

「食品への混入が懸念されている環境中のマイクロプラスチックの表面性状に着目した安全性研究」

研究代表者 辻野博文 大阪大学ミュージアム・リンクス 准教授

研究要旨

海洋など様々な環境中で確認されている5 mmよりも小さなマイクロプラスチック微粒子（MP）の、ヒト健康被害が懸念され、そのリスク評価が喫緊のグローバル課題となっている。MP のリスク評価に必要なハザードや動態情報は、表面性状などの物理的性状の違いにより多様性に富んでおり、MPのリスクを理解するためには、存在様式を踏まえた解析が必要である。しかし、MPの定量的な動態解析手法は未だ標準化できていないうえ、存在様式を把握するための標準品すら無い。本研究は、環境中に放出された MP を対象に、(1) 種々条件における MP 標準品を獲得し、存在様式データベースの構築を試みる。さらに (2) ハザード解析に加え、動態解析手法の確立することで、MP の安全性に関する科学的な情報集積を行うものである。本年度は、種類、サイズ、表面性状の異なる多彩なプラスチックサンプルを作製し、そのハザード情報を収集した。また動態情報収集のための検討に加えて、毒性発現機序検討、ベクター効果の検討を実施したので、以下に詳細を報告する。

A. 研究目的

5 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) に関する研究が急速に進展しており、魚や貝などのヒトが口にする様々な海洋生物に加え、飲料水 (Koelmans et. al., 2019) や食塩 (Yang et. al., 2015) からも MP が検出されている。また、ヒトの糞便からも MP が検出されており (Liebmann et. al., 2018)、ヒトが MP を食物と一緒に摂取していることは、紛れもない事実である。

そのような背景を受けて、MP の安全性が懸念されており、2019 年には WHO から「飲用水中の MP」に関する情報が公表されている。MP の潜在的なハザードは MP の物理的性状・吸着化学物質・バイオフィームの一部としての微生物病原体の3つの形態に分けられているが、後半二つに関する懸念は低いとされている一方で、物理的ハザードに関連する毒性については情報が不十分であることが述べられている。すなわち、世界中で関心を集めている MP の有害性の有無について、特に物理的性状に着目して、MP のハザード（固有の生物活性・毒性）に加えて動態（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。

しかしながら、MP の物理的性状は非常に複雑である。これは、環境中で確認される MP には、研磨剤や洗顔剤等に含まれる人工の1次マイクロプラスチック (primary microplastics : P-MP) に加え、環境中に排出された P-MP を含むプラスチックが様々な外的要因（物理的な摩擦力や紫外線等）によって劣化・細断されることで、MP の表面が複雑に酸化された未知の2次マイクロプラスチック (secondary microplastics : S-MP) も存在することが主たる要因となっている。

そこで本研究では、S-MP (劣化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、種々条件における劣化MPの獲得し、存在様式データベースの構築を試みる。さらにハザード解析に加え、動態解析手法を確立することで、MP の安全性に関する科学的な情報集積を行うものである。

本年度は、表面性状に加えて、サイズの異なるポリエチレン・ポリスチレン・ポリプロピレン標準品を獲得した。また、ハザード情報として、表面性状、サイズの違いによる細胞障害性情報を獲

得し、基本情報を収集した。

加えて、細胞障害性発原因を追求する目的でアネキシン V/PI を用いたフローサイトメトリーを実施した。また、動態解析についてナイルレッドを用いた、細胞への取り込み評価に加えて、サイズや表面性状を反映したより詳細な動態解析を可能とするため、動態解析用の蛍光ナノプラスチックの準備を行なった。加えて、プロテインコロナ及びベクター効果に関する検討を実施した

