

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10606

研究課題名(和文) マイクロプラスチック摂取が糖尿病モデル水棲生物の合併症と生殖機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of microplastics on growth, fertility, eye, and kidney of medaka, *Oryzias latipes*

研究代表者

菅田 慎一 (Chisada, Shinichi)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：90639791

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)：マイクロプラスチック(MP)は、プラスチックごみが断片化された5 mm以下の粒子や、洗顔料や化粧品の原料として生産された200 um以下の粒子を指す。現在のところ、MPの曝露量と生体影響の関係はどの生物においても明らかにされていない。本研究では、メダカにおいてMPの0.25 mg-MP/g-体重以上の経口曝露は、成長抑制、生殖能力の低下、網膜と糸球体での病変形成を起こすことを明らかにした。経口曝露されたMPが病変組織に直接作用した所見を認めなかったため、生体影響の原因となる因子は明らかでない。従って、今後はMPに含まれるポリエチレン以外の成分も含めて詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水環境中のMPは大小の水棲生物の口やエラから容易に取り込まれるため、水棲生物そのものへの影響や、その後の生物濃縮による人体への影響が懸念されていた。しかしながら、生体影響とMPの経口曝露量の関連は明らかでなかった。本研究では、メダカを用いてその関連を示すと同時に、毒性を示さない経口曝露量を示した。この研究成果は、MPの生体毒性を評価するための基礎的な成果として学術的意義をもつ。また、ヒトの健康におけるMPの許容濃度の設定において基礎的な成果であり、社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to evaluate the adverse effects of polyethylene microplastic beads (MPs, 10-63 um diameter) with respect to growth, reproduction, and the eyes and kidneys of medaka (*Oryzias latipes*) under experimental conditions to contribute to future research involving LOAEL determinations. Fish were exposed to 0.07 to 5.0 mg-MPs/g-body weight (BW) for 12 weeks. Growth inhibition was recognized in fish exposed to 5.0 mg-MPs/g-BW. Decreased fertility and changes in the eyes were observed in fish exposed to >0.25 mg-MPs/g-BW. The eyes exhibited thinning of the optic nerve fiber layer and dilatation of retinal veins compared with medaka not treated with MPs. The expansion of mesangial matrix in the glomerulus of kidney was observed in fish exposed to >0.5 mg-MPs/g-BW. Our data should prove useful for determining the LOAELs of polyethylene beads on vertebrates and enhance understanding of the mechanism underlying the biological toxicity of polyethylene MPs.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：マイクロプラスチック 生体影響 メダカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MP は、プラスチックごみが海洋で断片化された 5 mm 以下の粒子や、洗顔料や化粧品の原料として生産された 200 μ m 以下の粒子を指す。水環境中の MP は大小の水棲生物の口やエラから容易に取り込まれるため、水棲生物そのものへの影響や、その後の生物濃縮による人体への影響が懸念されている。

生態学研究では、魚や海鳥などの消化管から有害化学物質が吸着した MP が検出されており、そのうちいくつかは、毒性影響を増長している可能性が示唆されていた。また、実験動物を用いた生体影響調査では、無脊椎動物において成長阻害と生殖阻害の影響が報告されていた。人の健康への影響に関しては、体内での MP の検出、及び MP の生体影響に関する報告はほとんどなかった(研究開始[2019 年度]以降、消化管、血液、母乳での MP の検出例が報告されている)。

一方近年では、肥満や糖尿病などの原因として、運動、食事、遺伝的要因とともに、環境から曝露される有害化学物質の関連も注目されている。例えば、疫学研究では、フタル酸エステルやビスフェノール A 等と肥満や糖尿病との関連や、また、有害化学物質の次世代影響が示唆されている。フタル酸エステルやビスフェノール A はプラスチック製品に含まれる可塑剤である。

従って、MP のヒトへの曝露影響は、代謝関連疾患への影響にまで視野を広げる必要がある。現在のところ、有害化学物質に関しては、ヒトの健康に対する許容濃度を超過してそれらを含む食品は検査で排除され市場に流通しない。しかしながら、MP の許容濃度は未だ設定されておらず、MP 自体の生体毒性を評価する基礎的研究の集積が待たれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、モデル脊椎動物であるメダカにおいて、MP の曝露量と毒性影響の関連を明らかにすることである。それに伴い、経口摂取された MP が体内蓄積したままになるのか、もしくは通常の餌と比較してどのくらい長く/短く消化管内に滞留するのか等の体内動態を明らかにする。また、糖尿病を発症するモデルメダカを用いて、MP の曝露が糖尿病に関連する病態に影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 用いたメダカ、MP、餌と曝露方法

