

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19840

研究課題名（和文）ナノ医薬品で培ったナノの視点が拓く環境問題ナノプラスチックの生態影響理解への挑戦

研究課題名（英文）Challenges to understand the ecological impact of nanoplastics with environmental issues from a nano perspective in nanomedicine

研究代表者

山本 雅哉（Yamamoto, Masaya）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10332735

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）：汎用プラスチックとして、ポリエチレン（PE）、ポリプロピレン（アイソタクチック、iPP）を用いて、異なる波長、強度、パルス幅のレーザー光を照射することによって、レーザーアブレーションによるナノ粒子の生成を確認した。また、ゲノム編集により高感度に免疫応答を検出できるマクロファージ細胞株を樹立し、ポリエチレンテレフタレート（PET）マイクロプラスチックモデルの細胞傷害性ならびに免疫応答性について評価した。マイクロプラスチックの機械的特性が免疫応答に影響を及ぼすことを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微量かつサイズが小さいために自然環境からの回収が困難なナノプラスチックを、レーザーアブレーションにより実験室で調製できることを汎用プラスチックを用いて明らかにした。また、細胞を用いた様々な評価技術がある中、細胞に対して非侵襲的に高感度で免疫応答を検出できるシステムによりナノ・マイクロプラスチックの細胞傷害性を評価できるようになった。いずれも、今後のナノ・マイクロプラスチック研究への応用展開が期待でき、ヒトへの影響を含めた環境問題に対する研究進展に寄与できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Using polyethylene (PE) and polypropylene (isotactic, iPP) as conventional plastics, we confirmed the formation of nanoparticles by laser ablation by irradiating laser light of different wavelengths, intensities, and pulse widths. By genome editing, we established a macrophage cell line that can detect immune responses with high sensitivity, and evaluated the cytotoxicity and immune response to poly(ethylene terephthalate) (PET) microplastic model. We found that the mechanical property of the microplastic affected the immune response.

研究分野：生体材料学

キーワード：ナノプラスチック ナノ医薬品 腸管免疫チップ 環境問題

## 1. 研究開始当初の背景

プラスチックによる海洋汚染は、国際的に深刻な環境問題である。特に、ナノプラスチック(NP)は、マイクロプラスチック(MP)と比べて極めて小さく、その濃縮や体内での観察が困難という問題点から、未開拓な研究対象である (J. P. da Costa et al., *Sci. Total. Environ.* 2016)。さらに、NPが血管と脳との間にあるバリアを超えて魚の脳に蓄積することが報告され (K. Mattsson et al., *Sci. Rep.*, 2017)、MPにはない、ナノサイズ特有の新たな問題が認識されつつある。一方、ナノ物質が血管から漏出し、癌組織にのみ蓄積されるというナノサイズ特有の体内動態は、高い効率の癌治療を目指したナノ医薬品研究を開拓した。さらに、癌組織を模倣したモデルを体外で構築する技術が開発されつつあり、ナノ医薬品の癌組織内動態を観察可能な体外で解析する研究がまっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノ医薬品による癌治療研究で積み重ねられてきた知見を、全く異なる研究分野である環境問題 NP 研究へと展開する斬新な発想に基づき、環境科学における新しい方向性の探索に挑戦することである。この実現のため、潜在的共通点であるナノの視点を探査する。NPは、MPと比べて極めて小さく、その濃縮や体内での観察が困難という問題点から、未開拓な研究対象である。さらに、NPが血管と脳との間にあるバリアを超えて魚の脳に蓄積することが報告され、MPにはない、ナノサイズ特有の新たな問題が認識されつつある。本研究では、ナノ医薬品に対する最新の研究アプローチをNPの解析へ展開するナノの視点の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 光分解反応制御によるナノプラスチックの定量的調製

