

Environment Research and Technology Development Fund

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

研究用マイクロプラスチックの調整とBio-MEMS技術による免疫学的検証  
(1-1908)

令和元年度～令和3年度

Assessing the Influence of Microplastics on the Immune System with Bio-MEMS Technologies

<研究代表機関>

熊本大学

<研究分担機関>

<研究協力機関>

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

## 目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	8
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	34
IV. 英文Abstract	39

## I. 成果の概要

課題名 1-1908 研究用マイクロプラスチックの調整とBio-MEMS技術による免疫学的検証

課題代表者名 中西 義孝 (熊本大学 先端科学研究部 (工学系) 教授)

重点課題 主: 【重点課題③】 環境問題の解決に資する新たな技術シーズの発掘・活用

副: 【重点課題⑮】 大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び  
評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ (行政ニーズ) (3-5) 循環型社会形成に資する環境・経済・社会の統合的  
取組に関わる新たな評価指標体系及び経済効果等の  
評価基盤の構築

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

### 研究経費

76,516千円 (合計額)

(各年度の内訳: 令和元年度: 33,656千円、令和2年度: 32,545千円、令和3年度: 10,315千円)

### 研究体制

(サブテーマ1) 研究用マイクロプラスチックの調整とBio-MEMS技術による免疫学的検証  
(熊本大学)

他のサブテーマはない。

### 研究協力機関

研究協力機関はない。

### 本研究のキーワード

マクロファージ、免疫学、組織学、Bio-MEMS、トライボロジー

## 1. はじめに (研究背景等)

自然環境中に廃棄されたプラスチックは紫外線により劣化して脆くなり、波力などの外力もともなっ  
て微細化する。5 mm以下のサイズをマイクロプラスチック (Microplastics: MP) と呼ぶが、マイクロメ  
ートルサイズのさらに小さなMPが発生/廃棄されている。本研究では、どのような幾何学的パラメータの  
MPが生体内にどのように移行・蓄積するかを検証するとともに、生体内に移行・蓄積したMPが免疫にど  
のような影響を及ぼすのかを調査した。

## 2. 研究開発目的

本研究は3つの実施項目で構成した。

実施項目1「生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査」では、研究用マイクロプラスチック (Microplastics: MP) を節足動物および脊椎動物に曝露し、どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを調査した。

実施項目2「マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査」では、MPをヒト末梢血由来単球マクロファージ (Human Monocyte-Derived Macrophage: HMDM) に曝露し、どのような幾何学的パラメータのMPがどのように免疫系に影響を及ぼすかを調査した。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、バイオ微小電気機械システム (Micro Electro Mechanical Systems: Bio-MEMS) 技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用した。

実施項目3「マイクロプラスチックの調整」では、ポリスチレン (Polystyrene: PS)、ポリエチレン (Polyethylene: PE)、ポリ塩化ビニル (Polyvinyl chloride: PVC)、ポリエチレンテレフタレート (Polyethylene terephthalate: PET)、ポリプロピレン (Polypropylene: PP) のような利用量の多いプラスチック素材を、自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整した。調整した研究用MPを実施項目1と実施項目2の研究に活用し、よりの確な成果を得る体制を整えた。

## 3. 研究目標

全体目標	<p>節足動物2種以上、魚類1種以上、ほ乳類1種以上の生体に、材質4種以上と幾何学的パラメータ (粒子径、アスペクト比、ポーラス比) を調整した研究用マイクロプラスチックを曝露する。どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを明らかにする (実施項目1)。</p> <p>マイクロプラスチックが免疫に与える影響をヒト末梢血由来単球マクロファージにより明らかにする。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、バイオ微小電気機械システム (Bio-MEMS: Micro Electro Mechanical Systems) 技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用する。ヒト免疫に影響を与えるマイクロプラスチックの素材、幾何学的パラメータおよび濃度を明らかにする (実施項目2)。</p> <p>ポリスチレン (PS)、ポリエチレン (PE)、ポリ塩化ビニル (PVC)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリプロピレン (PP) のような利用量の多いプラスチック4種以上の素材に対して、研究用マイクロプラスチックとして調整・生産したものを実施項目1～2に活用できる体制を整える (実施項目3)。</p>
------	--



## 4. 研究開発内容

### 実施項目1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査

節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）、魚類（ヒメダカ）およびほ乳類（C57BL6マウス：潰瘍性大腸炎モデルを含む）へのMP曝露試験を実施した。節足動物および魚類に対しては飼育水へのMP混入、ほ乳類については経口でのMP投与を行った。曝露後の組織断片に対して偏光顕微鏡/倒立蛍光顕微鏡観察を行い、画像分析によりMPがどのように生体組織へ移行・蓄積されるかを調査した。

### 実施項目2：マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査

門番の役割を果たし免疫反応を制御するHMDMは20 $\mu$ m程度の比較的大きな細胞で、体内の組織に広く分布している。体内に侵入した異物を貪食し、それらの排除をより効果的に行うためにサイトカインを産生する。HMDMのMP貪食作用解明のために、経時的な動態観察が可能な培養環境とMP投与量が厳密に管理できる試験培養環境を追求した。一般的に利用されているウェルプレートによる細胞培養法のほか、BioMEMS技術を取り入れ、曝露するMPのほぼ全量がHMDM近傍を通過し、貪食可能な環境が実現できる各種マイクロ細胞培養デバイス（マイクロ流路型細胞培養デバイス、マイクロチャンバー型細胞培養デバイス、A11ガラス製マイクロチャンバー）の開発と運用を行った。ヒト免疫に影響を与えるMP素材、幾何学的パラメータおよび濃度を調査した。

### 実施項目3：マイクロプラスチックの調整

結果の“見える化”を容易にするための研究用MPとして、PS製蛍光微細粒子をベースとした研究用MPを準備した。た、PE、PVC、PET、PPのような利用量の多いプラスチック素材を、自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整できる研究用MP調整システムの開発と運用を行った。研究用MP調整システムにて得られたMPの等価円直径（D）、アスペクト比（R）、周囲長（L）、複雑度（ $=L/D$ ）を求め、実施項目1と実施項目2の研究に活用し、よりの確な成果を得る体制を整えた。

## 5. 研究成果

### 5-1. 成果の概要

サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPが消化器官内など環境と接する器官に移行することが確認できた。また、生体組織にMPが移行・蓄積する現象も観察された。この原因として腸管壁の炎症などによりMPが脈管系によって移行するためと考えられた。

さまざまな幾何学的パラメータのMPをHMDMは貪食することが確認された。MPを貪食したHMDMは炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を発現させる可能性が示された。炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例すること、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPの貪食で産生が顕在化すること、MP素材の違いにより産生量が異なることが明らかとなった。

PS、PE、PVC、PET、PPのような利用量の多いプラスチック素材を、自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整した。研究用MPはMP曝露研究に供され、よりの確なMP関連研究成果を得る体制が整えられた。

MPの微細化メカニズムの考察と生体・細胞への曝露試験により、現在廃棄されているプラスチック、ならびに将来的なエコフレンドリープラスチックのあり方についての考察を行うことができた。

## 5-2. 環境政策等への貢献

### <行政等が既に活用した成果>

該当なし

### <行政等が活用することが見込まれる成果>

プラスチックゴミおよび5mm以下のマイクロプラスチックでも肉眼で確認できるレベルのものであれば、その影響が視覚的にとらえられやすく、環境政策に対する根拠として利用しやすい。また、マイクロプラスチックと有害化学物質の影響についても、さまざまな研究者のこれまでの努力により、環境政策に対する根拠として広く周知されることとなっている。

