) の成分および PCBs (図 5) を有意に検出した。PCBs は腎臓 (右) および肝臓で高濃度(15- 20 ng/g-wet)であった。PCBs 組成は高塩素側が優占する生体試料に特有な傾向であった。BUVSs も腎臓 (右) から UV-P, UV-329, UV-326, UV-234 が、肝臓から UV-329 がそれぞれ数 ng/g-wet のレベルで検出された。今回血液中や組織中から検出された BUVSs は日常的に使われるプラスチック製品から検出される成分³⁾である。血液試料中のプラスチック粒子の総重量に占める PS の割合を、生産量の割合の 5 % と仮定すると、剖検血液中には約 6 µg/g のプラスチックが含まれると推定された。プラスチック製品中の UV-P 濃度は約 1 µg/g³⁾と仮定すると、血液中プラスチックから溶出しうる UV-P 濃度は 6×10^{-3} ng/g 程度と推定された。これに対して剖検血液試料から検出された UV-P 濃度は 2 - 5 ng/g であり、推定含有値より 3 桁程度高い濃度だった。このことから、血液中 BUVSs は、血液中の MNP に由来するものであるとしても血液中の MNP からの直接の溶出の寄与は低いことが示唆され、環境中でプラスチックから溶出した BUVSs が食物連鎖経路でヒトに曝露された可能性、体内で MNP から BUVSs が溶出し血液に移行し MNP の大半は体外に排出された可能性、プラスチック以外の起源から血液に取り込まれた可能性が考えられる。

【引用文献】

- 1) Leslie, et al., Environment International, 163, 107199, 2022.
- 2) Kim, et al., Science of The Total Environment, 655, 1081-1088, 2019.
- 3) 坂根ら, 環境化学物質 3 学会合同大会, P-81, 2022.