B. 研究方法

ナノサイズのプラスチック粒子の作製について、ポリエチレンサンプルを 0.02 g 秤量して蓋つき試験管に入れ、10 mL のキシレンを加えて溶解させた。耐熱容器に 100 mL の DMSO と攪拌子を入れ、蓋つき試験管と共にホットスターラーにセットした。DMSO の温度が 110-115°C になっていることを確認し、パスツールピペットを用いてポリマー溶液を DMSO に一定速度で PE は 4.2 mL。常温水で冷やした後、ポアサイズ 0.2 mm のステンレスメッシュフィルターに通し、粗大粒子を除去した。次に、2 μ m のフィルターを用いて吸引濾過した。アセトンを加えてハンディソニックでほぐしながら吸引濾過を目詰まりがなくなるまで繰り返した。0.2 μ m のフィルターに交換し、濾液を吸引濾過した。フィルターを回収し、30 分間真空乾燥させた。次に、乾燥させたフィルターをビーカーに移し、t-ブタノールを加え、超音波振動によりフィルターから粒子を分離させた。分離した粒子を含む t-ブタノールを試験管に回収した。試験管を冷凍庫で 5 分程度冷やして凍結させ、凍結乾燥により粒子を回収した。ポリスチレン、ポリプロピレンに関しても適切な温度、滴下量にて同様に実施した。

次に、ポリエチレンサンプルのフィルター処理には吸引濾過装置を用いた。ポリエチレンサンプ

ルをアセトンで分散させ、フィルター上に滴下した。アセトンを加えた状態でハンディソニックを用いて PE を分散させ、真空を引いて吸引した。この操作を複数回繰り返した。フィルター上に残った粒子はフィルターごとビーカーに移し、真空乾燥させてサンプル瓶に回収した。フィルターを透過した PE を含むアセトン溶液は、ドラフトの中の 50°C に設定した湯浴に入れて溶媒を蒸発させた。なお、細胞障害性の測定は昨年度と同様の方法で実施した。

アネキシン V アッセイは RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ細胞株)、THP-1 細胞 (ヒト単球細胞株)、A549 (ヒト肺癌細胞株) を用いた。それぞれの濃度で劣化、未劣化 PE (いずれも 240 μ m のもの) を Carboxymethyl cellulose (CMC, 0.001%) と共にメディウムに溶解し、24 時間処置し、annexin V 及び propidium iodide にて染色した後、フローサイトメトリーにて評価した。

動態解析用のプラスチック粒子は以下の手法で作製した。50%エタノールにナイルレッドを溶解し、プラスチック粒子を添加し、50°C で 24 時間 incubate した。その後 20,000g 1min の遠心処理によりプラスチック粒子を分離し、wash ののち乾燥して、蛍光プラスチック粒子を獲得した。加えて、蛍光微粒子 Qdot をプラスチック粒子に封入することを試みた。Qdot を核としてナノ粒子作製と同様の方法で作製で、蛍光ポリエチレンナノ粒子および蛍光ポリスチレン粒子の獲得に成功した。

プロテインコロナに関する検討に関しては、劣化/非劣化ポリエチレンマイクロプラスチックサンプルを血清に加え 37°C で 1 時間 incubate したのち遠心分離によりプラスチック粒子を獲得した。

ベクター効果に関する検討に関しては、ベンゾピレンを吸着物質として使用した。化/非劣化ポリエチレンマイクロプラスチックサンプルをベンゾピレン溶液に 24 時間浸漬した。その後、溶液の HPLC 分析により残存ベンゾピレン濃度を決定し、初期ベンゾピレン濃度からプラスチック粒子へ

の吸着量を算出した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレンについてナノサイズのプラスチック粒子の作製を試みた。また、作製したナノプラスチックについてこれまでと同様の手法で表面劣化させた。作製したポリエチレンナノ粒子（未劣化/劣化）について、SEM 撮影、DLS 測定によりサイズが 200~1,000 nm 程度であること、また IR スペクトル測定により劣化前にはみられなかった O 原子由来ピークが劣化処理により出現していることが確認できた。

また、ポリエチレンナノ粒子、ポリプロピレンナノ粒子に関して、細胞障害性を確認したところ、劣化前の粒子では障害性が確認されなかったのに対して、劣化後粒子では障害性が確認された。また、ポリエチレンナノ粒子の IC₅₀ は 6.96 g/L と求められ、前年度までに獲得したポリエチレンマイクロ粒子よりも高い障害性を示すことが明らかとなった。

加えて、昨年度までに作成した劣化ポリエチレン標準品について、フィルター処理を行うことで、より小さな粒子系の劣化ポリエチレン粒子を含む画分 (<10 μ m) を得、細胞障害性の確認を行なった。その結果、分離前のバルクの結果に比べて、約 1/30 程度の IC₅₀ の低下が観察された。(図 1) 以上のことから、プラスチック粒子の細胞障害性には、表面性状に加えて、サイズも重要な因子であることが示された。