本研究では、環境中に投棄されたプラスチックの微細化が、真の意味での“マイクロ”プラスチックを生み出しており、これが環境にさらなる影響を与えるファクターとなることを端的に例示出来ないかと考えた。投棄されたプラスチックの微細化の進行は、安易に考えればプラスチックが物質的に環境から分解・消失する過程と考えられてしまうかもしれないが、微細化する過程で生体組織内に移行・蓄積されやすいサイズとなる可能性があることや、幾何学的な粒子として免疫系にまで影響を与える可能性があることを“見える化”や“分かりやすい結果”として公開できた。この公開成果は、廃棄プラスチックや使い捨てプラスチックの利用制限の数値目標策定などを強力に支援できる資料となると期待している。

ヒトや生物に起こりうる影響の未来予測においては、低環境負荷・高効率でありながらも的確な結果が得られる手法が求められる。環境研究において環境に影響を与えるプロトコルは望ましくないと考えている。本研究はBio-MEMS技術を活用し、閉鎖・管理された研究設備内の実施できる内容となっていた。本研究手法の確立は、大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化および評価・解明にも大きく貢献できると考えている。特に、研究用MP調整システムより得られる研究用MPは素材や幾何学的パラメータが明確であり、すでに有用性が認められ、複数の他研究機関への供給が始まっている。研究用MPとして規格化し、国際的な環境研究への取組に活用できる可能性がある。

## 5-3. 研究目標の達成状況

<p>全体目標の達成状況</p>	<p><u>実施項目1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査</u></p> <p><b>【目標の達成状況】</b> 目標どおりの成果をあげた。</p> <p><b>【判断に至った理由】</b> 節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）、魚類（ヒメダカ）ならびにほ乳類（C57BL6マウス）へのMP曝露研究を実施できた。PS、PE、PP、PVCならびにPET製の研究用MPを調整し、生体に曝露することができた。これら研究用MPの幾何学的パラメータ（等価円直径、アスペクト比、周囲長、複雑度）を解析し、曝露実験に供することができた。 サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPがさまざまな組織に移行・蓄積することは確認できたが、アスペクト比や複雑度に対する影響は継続した研究が必要となった。</p>
------------------	--

**実施項目 2：マクロファージによる食食とその影響の免疫学的調査****【目標の達成状況】**

目標どおりの成果をあげた。

**【判断に至った理由】**

生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけ、かつ定量的・経時的な分析が可能な培養システム（マイクロ流路型細胞培養デバイス、マイクロチャンバー型細胞培養デバイス、A11ガラス製マイクロチャンバー）を開発・運用した。

HMDMはさまざまな幾何学的パラメータのMPを食食することが確認された。MPを食食したHMDMは炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を発現させる可能性が示された。炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例すること、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPの食食で産生が顕在化すること、MP素材の違いにより産生量が異なることが明らかとなった。より定量的・経時的な結果をえるためには、継続した研究が必要となった。

**実施項目 3：マイクロプラスチックの調整****【目標の達成状況】**

目標を上回る成果を上げた。

**【判断に至った理由】**

結果の“見える化”を容易にするための研究用MPとしてPS製蛍光MPの準備が整い、曝露研究に供することができた。PE、PP、PVCおよびPET素材を自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整することができる装置の開発と運用、ならびに実施項目 1—2 の研究に活用され、よりの確な研究成果を得る体制が整えられた。

当該研究用MPの他研究機関への供給も始まった。また、実施項目 3 によるMPの微細化メカニズムの考察と実施項目 1—2 の考察結果より、現在廃棄されているプラスチック、ならびに将来的なエコフレンドリープラスチックのあり方についての考察を行うことができた。

**6. 研究成果の発表状況****6-1. 査読付き論文**

<件数>

5件

<主な査読付き論文>

- 1) Yoshitaka Nakanishi, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Nana Motojima, Haruki Miyamoto, Hajime Yamaguchi, Masaaki Morita, Kazuma Shibata, Yoshihiro Komohara, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, Hidehiko Higaki: Biotribology 23(2020)100137 (h-index:13) Microfluidic device used for the secretion of inflammatory cytokines from human monocyte-derived macrophages stimulated by ultra-high molecular weight

polyethylene particles.

- 2) Yoshitaka Nakanishi, Yuta Nakashima, Emile van der Heide: Precision Engineering 67(2021)172-177(IF:3.156) Microstructuring glass surfaces using a combined masking and microslurry-jet machining process.
- 3) Hajime Yamaguchi, Koshi Sakata, Keiji Kasamura, Yuta Nakashima, Yoshitaka Nakanishi: Frontiers in Mechanical Engineering 7(2021)631093 (h-index:7) Texturing of Glass Surface using Micro-Slurry Jet Machining Process.
- 4) Haruki Miyamoto, Katsunori Higuchi, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Yoshihiro Komohara, Yoshitaka Nakanishi: Frontiers in Mechanical Engineering 7 (2021) 631128 (h-index:7) Culture system for a closer biological contact between macrophages and microparticles.
- 5) Yoshitaka Nakanishi, Hajime Yamaguchi, Yusuke Hirata, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara: Wear 477 (2021) 203816 (IF:3.892) Micro-abrasive glass surface for producing microplastics for biological tests.

## 6-2. 知的財産権

該当なし

## 6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	4件
口頭発表（学会等）	43件
「国民との科学・技術対話」の実施	8件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	3件

## 7. 国際共同研究等の状況

- 1) Investigation regarding Multiscale Bio-Inspired Surface（実施項目3：マイクロプラスチックの調整）、Emile van der Heide教授・University of Twente・オランダ王国、国際共同研究（部局間学術交流協定済み）、実施項目3でマイクロおろし金の加工精度に関する共同研究を実施
- 2) Investigation regarding Multiscale Bio-Inspired Surface（実施項目3：マイクロプラスチックの調整）、Xiangqiong ZENG教授・Chinese Academy of Sciences・中華人民共和国、国際共同研究（機関間MOU締結済み）、実施項目3でマイクロおろし金の加工液に関する共同研究を実施
- 3) Investigation regarding Multiscale Bio-Inspired Surface（実施項目3：マイクロプラスチックの調整）、Ling YIN准教授・The University of Adelaide・オーストラリア、国際共同研究、実施項目3でマイクロおろし金の素材となる脆性材料の加工に関する共同研究を実施
- 4) MEMSデバイス改質（実施項目2：マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査）、Douglas A. Coulter教授およびHajime Takano教授・University of Pennsylvania・アメリカ合衆国、国際共同研究、実施項目2で高精度のBio-MEMSデバイス開発に関する共同研究を実施

## 8. 研究者略歴

### 研究代表者

中西 義孝

九州大学工学部卒業、九州大学大学院工学研究科機械工学専攻博士前期課程修了、九州大学大学院工学研究科機械工学専攻博士後期課程修了、博士（工学）、九州大学工学部助手、大分大学工学部講師、九州産業大学工学部助教授、九州大学デジタルメディスン・イニシアティブ教授、現在、熊本大学大学院先端科学研究部（工学系）教授

### 研究分担者

#### 1) 中島 雄太

広島工業大学工学部卒業、九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻博士前期課程修了、九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻博士後期課程修了、博士（工学）、九州工業大学大学院生命体工学研究科博士研究員、山口大学大学院医学系研究科助教、山口大学大学院理工学研究科助教、熊本大学大学院自然科学研究科助教、現在、熊本大学大学院先端科学研究部准教授

#### 2) 藤原 章雄

熊本大学薬学部薬科学科卒業、熊本大学大学院医学薬学研究部（薬学系）博士前期課程修了、熊本大学大学院医学薬学研究部（薬学系）博士後期課程修了、博士（薬学）、熊本大学大学院医学薬学研究部（医学系）助教、熊本大学大学院生命科学研究部（医学教育部）助教（改組）、現在、熊本大学大学院生命科学研究部（医学教育部）講師

## II. 成果の詳細

### 研究用マイクロプラスチックの調整とBio-MEMS技術による免疫学的検証

#### 研究体制

① 熊本大学 先端科学研究部（工学系）	中西義孝	教授	リーダー
② 熊本大学 先端科学研究部（工学系）	中島雄太	准教授	研究分担者
③ 熊本大学 生命科学研究部（基礎系）	藤原章雄	講師	研究分担者