メダカ系統は Kyoto-Cab 及び STIII (NBRP medaka, Okazaki) を用いた。MP は Cospheric LLC (Santa Barbara, CA, USA) 社製の粒径 10-63 μ m の白色ポリエチレン粒子、または赤色蛍光ポリエチレン粒子を用いた。MP の曝露は、MP を粉餌(おとひめ B1[粒径 0.074-0.36 mm; 組成 タンパク質 >50.0%; 脂質 >10.0%; 灰分 <16.0%; 繊維 <3.0%; Ca >2.0%; リン >1.5%; 日清丸紅飼料株式会社]) に付着させ、それを投与することで行った。顕微鏡下でのメダカの観察、組織標本作成のための組織摘出、もしくは体重測定は麻酔下で行われた。

2) MP の曝露量と生体影響との関連

Kyoto-Cab メダカ(約 280 mg、6-7 か月齢)を対象魚とし、粉餌のみの対照群、及び粉餌とともに 0.07、0.25、0.5、2.5 もしくは 5.0 mg-MPs/g-体重を経口曝露する試験群を準備した(各群 10 尾)。MP は白色ポリエチレン粒子を用いた。体重 280 mg のメダカ 1 尾の場合、0.07、0.25、0.5、2.5 もしくは 5.0 mg-MPs/g-体重群の 1 日の経口曝露量は、0.02、0.07、0.14、0.7、もしくは 1.4 mg に相当する。また、MP 曝露による水槽中の一時的な濃度は 0.009、0.032、0.065、0.32 もしくは 0.65 mg-MPs/L に相当する。この際、1 尾あたり 1L 水で飼育した。MP が付着した粉餌は、投与 30 分後に水面と水底に残らず、メダカにほぼ全てを摂餌された。各群のメダカの体重と産卵数は週 1 回測定され、曝露開始後 12 週目で終了した。体重と産卵数の曝露期間中の推移と曝露量の関係は、傾向性検定結果で評価し、各週の各群間の差は ANOVA 検定のうち Tukey-Kramer 検定を行い評価した。

3) MP の体内動態

STIII メダカ(約 250 mg、6 か月齢)を対象魚とし、粉餌のみの対照群、及び粉餌とともに 5.0 mg-MPs/g-体重を経口曝露する試験群を準備した(各群 5 尾)。試験群では赤色蛍光 MP が付着した粉餌を 10 日間曝露したのち、赤色蛍光 MP を含まない粉餌に変え、変えた日から 0-13 日目の消化管内の様子を生きのまま蛍光観察した。観察は、PhotonIMAGER (BIOSPACE LAB, Paris, France) を用いた。また 2) の 12 週間の MP 曝露において、体重測定のために麻酔をかけた際に、複数のメダカの排泄物を採取できた。従って、これを顕微鏡観察することによって、排泄物に含まれる MP の有無を確かめた。

4) MP の曝露量と眼病変・腎病変との関連

2) の 12 週間の MP 曝露直後の各群のメダカの眼と腎の組織標本作製し、病変の有無と程度を観察した。眼病変の程度は網膜の厚さと網膜静脈の径を指標とし、腎病変の程度は腎系球体断面積に占めるメサングウム基質面積の割合を指標とし、曝露量との関連を評価した。また、眼と腎の酸化ストレス指標(カルボニル化タンパク質量)と曝露量との関連を評価した。これらの評価は ANOVA 検定のうちの Tukey-Kramer 検定に基づいた。

5) MP の曝露による糖尿病モデルメダカへの影響

レプチン受容体欠損メダカ(約 320 mg、6 か月齢)を対象魚とし、粉餌のみの対照群、及び

粉餌とともに 2.5 mg-MPs/g-体重を経口曝露する試験群を準備した(各群 10 尾)。MP は白色ポリエチレン粒子を用いた。12 週間の MP 曝露直後の各群のメダカの眼と腎において、組織標本を作製し、4)と同様に病変の程度と曝露量との関連を評価した。この評価は Wilcoxon の順位和検定に基づいた。

4. 研究成果

各解析項目で観察された差異は有意水準 5% で検定した結果である。

1) MP の曝露量と生体影響との関連

0.07 mg-MPs/g-体重の曝露群において生体影響は認められなかった。2.5 mg-MPs/g-体重以上の曝露群では、成長が抑制される傾向があり(図 1 の注釈 1)いくつかの週で有意差が観察された(図 1 の注釈 2 と 3)。0.25 mg-MPs/g-体重以上の曝露群では産卵数の減少が観察された(図 2 の注釈 1-5)。0.5 mg-MPs/g-体重以上の曝露群では、それらに加えてふ化率の減少(同最大 - 43%)も観察された。図 1 に示す体重増加指数は、[任意の週の体重値] - [曝露開始直前の体重値] / [曝露開始直前の体重値] × 100 (%) で算出し、成長の指標とした。