次に、細胞障害性に関して、その詳細を検討するため、ポリエチレンマイクロ粒子（粒子径 231 μ m）に対、して RAW264.7 細胞（マウスマクロファージ細胞株）、THP-1 細胞（ヒト単球細胞株）、A549（ヒト肺癌細胞株）を用い、アネキシン

V アッセイを実施した。その結果、劣化ポリエチレンマイクロ粒子による細胞死はアポトーシスによる可能性が高いことが示された。

次に、動態について検討を行なった。上記に示したようにプラスチック粒子の表面性状やサイズは、ハザードに影響を与えるため、これらの様々なパラメータを有するプラスチック粒子それぞれの動態を観察することが可能になれば、より有益な情報を得ることができる。そこで、動態解析用のプラスチック粒子の作製を試みた。作製したプラスチック粒子をナイルレッドで染色することで蛍光プラスチック粒子を獲得した。本手法では、劣化させたプラスチック粒子も表面性状を保ったまま蛍光化することが可能であった。加えて、蛍光微粒子 Qdot をプラスチック粒子に封入することを試みた。Qdot を核としてナノ粒子作製と同様の方法で作製で、蛍光ポリエチレンナノ粒子および蛍光ポリスチレン粒子の獲得に成功した。加えて、蛍光ポリエチレンナノ粒子について、劣化したサンプルを作製した。

最後にポリエチレン粒子のプロテインコロナに関する検討も実施し、血清のタンパク質と相互作用してプロテインコロナが形成することが示された。加えて、ベクター効果に関する検討も実施したところ、劣化ポリエチレンのベンゾピレンに対するベクター効果は、非劣化ポリエチレンの約 4 倍程度高いことが示され、酸素原子が導入される劣化処理により、ポリエチレン粒子自身の細胞毒性が上昇することに加えて、ベクター効果などの副次的な細胞影響もより高くなる可能性を示した。(図 2)

E. 結論

これまでの検討により、種類、サイズ、表面性状の異なる多彩なプラスチックサンプルの作製を達成した。

また、ハザード検討として、サイズや表面性状が強く細胞障害性と関連することを見出し、その作用機序の一部を明らかとした。さらに細胞障害性に強く関連するサイズや表面性状を保持したまま、動態研究を可能とする蛍光サンプルの作製に加え、動態・ハザードに強く関与するプロテインコロナ形成の可能性を見出した。加えて、表面性状の変化がベクター効果に変化する可能性を示し、粒子自身の影響に加えて、吸着した低分子などによる副次的な影響にも表面性状変化が重要であることを示した。

これまでに示した結果の一部は論文発表し、広く結果を公表している。加えて、今後得られた知見を加えて、未発表結果も順次発表を予定している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yudai Ikuno, Hirofumi Tsujino, Yuya Haga, Haruyasu Asahara, Kazuma Higashisaka, Yasuo Tsutsumi : Impact of Degradation of Polyethylene Particles on Their Cytotoxicity, *Microplastics* 2(2) 192-201, 2023年5月
2. Yasuo Tsutsumi, Hirofumi Tsujino : マイクロ・ナノプラスチックのヒト健康影響の解明に向けて, *YAKUGAKU ZASSHI* 144(2) 163-164, 2024年2月
3. Hirofumi Tsujino, Yudai Ikuno, Yuya Haga, Haruyasu Asahara, Kazuma Higashisaka, Yasuo Tsutsumi : 環境中の表面性状を模倣した劣化マイクロプラスチックの作製, *YAKUGAKU ZASSHI* 144(2) 171-175, 2024年2月
4. Yuya Haga, Sota Manabe, Hirofumi Tsujino,

Haruyasu Asahara, Kazuma Higashisaka, Yasuo Tsutsumi : 劣化したマイクロプラスチックが示す細胞毒性機序の解明, *YAKUGAKU ZASSHI* 144(2) 177-181, 2024年2月