#### [要旨]

自然環境中に廃棄されたプラスチックは紫外線により劣化して脆くなり、波力などの外力もともなって微細化する。5 mm以下のサイズをマイクロプラスチック（Microplastics: MP）と呼ぶが、マイクロメートルサイズのさらに小さなMPが発生/廃棄されている。本研究では、MPの幾何学的パラメータ（等価円直径、アスペクト比、複雑度など）に焦点を当てた。どのような幾何学的パラメータのMPが生体内にどのように移行・蓄積するかを検証するとともに、生体内に移行・蓄積したMPが免疫にどのような影響を及ぼすのかを調査した。

実施項目1として、節足動物および脊椎動物にマイクロメートルサイズのMPを曝露する研究を実施した。サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPが消化器官内など環境と接する器官に移行することが確認できた。また、生体組織にMPが移行・蓄積する現象も観察された。この原因として腸管壁の炎症などによりMPが脈管系によって移行するためと考えられた。

実施項目2として、体内に移行・蓄積されたマイクロメートルサイズのMPが免疫にどのような影響を与えるかを調査した。ヒト末梢血由来単球マクロファージ（Human Monocyte-Derived Macrophage: HMDM）はさまざまな幾何学的パラメータのMPを貪食することが確認された。MPを貪食したHMDMは炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を発現させる可能性が示された。炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例すること、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPの貪食で産生が顕在化すること、MP素材の違いにより産生量が異なることが明らかとなった。

実施項目3として、ポリスチレン（Polystyrene: PS）、ポリエチレン（Polyethylene: PE）、ポリ塩化ビニル（Polyvinyl chloride: PVC）、ポリエチレンテレフタレート（Polyethylene terephthalate: PET）、ポリプロピレン（Polypropylene: PP）のような利用量の多いプラスチック素材を、自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整した。調整した研究用MPは実施項目1-2の研究に活用され、よりの確な研究成果を得る体制が整えられた。

実施項目3によるMPの微細化メカニズムの考察と実施項目1-2の考察結果より、現在廃棄されているプラスチック、ならびに将来的なエコフレンドリープラスチックのあり方についての考察を行うことができた。

## 1. 研究開発目的

本研究は3つの実施項目で構成される（図1.1）。

### 実施項目1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査

研究用MPを節足動物および脊椎動物に曝露し、どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを調査する。

### 実施項目2：マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査

MPをHMDMに曝露し、どのような幾何学的パラメータのMPがどのように免疫系に影響を及ぼすかを調査する。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、バイオ微小電気機械システム（Micro Electro Mechanical Systems: Bio-MEMS）技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用する。

### 実施項目3：マイクロプラスチックの調整

PS、PE、PVC、PET、PPのような利用量の多いプラスチック素材を、自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整する。調整した研究用MPを実施項目1と実施項目2の研究に活用し、よりの確な成果を得る体制を整える。

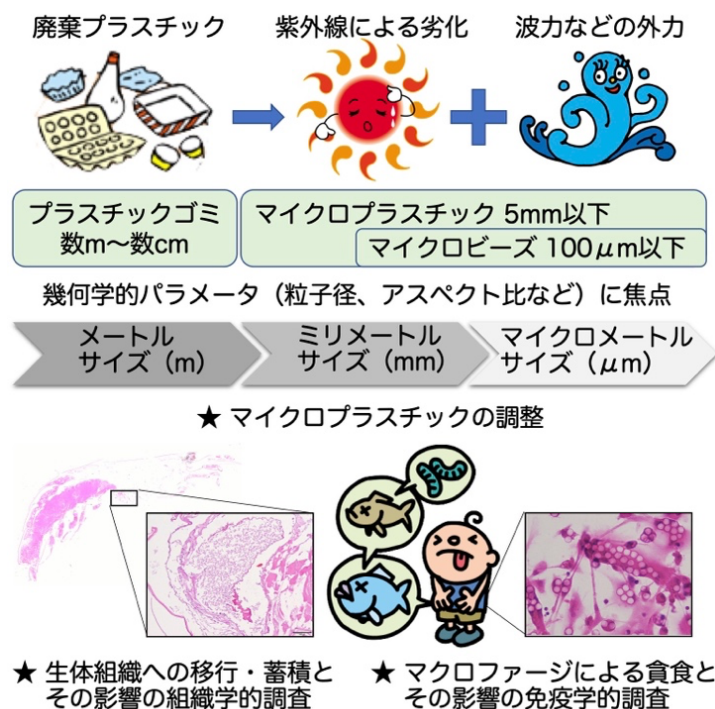


図1.1 研究開発目的



## 2. 研究目標

全体目標として3つの実施項目別に設定を行った（図1.2）。

全体目標	<p>節足動物2種以上、魚類1種以上、ほ乳類1種以上の生体に、材質4種以上と幾何学的パラメータ（粒子径、アスペクト比、ポーラス比）を調整した研究用マイクロプラスチックを曝露する。どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを明らかにする（実施項目1）。</p> <p>マイクロプラスチックが免疫に与える影響をヒト末梢血由来単球マクロファージにより明らかにする。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、バイオ微小電気機械システム（Bio-MEMS: Micro Electro Mechanical Systems）技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用する。ヒト免疫に影響を与えるマイクロプラスチックの素材、幾何学的パラメータおよび濃度を明らかにする（実施項目2）。</p> <p>ポリスチレン（PS）、ポリエチレン（PE）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリプロピレン（PP）のような利用量の多いプラスチック4種以上の素材に対して、研究用マイクロプラスチックとして調整・生産したものを実施項目1～2に活用できる体制を整える（実施項目3）。</p>
------	---