2) MP の体内動態

曝露群では、消化管内で MP の塊(1mm 幅以上)が形成される個体が観察され、曝露量が多い群ほどその個体数は増加した(例; 0.07 mg-MPs/g-体重/日群で 1 週あたり 10 尾中 1 尾以下、2.5 mg-MPs/g-体重/日群で同 10 尾中 4-5 尾)。また、摂取された MP は、通常の排泄時間(2-4 時間)より長期間(4-9 日間)消化管内に滞留していた。組織標本の観察において、MP が消化管内腔から体内に取り込まれる様子は観察されず、また、肝臓、腎臓、眼の組織標本においても MP は観察されなかった。

3) MP の曝露量と眼病変・腎病変との関連

組織病変としては、腎系球体のメサングウム基質の増大(同最大+30%)、網膜神経線維層の菲薄化(同最大 - 17%)、網膜静脈の拡大(同最大+77%)が観察されたが、病変の周囲に MP は観察されなかった。組織病変が観察された経口曝露量では、酸化ストレス指標が増加(腎では同最大+35%、眼では同最大+60%)していたことから、MP の経口曝露による生体影響と酸化ストレスの関連が示唆された。

1-3)の結論として、MP の経口曝露は生体影響を与えること、また、影響が見られない曝露量があることが示された。経口曝露された MP が病変組織に直接作用した所見を認めなかったため、消化管内での MP の塊の形成や長期間の MP の滞留が生体影響の一因と考えられる。これらの成果は、第 29 回九州農村医学会、第 80 回日本公衆衛生学会総会シンポジウム、第 91-92 回日本衛生学会学術総会で発表し、筆頭著者として Environmental Pollution, 254(Pt B):113094, 2019 及び Environmental Pollution, 268(Pt B):115957, 2021 で報告した。ただし、MP が消化管内に滞留することが原因なのか、MP 由来の化学物質が原因なのかは現時点では明らかでなく、今後の検討が必要である。

4) MP の曝露による糖尿病モデルメダカへの影響

レプチン受容体欠損メダカが糖尿病二次病変を発症する摂餌量を詳細に決定した。次にその餌量に基づき飼育するとともに、MP を 2.5 mg-MPs/g-体重/日、12 週間曝露した。MP を曝露していないレプチン受容体欠損メダカと比較した結果、曝露群のメダカの空腹時血糖値には変化は無かったが、腎系球体のメサングウム基質の増大、網膜神経線維層の菲薄化が観察された。従って、MP の曝露は、メダカにおいては、糖尿病二次病変を修飾する因子であることが示唆された。これらの成果は、第 73 と 76 回日本栄養食糧学会大会シンポジウム、第 90 回日本衛生学会学術総会で発表し、筆頭著者として Journal of Toxicologic Pathology, 32(4):297-303, 2019 で報告し、摂餌量の決定に関しては、Chapter 1 in Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols Volume 2. Wiley-Blackwell, USA, 2019 Nov で一部を明文化し、詳細については発明者として特許第 7232453 号を取得した。