5. Yudai Ikuno, Hirofumi Tsujino, Yuya Haga, Sota Manabe, Wakaba Idehara, Mii Hokaku, Haruyasu Asahara, Kazuma Higashisaka, Yasuo Tsutsumi: Polyethylene, whose surface has been modified by UV irradiation, induces cytotoxicity: A comparison with microplastics found in beaches. *Ecotoxicology and environmental safety* 277 116346-116346, 2024年6月

2. 学会発表

1. 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：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.，第73回日本薬学会関西支部総会・大会.，大阪，2023年10月.
2. 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：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.，第50回日本毒性学会学術年会.，横浜（神奈川），2023年6月.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

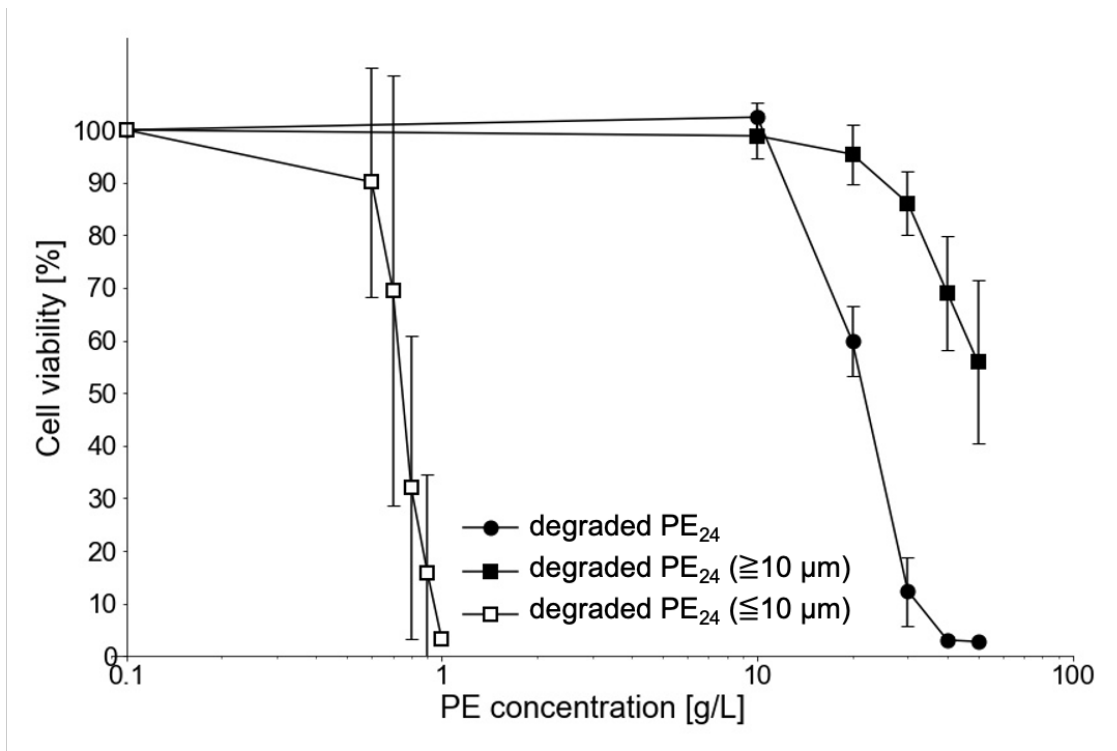
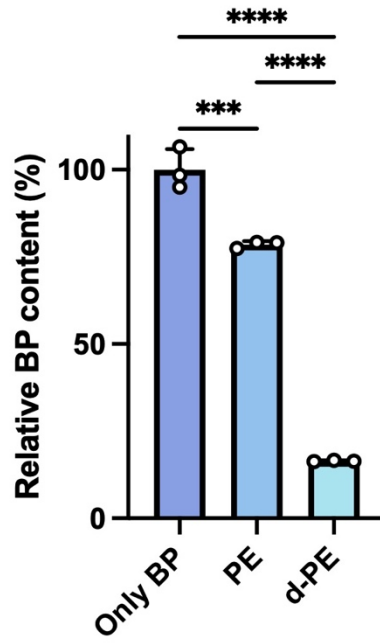


図1 フィルター処理によって得られたサイズの異なる分画の細胞障害性



****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$ by Tukey's test

図2 ベンゾピレンの残存率