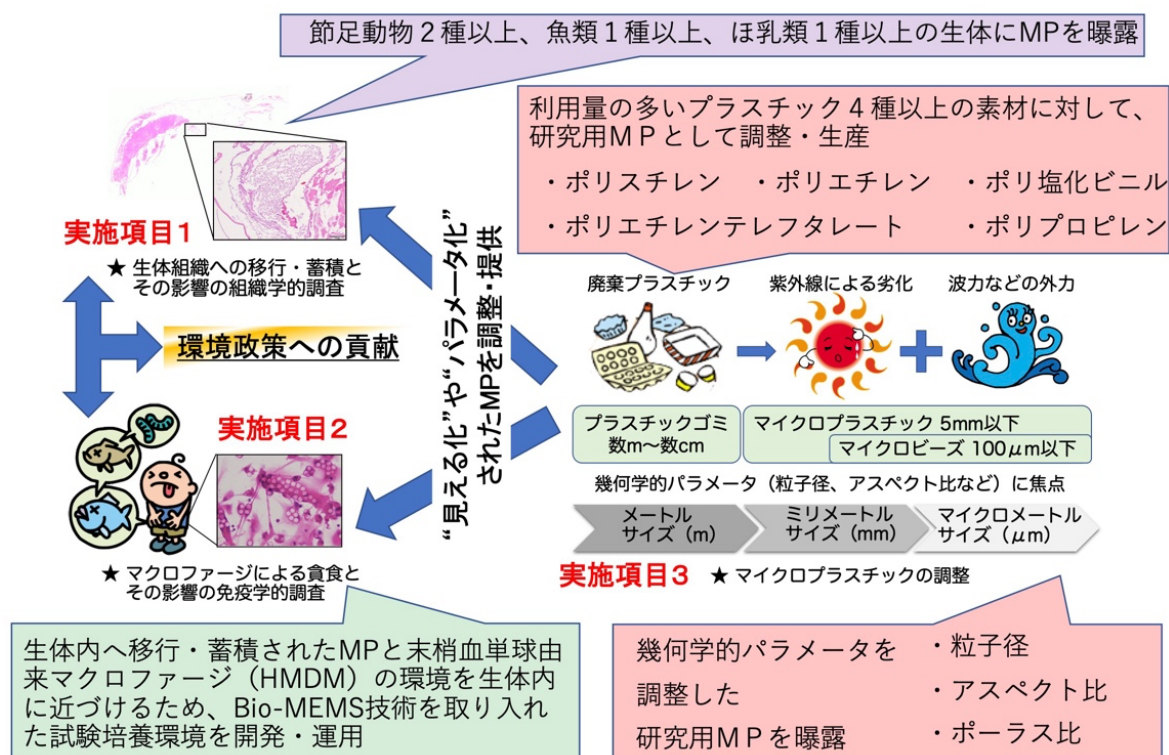


図1.2 研究目標



### 3. 研究開発内容

#### 実施項目1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査

調整したMPを節足動物および魚類に急性曝露する方法を図1.3に示す。曝露対象生物として節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）ならびに魚類（ヒメダカ）を選定した。コントロール群（MP曝露なし）を比較として準備した。1生体/飼育容器とし、飼育水を100mlとした。一連の曝露はクリーンベンチ(MCV-710ATS, SANYO)内で実施した。生体内の停留物などを排出させる目的から、48時間無給餌で飼育した。その後、MPを混入させた飼育水（ $1.0 \times 10^8$ 個/100ml）に移し替え、さらに72時間無給餌で飼育した。

飼育後、10%中性緩衝ホルマリン溶液（10% Formalin Neutral Buffer Solution, Wako）で生体組織を固定した。生体組織はHE染色後、密閉式自動固定包埋装置（Tissue-Tek™ VIP Jr., SAKURA）およびパラフィン包埋ブロック作製装置（Tissue-Tek™ TEC 6, SAKURA）によりパラフィン包埋を行った。滑走式マイクロトーム（SM2000R, LEICA）にて組織切片にした。組織断片は偏光顕微鏡（BX51, OLYMPUS）および倒立蛍光顕微鏡により画像観察を行った。観察画像は画像処理/再構築ソフト（ImageJ-MosaicJまたはWinROOF2019・MagicalFine, 三谷商事）にて処理し、MPがどのように生体組織へ移行・蓄積されるかを調査した。

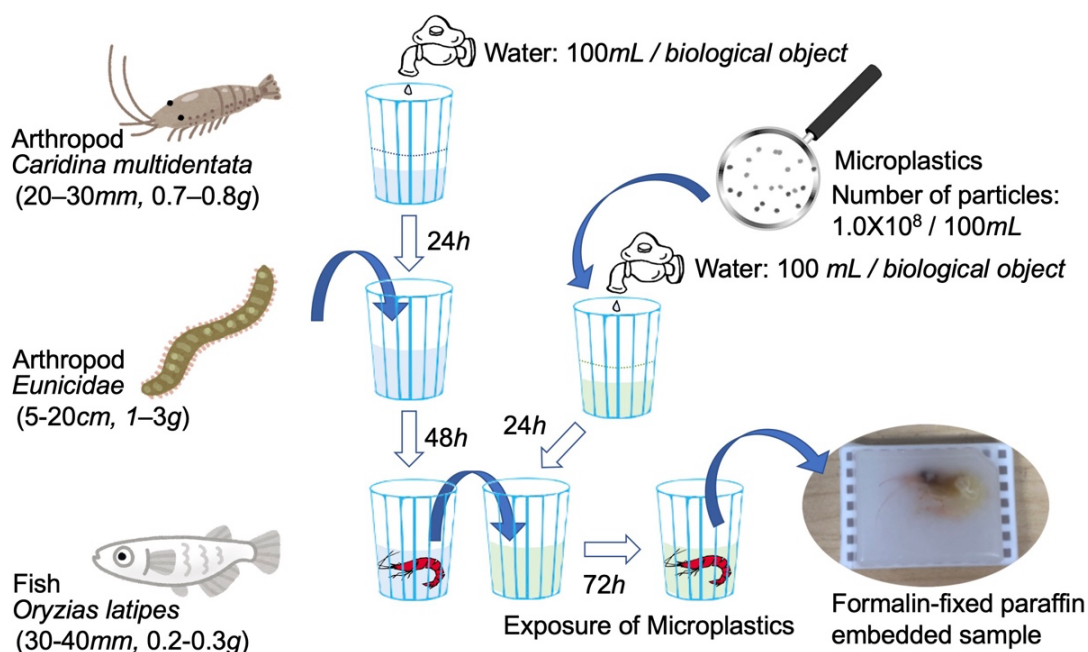


図1.3 MPを節足動物および魚類に急性曝露する方法

調整したMPを哺乳類に急性曝露する方法を図1.4に示す。対象生体としてC57BL6マウスを選定した。潰瘍性大腸炎モデルへの曝露も行った。MPは経口投与とした ( $1.0 \times 10^8$ 個)。経口投与48時間後の組織への移行・蓄積を調査した。

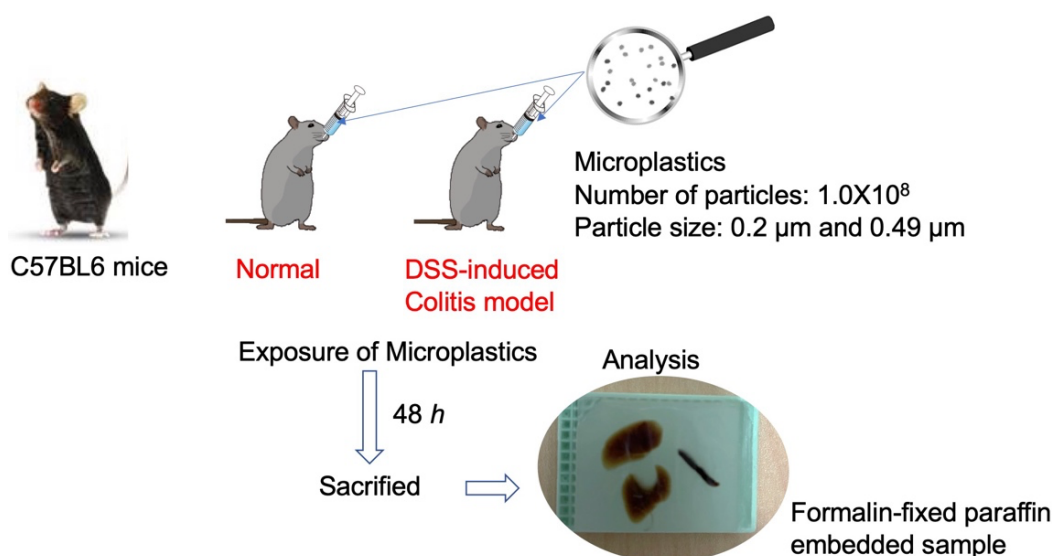


図 1.4 MPを哺乳類に急性曝露する方法

## 実施項目 2 : マクロファージによる食食とその影響の免疫学的調査

門番の役割を果たし免疫反応を制御するHMDMは $20 \mu\text{m}$ 程度の比較的大きな細胞で、体内の組織に広く分布している。体内に侵入した異物を食食し、それらの排除をより効果的に行うためにサイトカインを産生する。HMDMによるMPの食食作用解明のためには、経時的な動態観察が可能な培養環境とMP投与量が厳密に管理できる試験培養環境が必要である。そこで本研究では一般的に利用されているウェルプレートによる細胞培養法のほか、Bio-MEMS技術を取り入れ、曝露するMPのほぼ全量がHMDM近傍を通過し、食食可能な環境が実現できる各種マイクロ細胞培養デバイスの開発と運用を行った。