研究体制が有するナノ医薬品やレーザー光学 (Mater Stage 2018) の強みを活かし、海洋汚染で問題となる、ポリエチレン (PE) などの熱可塑性プラスチックに対して、独自の光学系を利用して様々な波長や強度のレーザー光を照射し、レーザーアブレーションによりNPを調製した。得られた種々のNPの化学構造、サイズ、表面電位などについて、赤外分光測定 (FT-IR)、動的光散乱測定 (DLS)、ゼータ電位測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察などを利用して評価した。

### (2) ゲノム編集マクロファージを用いた免疫応答評価系の検討

自然環境に放出されたプラスチックは、紫外線 (UV) による光酸化分解、微生物による生分解、物理的衝撃による機械的破壊などにより細片化されたMPとなる。このMPの特徴として、不規則な形状であること、表面が酸化されていることなどが挙げられる。そこで、光酸化分解と機械的破壊とのプロセスに着目し、UV照射および超音波 (US) 処理を組み合わせることによりMPモデルを作製し、ヒト単球系白血病細胞株 (THP-1) から誘導したマクロファージの応答について検討した。炎症性サイトカインのひとつであるIL-1 $\beta$ に化学発光タグを融合させたタンパク質を発現するようにゲノム編集したTHP-1を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 光分解反応制御によるナノプラスチックの定量的調製

Sigma-Aldrichの低密度ポリエチレン (LDPE) より、膜厚 50  $\mu\text{m}$  のフィルムを作製した。超純水を満たしたセル内に作製したLDPEフィルムを浸漬し、ナノ秒レーザー (照射波長 266 nm、パルス時間 15 ns 以下、繰り返し周波数 10 Hz、VM-TIM VM-HG-SH/FH with Q-switched YAG:Nd $^{3+}$  laser) を照射した。得られた微粒子の粒子径を、動的光散乱法 (DLS) により評価した。また、電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いて微粒子を観察した。

100–2000 d.nm の範囲における散乱強度別粒度分布を示す (Fig. 1)。レーザーの照射強度が低い場合、レーザーの照射時間が長くなるにつれて粒子径が減少した。一方、レーザーの照射強度が高い場合、レーザー照射時間が長くなるにつれて粒子径が増加した。これらの結果は、ナノ秒レーザーの熱的影響から微粒子が凝集し、粒子径が増加したことを示唆している。次に、レーザー光を 12 時間照射後に得られた微粒子の SEM 観察結果を示す (Fig.1)。レーザーアブレーションにより得られた粒子は、多様な形状および凝集していることがわかった。

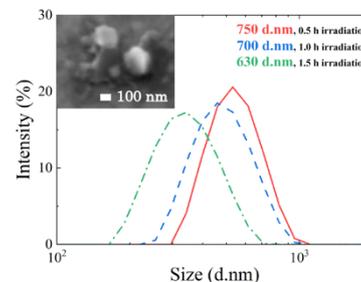


Fig. 1. DLS and SEM measurements for LDPE nanoplastics obtained by laser

(2) ゲノム編集マクロファージを用いた免疫応答評価系の検討

ポリエチレンテレフタレート (PET) をダイヤモンド研磨プレート (READ 社製) により粒子径  $12.5 \mu\text{m}$  程度に細片化した後、UV 照射 (250 W、4 時間) と US 処理 (40 kHz、20 時間) とを 1 サイクルとするプロセスを 4 回繰り返し行った。UV/US 処理した PET 細片 (UV/US g-MP) では、未処理 PET 細片 (g-MP) と比較して、粒子径が  $4.4 \mu\text{m}$  に減少したが (Fig.2)、X 線光電子分光測定では O/C 比が 39.8% から 49.0% に増加、示差走査熱量測定では結晶化度が増加 (Fig. 3a)、ナノインデンテーションでは Young 率が増加した (Fig.3b)。UV/US 処理による PET の光酸化が示唆された。