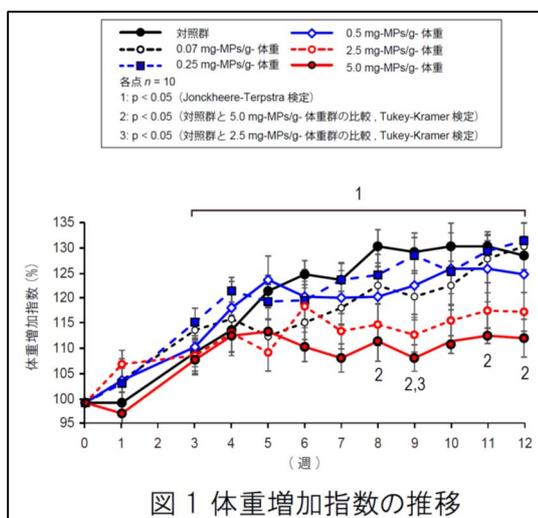


図 1 体重増加指数の推移

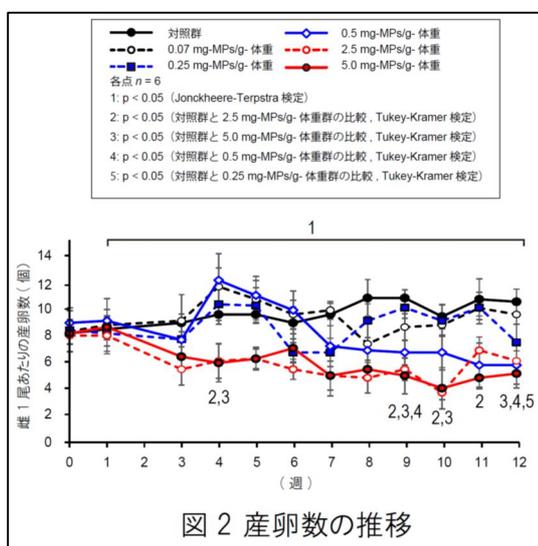


図 2 産卵数の推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chisada Shinichi, Yoshida Masao, Karita Kanae	4. 巻 293
2. 論文標題 Corrigendum to “ Polyethylene microbeads are more critically toxic to the eyes and reproduction than the kidneys or growth in medaka, <i>Oryzias latipes</i> ” [Environ. Pollut. 268 (Pt B) (2021) 115957]	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 118340 ~ 118340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2021.118340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chisada Shinichi, Yoshida Masao, Karita Kanae	4. 巻 268
2. 論文標題 Polyethylene microbeads are more critically toxic to the eyes and reproduction than the kidneys or growth in medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 115957 ~ 115957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2020.115957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chisada Shinichi, Sugiyama Akihiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Renal lesions in leptin receptor-deficient medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2019-0021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chisada Shinichi, Yoshida Masao, Karita Kanae	4. 巻 254
2. 論文標題 Ingestion of polyethylene microbeads affects the growth and reproduction of medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 113094 ~ 113106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2019.113094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅田慎一
2. 発表標題 食欲旺盛な糖尿病メダカと寿命が少し短いメダカ
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会，シンポジウム8 哺乳類以外のモデル生物を用いた栄養学研究の展開（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田慎一、吉田正雄、苅田香苗
2. 発表標題 マイクロプラスチックの経口曝露による生体影響とプラスチック添加剤の関連
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 苅田香苗、菅田慎一
2. 発表標題 マイクロプラスチック環境汚染の課題
3. 学会等名 第80回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福室自子、菅田慎一、吉田正雄、苅田香苗
2. 発表標題 COVID-19流行下におけるプラスチック類廃棄物の環境汚染問題に関する文献レビュー
3. 学会等名 第80回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅田慎一、吉田正雄、苅田香苗
2. 発表標題 経口摂取されたマイクロプラスチックから溶出する化学物質と生態影響への検討
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田慎一、吉田正雄、苅田香苗
2. 発表標題 マイクロプラスチック摂取が水棲モデル生物の生殖・成長、および眼・腎に及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅田慎一
2. 発表標題 過食によって生じる糖尿病メダカの眼病変と腎病変
3. 学会等名 第73回日本栄養食糧学会大会，シンポジウム13 メダカを用いた食品・医薬品の機能性評価基盤の構築（オーガナイザー 阪上浩（徳島大学））（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅田慎一、吉田正雄、石川守、苅田香苗
2. 発表標題 メダカができる地域のワンヘルスアプローチの模索.
3. 学会等名 第29回九州農村医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅田慎一、吉田正雄、苅田香苗
2. 発表標題 マイクロプラスチック摂取が糖尿病合併症モデル水棲生物に及ぼす影響
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shinichi Chisada、Yasuhiro Kamei (Chapter1分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wiley-Blackwell	5. 総ページ数 360
3. 書名 Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols Volume 2 (eds, Kenji Murata, Masato Kinoshita, Kiyoshi Naruse, Minoru Tanaka, Yasuhiro Kamei)	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 糖尿病網膜症、白内障及びノ又は腎症モデル実験動物	発明者 菅田慎一、杉山晶彦	権利者 学校法人杏林学園、学校法人加計学園
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7232453号	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>マイクロプラスチックビーズの経口摂取が眼や腎臓に与える影響を解明 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/news/2020/12/news201222post-257.php 透明メダカによって、体内に入ったマイクロプラスチックビーズの生体への影響が明らかに http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/news/2019/10/news191021post-234.php</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	吉田 正雄 (Yoshida Masao) (10296543)	杏林大学・医学部・准教授 (32610)	
研究 分 担 者	苅田 香苗 (Karita Kanae) (40224711)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

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