マイクロ流路型細胞培養デバイスの設計・製作工程を図1.5に示す。曝露するMPのほぼ全量がマクロファージ近傍を通過し、サイトカイン産生量などの経時変化を捉えやすくするために、 $200 \times 500 \mu\text{m}$ の断面を有するマイクロ流路構造とした。メタノール、アセトン、超純水、ならびにピラニア溶液によって表面汚染層を除去したガラス表面にフォトレジスト (SU-8 3050, KAYAKU MICROCHEM) を塗布・プリベーク (溶媒蒸発) した。フォトマスクを介して露光 (紫外線照射) を行い、パターン転写 (樹脂硬化) を行った。酢酸2-メトキシ-1-メチルエチル (2-Methoxy-1-methylethyl Acetate, WAKO) にて現像 (未感光部分の除去) を実施し、ポストベークにより熱架橋でガラス面との密着性を向上させた。作成した鋳型にポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS, ShinEtsu) を流し込み、加熱硬化させた。加熱硬化したPDMSパターンとガラス基板に密着させ、マイクロ流路デバイスを完成させた。

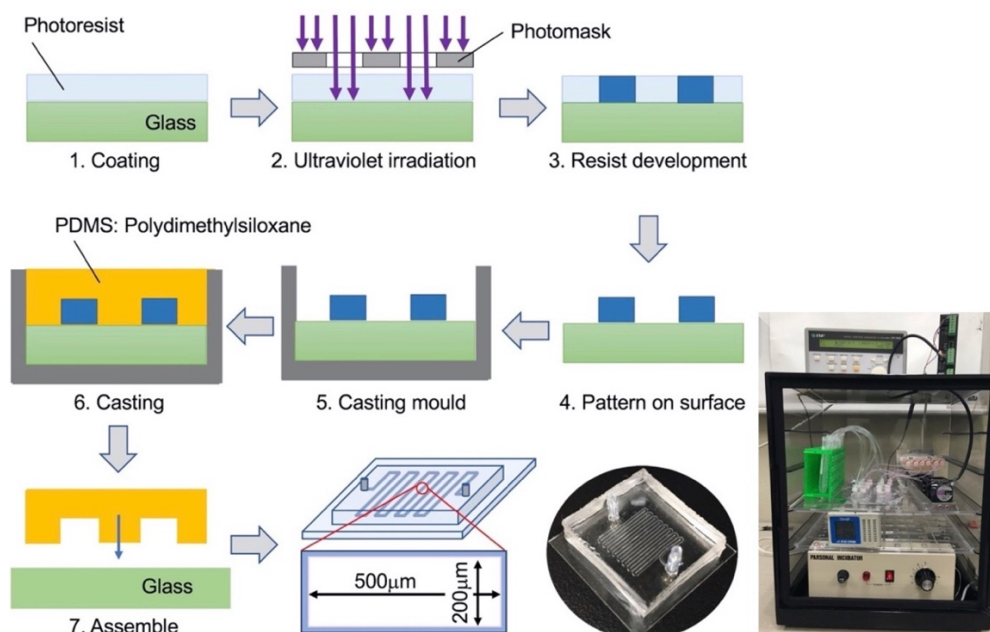


図 1.5 マイクロ流路型細胞培養デバイスの設計・製作工程

マイクロ流路型細胞培養デバイスを用いたMP研究方法を図1.6に示す。流路内に播種する細胞としてHMDMを選択した。HMDMは健康成人より書面でのインフォームドコンセントを得て準備した。培養液はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Wako) に2.0%のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS, CAPRICORN) と1.0%のペニシリン (Penicillin, Wako) を添加したものとした。流路デバイス内をエタノール、超純水、および培養液の順で洗浄した。HMDMを導入した培養液を流路デバイス内に送液した。デバイスを培養液に浸漬し、37° で48時間培養を行った。マイクロ流路デバイスにマイクロシリンジポンプシステムを接続し、試験用MPを導入した培養液を0.25ml/hで4時間送液 (総送液量: 1.0 ml) した。送液前後のマイクロ流路デバイス内のHMDMの状態を顕微鏡にて観察したほか、送液した培地を回収し、ELISA法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) により炎症性サイトカインの産生量を調査した。TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) にはELISA kit (88-7346-88, eBioscience)を、IL-6 (Interleukin-6) にはELISA kit (88-7066-22, eBioscience)をそれぞれ利用した。

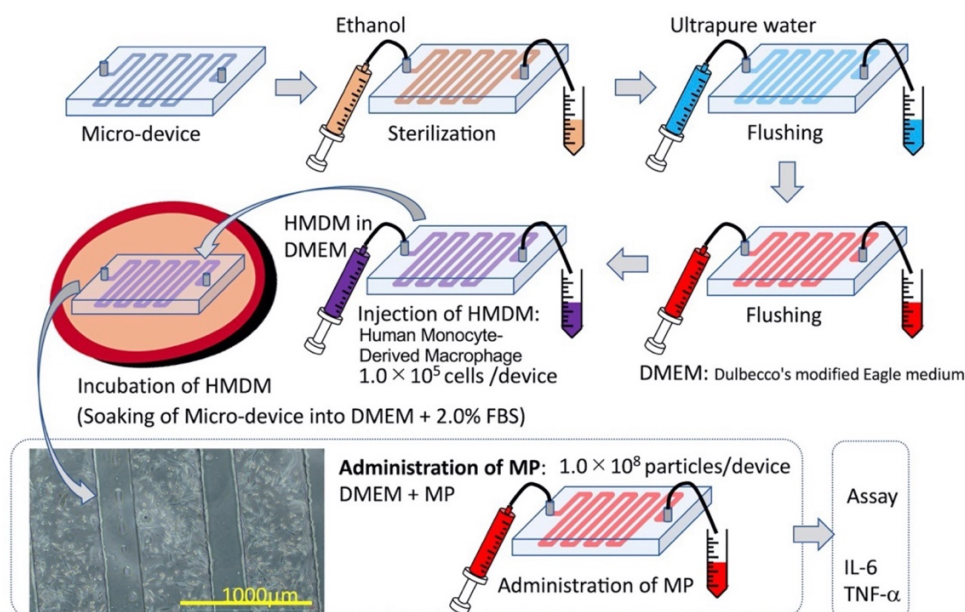


図 1.6 マイクロ流路型細胞培養デバイスを用いたMP研究方法

一般的に利用されているウェルプレートに基づきマイクロチャンバー型細胞培養デバイスを構築した例を図1.7に示す。ウェルプレートの底面にレベルリングパッドとカルチャーチューブを設置した。プレート底面にHMDMを播種した。24時間CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養・定着させた後、カルチャーチューブをチャンバーパーツに入れ替え、マイクロチャンバー型細胞培養デバイスを構築した。通常の細胞培養操作に近い環境でレベルリングパッド厚調整による最適培養空間の調査研究ができるなど、柔軟性のあるマイクロデバイスとなった。チャンバーパーツ上部の空間にMPを混合した培地を注入した。チャンバーパーツ内の細管は吸引装置へと接続されており、これによりMPが培地とともにHMDMに投与されるようにした。