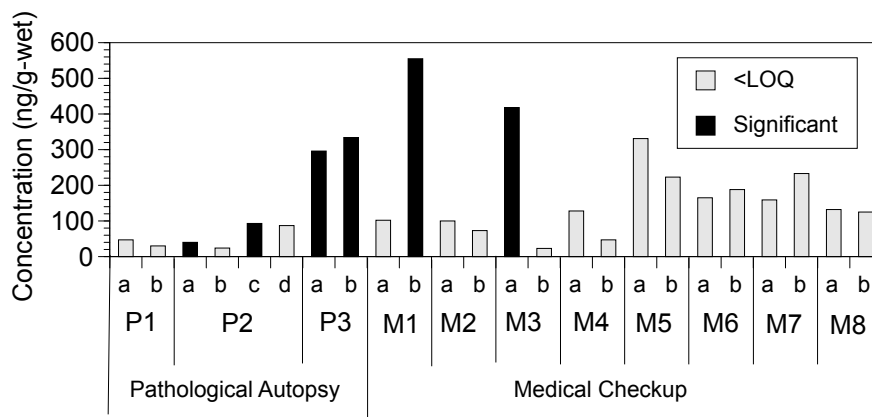


図 1. ヒト血液中ポリスチレン濃度

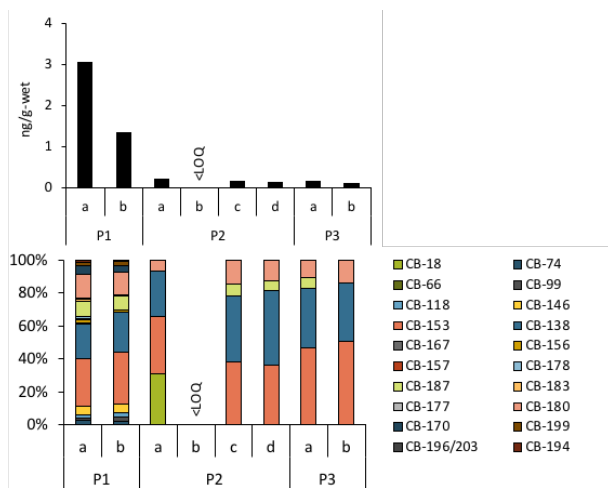


図 2. ヒト血液中 PCBs 濃度と同族異性体組成

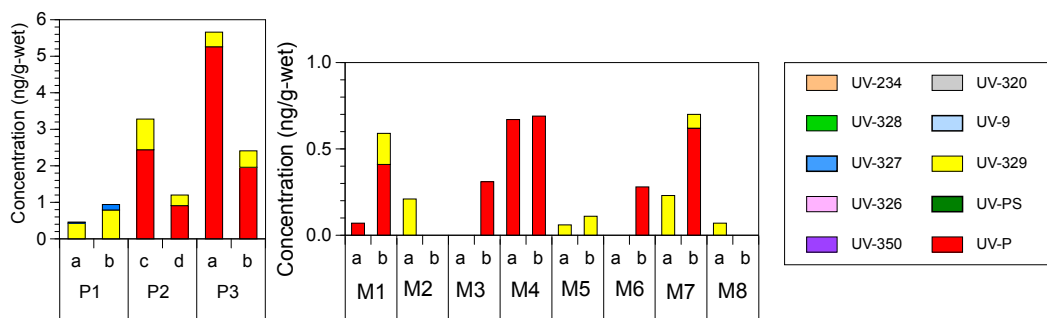


図 3. ヒト血液中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤濃度

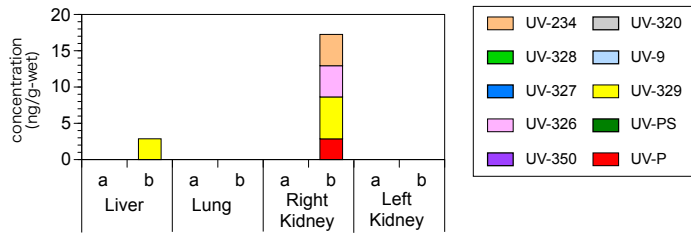


図 4. ヒト組織中ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤濃度

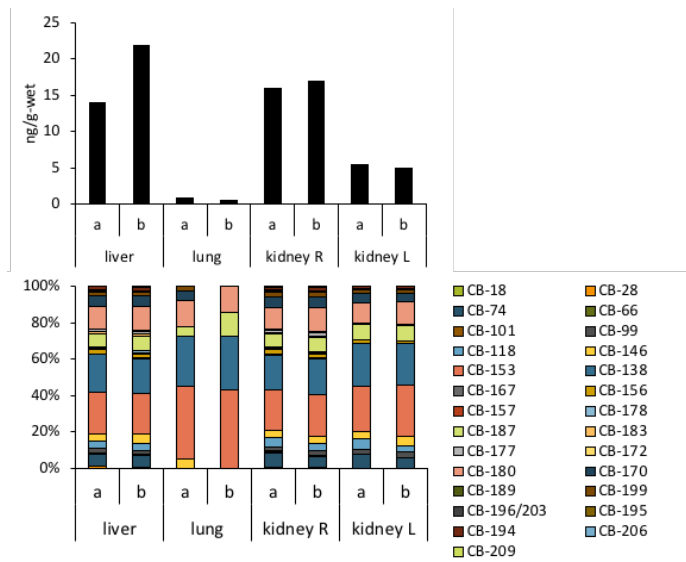


図 5. ヒト組織中 PCBs 濃度と同族異性体組成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田秀重
2. 発表標題 マイクロプラスチックを介したヒトへの化学物質曝露
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideshige TAKADA
2. 発表標題 Detection of micro/nano-plastics and associated chemicals in human blood and tissue
3. 学会等名 2nd International Symposium on Plastic Pollution in Asian Waters（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高田秀重
2. 発表標題 プラスチック条約とプラスチックの使用削減
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高田秀重
2. 発表標題 第3回環境化学物質合同大会
3. 学会等名 生体試料中のマイクロ/ナノプラスチックの分析法の開発とヒト試料への適用
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	高屋敷 典生 (Takayashiki Norio) (00364521)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究 分担者	水川 薫子 (Mizukawa Kaoruko) (50636868)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師 (12605)	

	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 協力者	竹内 朋代 (Takeuchi Tomoyo) (50450333)	筑波大学附属病院・つくばヒト組織バイオバンクセンター・ 教授 (12102)	

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