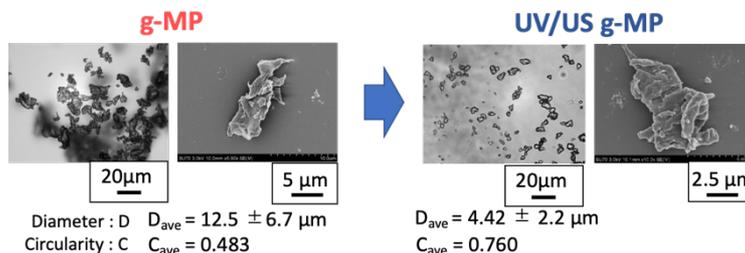


Fig. 2. Light and SEM observations for g-MP and UV/US g-MP

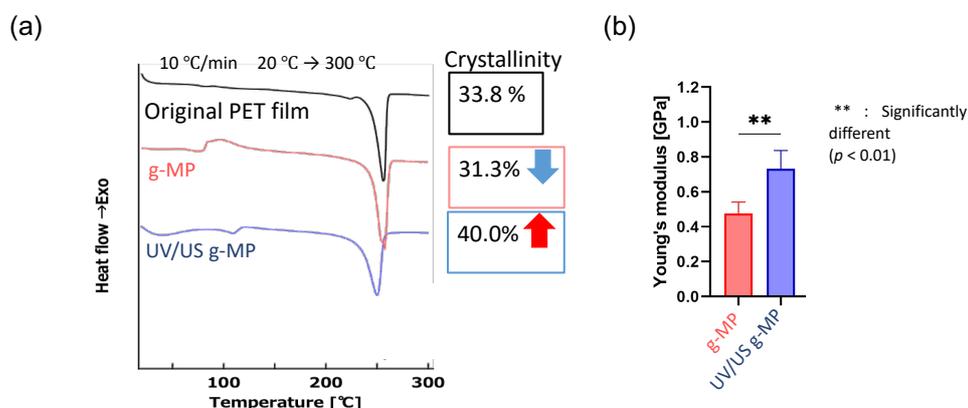


Fig. 3. DSC and AFM measurements for g-MP and UV/US g-MP  
(a) DSC and (b) AFM measurements.

次に、これらの PET 細片を THP-1 から誘導した異なる分極をもつマクロファージに対して曝露したところ、いずれの PET 細片でも添加量  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  で生細胞数が減少することがわかった (Figs. 4a, 4b)。一方、IL-1 $\beta$  の分泌量は、M1 マクロファージにおいて、UV/US treated により有意に増強された (Fig.4c)。PET 細片表面へのタンパク質吸着、PET 細片のサイズや力学的性質などがマクロファージの応答性に対し、影響を及ぼしたことが示唆された。