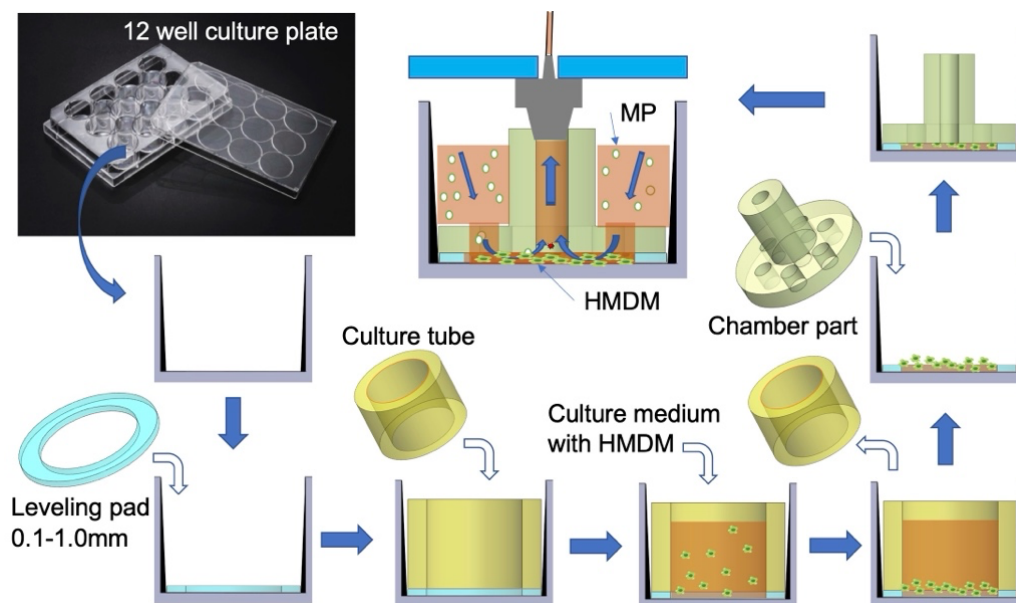


図1.7 マイクロチャンバー型細胞培養デバイスの設計・組立工程

マイクロチャンバー型細胞培養デバイスを用いたMP研究方法を図1.8に示す。チャンバーパーツ上部に注入したMPが培地中で常時分散された状態となるようロータリーシェイカにて攪拌を行った。デバイスはマイクロシリンジポンプに接続され、培地は一定速度で吸引・回収した。これらのシステムはすべてCO<sub>2</sub>インキュベータ内部に格納した。MPならびにリポ多糖 (LPS) の連続投与・細胞培養時間を24時間とした。吸引・回収した培地に含まれる炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の産生量をSandwich ELISA 法を用い測定した。

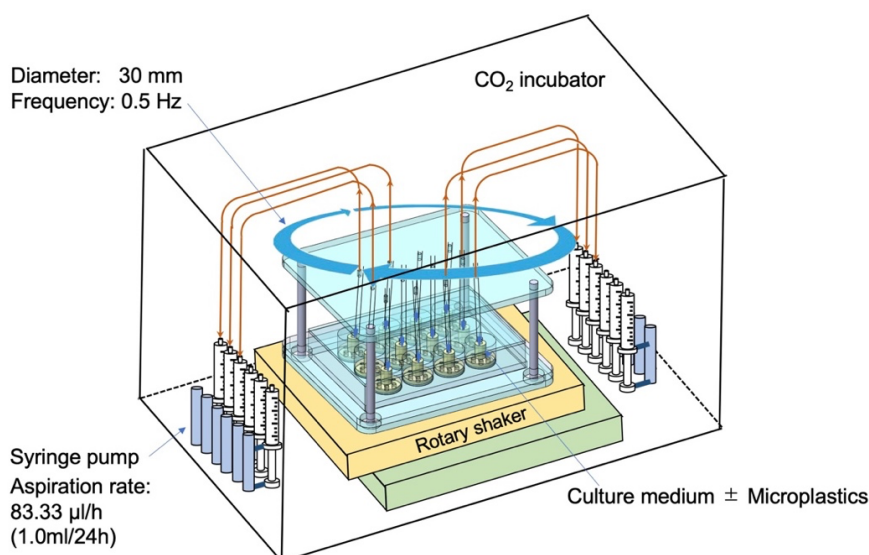


図1.8 マイクロチャンバー型細胞培養デバイスを用いたMP研究方法



図1.7のマイクロチャンバー型細胞培養デバイスによる研究にて、MPとHMDMの最適培養空間が明らかになったものから、A11ガラス製マイクロチャンバーを用いたMP研究へ移行した（図1.9）。A11ガラス製にすることで、洗浄・滅菌により再利用が可能な（ディスポーザブル品の削減につながる）MP研究環境への移行することができた。

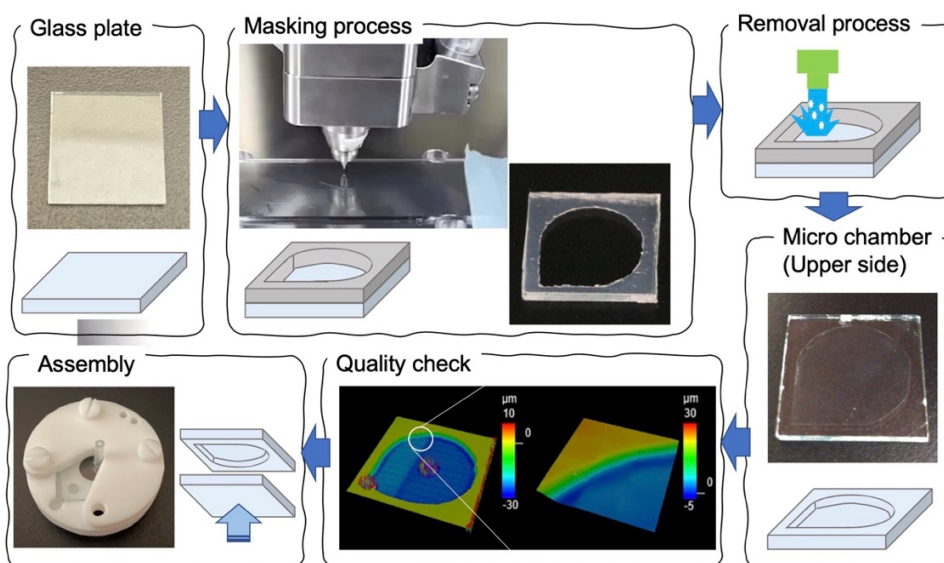


図 1.9 A11ガラス製マイクロチャンバーの設計・組立工程

図1.9にA11ガラス製マイクロチャンバーの設計・組立工程を示す。素材となるガラス板の加工にはマスキング材料を直接塗布する技術と、マスキング部とガラス曝露部を同時に機械的に除去する技術を組み合わせたものを適用した。ガラスのような脆性材料でもマイクロ・ナノ加工が可能で、透明度も維持できる機械的除去加工法を採用した。そのためHMDMの大きさよりわずかに大きい程度の天井高を有するマイクロチャンバーも実現することができた。所定のチャンバー形状に加工した後、別のガラス平面と圧着させることによりマイクロチャンバーを構成した。

図 1.10にA11ガラス製マイクロチャンバーを用いたMP研究方法を示す。チャンバー内にMPを混入させた培地を吸引・循環させることで、投与したMPのほぼ全量がマクロファージ近傍を通過し、食食可能な環境が実現できた。

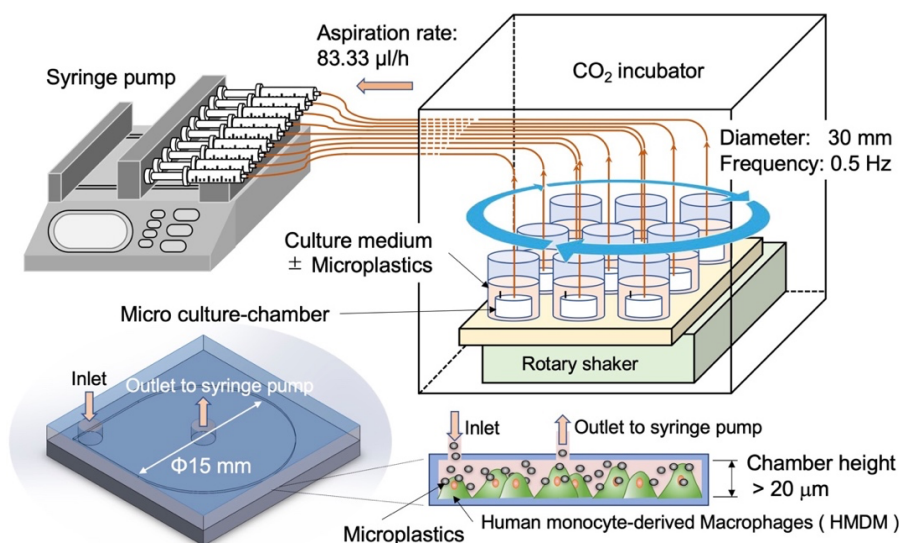


図 1.10 A11ガラス製マイクロチャンバーを用いたMP研究方法

### 実施項目 3 : マイクロプラスチックの調整

結果の“見える化”を容易にするための研究用MPとして、PS製蛍光微細粒子 (Polymer Microspheres, Blue Fluorescent, Fluoro-Max™, Thermo Scientific) をベースとした研究用MPを準備した。PS製MPの表面調整方法を図1.11に示す。MP分散水溶液の影響を僅少にするため、超純水による超音波洗浄を2回実施した。超音波洗浄にはサンプル密閉式超音波破碎装置 (UCD-250, Bioruptor) を、MPの回収には超遠心機 (Optima™ MAX-UP Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER) を利用した。各粒子径のPS製MPの表面性状を調整し、粒子径 (幾何学的パラメータ) のみの評価にする目的から、界面活性剤 (Tween 80, Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate, TCI Chemicals) をMP表面に再吸着させた。

調整前後のMP状態を観察するため、走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM, JSM-6390LV, 日本電子)、倒立蛍光顕微鏡 (Fluorescence microscope, TS2-FL, Nikon) ならびにレーザ回折式粒子径分布測定装置 (SALD-2300, SHIMAZU) による分析を実施した。

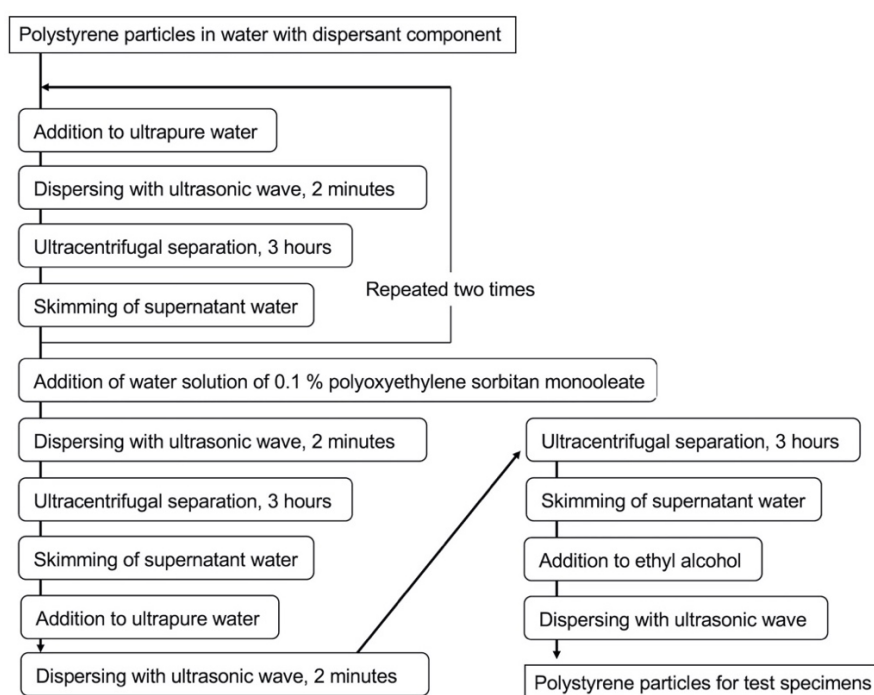


図 1.11 PS製MPの表面調整方法

図1.12に開発した研究用MP調整システムを示す。Pin-on-disc試験機と類似の構造を有しており、Pinを中心にDiscが公転する多方向すべり式を採用した。研究用MP素材としてPE、PP、PVCならびにPETを準備し、Pin形状に加工した。ピンを透明石英ガラスのディスクに接触させ、相対運動を行った。相対運動面は人工海水で満たした。ガラス底面より紫外線を照射し、プラスチック劣化の促進を期待した。

図1.13に透明石英ガラスディスク表面に施したマイクロ・ナノ構造の例を示す。ガラス表面上の凸部分をMP素材が繰り返し変形しながら移動することで海洋中での微小繰り返し変形による疲労破壊を模擬した。Type-Aは深さ $1.5\mu\text{m}$ ・ピッチ $2.0\text{mm}$ の溝を有する格子形状、Type-Bは深さ $0.6\mu\text{m}$ ・ピッチ $1.0\text{mm}$ の溝を有する格子形状、Type-Cは直径 $90\mu\text{m}$ ・高さ $1.0\mu\text{m}$ の凸形状がピッチ $180\mu\text{m}$ で配置された構造、Type-Dは直径 $60\mu\text{m}$ ・高さ $1.3\mu\text{m}$ の凸形状がピッチ $120\mu\text{m}$ で配置された構造であり、MPの幾何学的パラメータを調整するために逐次デザインは変更できる体制とした。