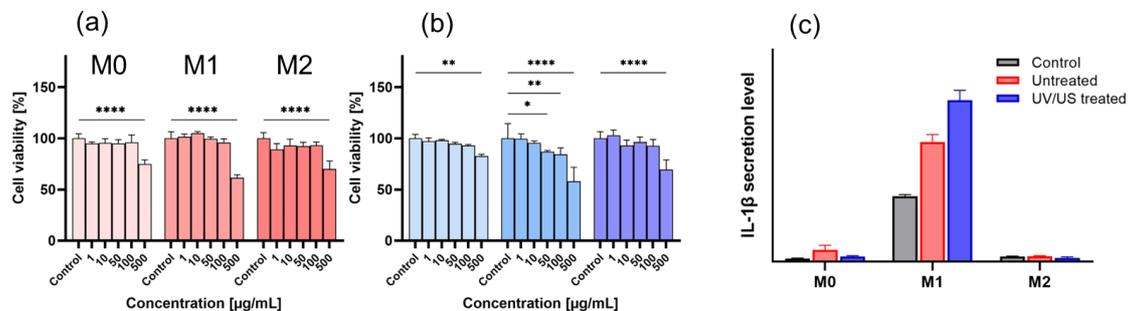


Fig. 4. Cell viability after 24 h of (a) Untreated (g-MP) and (b) UV/US treated MP (UV/US g-MP) exposure to M0, M1, and M2 macrophages. (c) IL-1 $\beta$  secretion from M0, M1, and M2 macrophages after 24 h of the MP exposure. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: significance with p values of 0.05, 0.01, 0.001, and 0.0001, respectively.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nano-sized polyethylene particles produced by nano-second UV laser ablation	4. 巻 -
2. 論文標題 Ikuna Kanehara, Hiromasa Yamashita, Sho Fujii, Tsuyoshi Kimura, Masaya Yamamoto, and Tadao Tanabe	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lasers in Manufacturing and Materials Processing	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mika Murakami, George Mogami, Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Fabrication of microplastics for evaluation of the biological effects
3. 学会等名 The 5th Symposium for The Core Research Clusters for Materials Science and Spintronics, and the 4th Symposium on International Joint Graduate Program in Materials Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上未佳、最上譲二、山本雅哉
2. 発表標題 生体影響評価のためのマイクロプラスチックの作製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上未佳、最上譲二、山本雅哉
2. 発表標題 生体影響評価のための光酸化分解によるマイクロプラスチックの作製
3. 学会等名 第4回 日本金属学会 第7分野講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suphatra Hiranphinyophat, Tomoki Hiraoka, Sho Fujii, Tadao Tanabe, Tsuyoshi Kimura, Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Fabrication of polypropylene nano-plastics via thermal-oxidative reaction for macrophage responsiveness studies
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金原生奈, 山下博正, 田邊匡生, 藤井翔, 木村剛, 山本雅哉
2. 発表標題 低密度ポリエチレンのレーザーアブレーション
3. 学会等名 日本金属学会2022年秋期講演大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Supharta Hiranphinyoohat, Tomoki Hiraoka, Sho Fujii, Tadao Tanabe, Tsuyoshi Kimura, Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Nanoplastic production of polypropylene through thermal oxidation reaction for risk assessment studies in human cells
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平岡知樹, Supharta Hiranphinyoohat, 田邊匡生, 木村剛, 山本雅哉
2. 発表標題 生体影響評価のための光劣化ポリプロピレンマイクロプラスチックの作製
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鷲平直人, Supharta Hiranphinyoohat, 平岡知樹, 田邊匡生, 木村剛, 山本雅哉
2. 発表標題 ポリエチレンナノ・マイクロプラスチックモデルの作製とその物性評価
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikuna Kanehara, Hiromasa Yamashita, Tadao Tanabe, Sho Fujii, Tsuyoshi Kimura, Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Laser ablation of low-density polyethylene
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suphatra Hiranphinyoohat, Tomoki Hiraoka, Sho Fujii, Tadao Tanabe, Tsuyoshi Kimura, and Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Effect of polypropylene nanoplastics fabricated by thermal oxidation on macrophage responsiveness
3. 学会等名 GYSS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 再生医療と医療以外のSDGsとの接点を考える
3. 学会等名 山本雅哉KRIC (関西再生医療産業コンソーシアム) フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 バイオマテリアルとSDGs
3. 学会等名 第35回代用臓器・再生医学研究会総会・日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第7回研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金原生奈、山下博正、田邊匡生、藤井翔、木村剛、山本雅哉
2. 発表標題 ナノ秒レーザーアブレーションによる低密度ポリエチレンのナノサイズの微粒子生成について
3. 学会等名 日本金属学会2023年春季(第172回)講演大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鷲平直人, Suphatra Hiranphinyophat, 田邊匡生, 木村剛, 小林真子, 山本雅哉
2. 発表標題 生体影響評価のための PE ナノ・マイクロプラスチックの作製とその評価
3. 学会等名 日本金属学会2023年春季(第172回)講演大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁枕, 萩原萌子, 橋本良秀, 松島隆英, 浅原弘嗣, 野村涉, 中村奈緒子, 山本雅哉, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 マイクロプラスチックの炎症性評価を目指したCaco-2/THP-1共培養系の確立
3. 学会等名 ライフサポート学会第32回フロンティア講演会
4. 発表年 2023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	田邊 匡生  (Tanabe Tadao)  (10333840)	芝浦工業大学・デザイン工学部・教授   (32619)	
研究 分担者	木村 剛  (Kimura Tsuyoshi)  (10393216)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授   (12602)	

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		
フィンランド	Turku University		