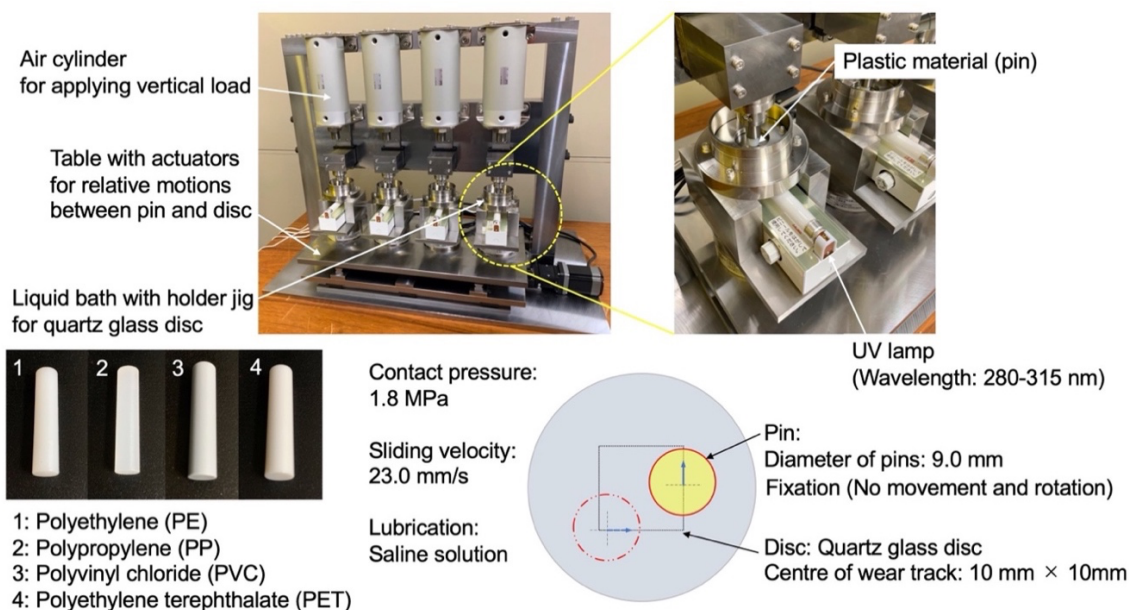


図 1.12 開発した研究用MP調整システム

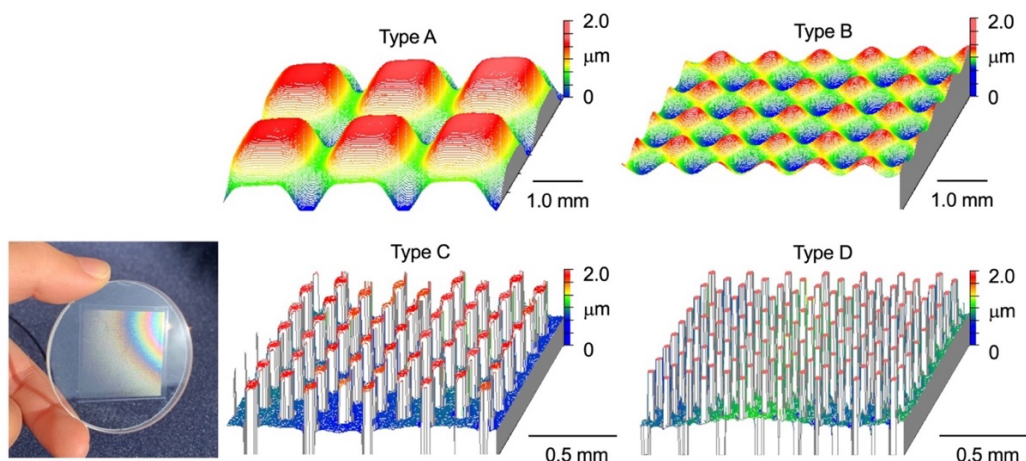


図 1.13 透明石英ガラスディスク表面に施したマイクロ・ナノ構造の例

透明石英ガラスディスク表面をマイクロ・ナノ構造へ加工するプロセスを図1.14に示す。マイクロマスクングプロセス (Microscopic Masking Processing) において、除去加工を希望しない部分にマスク処理を施した。マスク処理方法は、作成する構造パターンにあわせて、Photolithography、Super Inc Jet (SIJ) またはMicro Dispenser (MD) を選択・利用した。マイクロメカニカルリムーバブルプロセス (Microscopic Mechanical Removal Processing) において、マスク部分の材料と素材表面曝露部を同時に機械的除去加工法で加工した。マスク部分の材料が削除された時点で期待するマイクロパターンを有する構造を完成させた。機械的除去加工法として、粒径 $1.2\mu\text{m}$ の多角アルミナ粒子 (WA#8000) の3.2wt%水溶液 (スラリー) を直径1.0mmのノズルに噴射するMicro Slurry Jet (MSJ) を採用した。

素材表面と凹凸部分は材料力学的に連続性をもった一体物であり、凹凸部の表面粗さは下地処理粗さよりも小さくなることから、例えば摩擦力などによる耐性は非常に高く、高強度であり、光学的特性への影響も非常に小さいと判断できる。



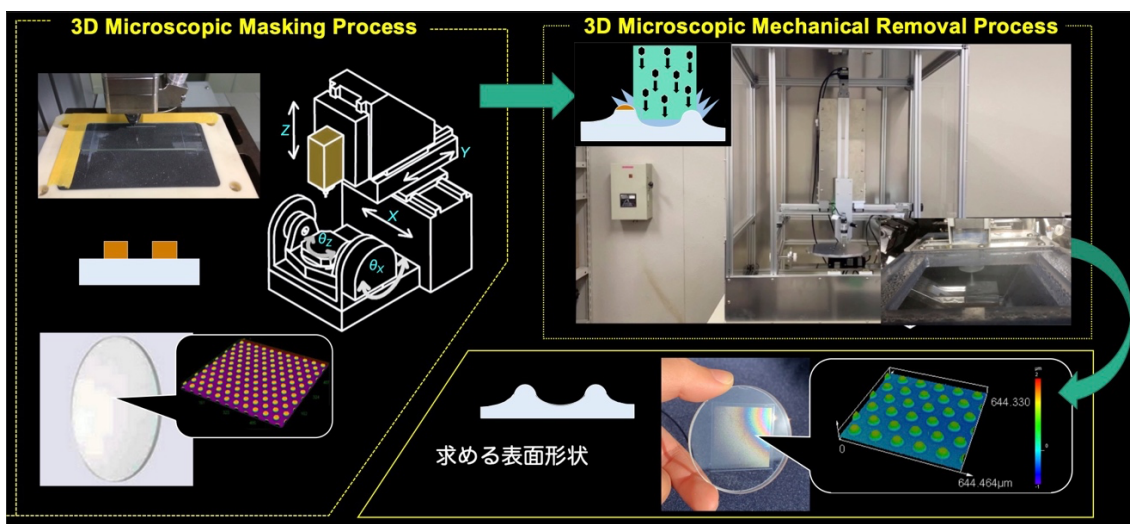


図 1.14 透明石英ガラスディスク表面をマイクロ・ナノ構造へ加工するプロセス

研究用MP調整システム（図 1.12）にて生産したMPに対して、サイズ調整のためフィルトレーション作業を実施した。フィルター上のMPに対してSEM観察を実施し、画像処理等を通じて、MPの等価円直径（D）、アスペクト比（R）、周囲長（L）、複雑度（ $=L/D$ ）を求め、各種実験へと供した（図1.15）。

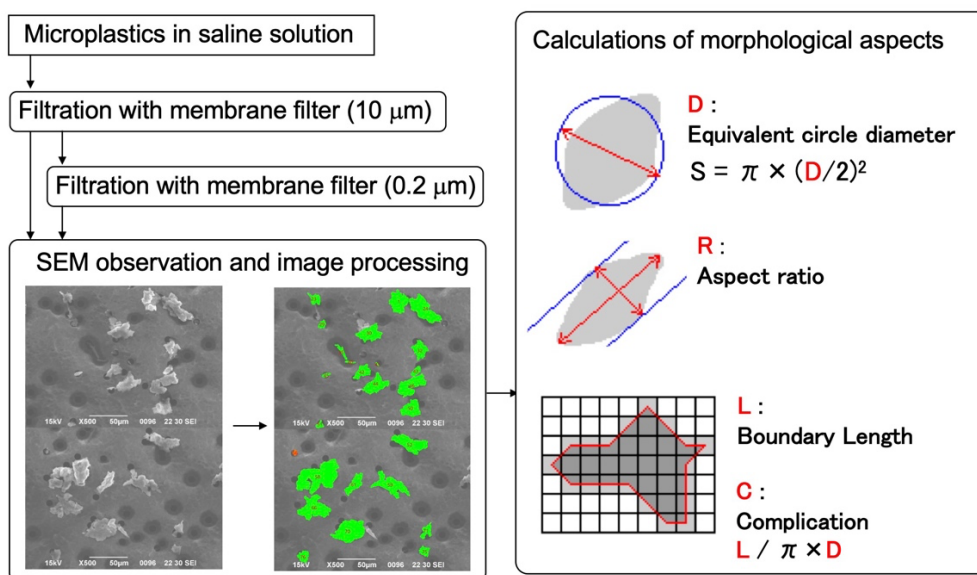


図 1.15 MPの幾何学的パラメータ分析法



#### 4. 結果及び考察

##### 実施項目1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査

MPの移行・蓄積状態の“見える化”を容易にするためPS製蛍光MPを節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）ならびに魚類（ヒメダカ）に急性曝露させた観察例を図1.16～18に示す。明視野像と蛍光観察像の比較や合成により、MPの移行・蓄積状態が観察できることが判明した。マイクロメートルサイズのMPは消化器官内などMP曝露環境に近接する器官に蓄積していることが確認できた。腸管壁を刺激し、MPを核とする凝集物が消化器官に停留したと考えられる事例も観察された。また、MPはほかの組織の内部へと移行している可能性も確認された。

PE製、PP製、PVC製ならびにPET製MPを魚類（ヒメダカ）に急性曝露させた観察例を図1.19～22に示す。PS製蛍光MPを採用した“見える化”研究により、MPの移行・蓄積領域の推測ができたため、その領域を中心に観察を実施した。パラフィン包埋組織内の明視野観察時に焦点深度を変えた観察像群を比較・検討することで、MPの存在を確認することができた（MP粒子が小さいためパラフィン包埋サンプル厚内での焦点位置を逐次移動させるとMP観察像が変化する現象を利用）。素材の違いにもかかわらずサブマイクロメートルからマイクロメートルサイズのMPが生体組織内へ移行・蓄積していることが確認された。

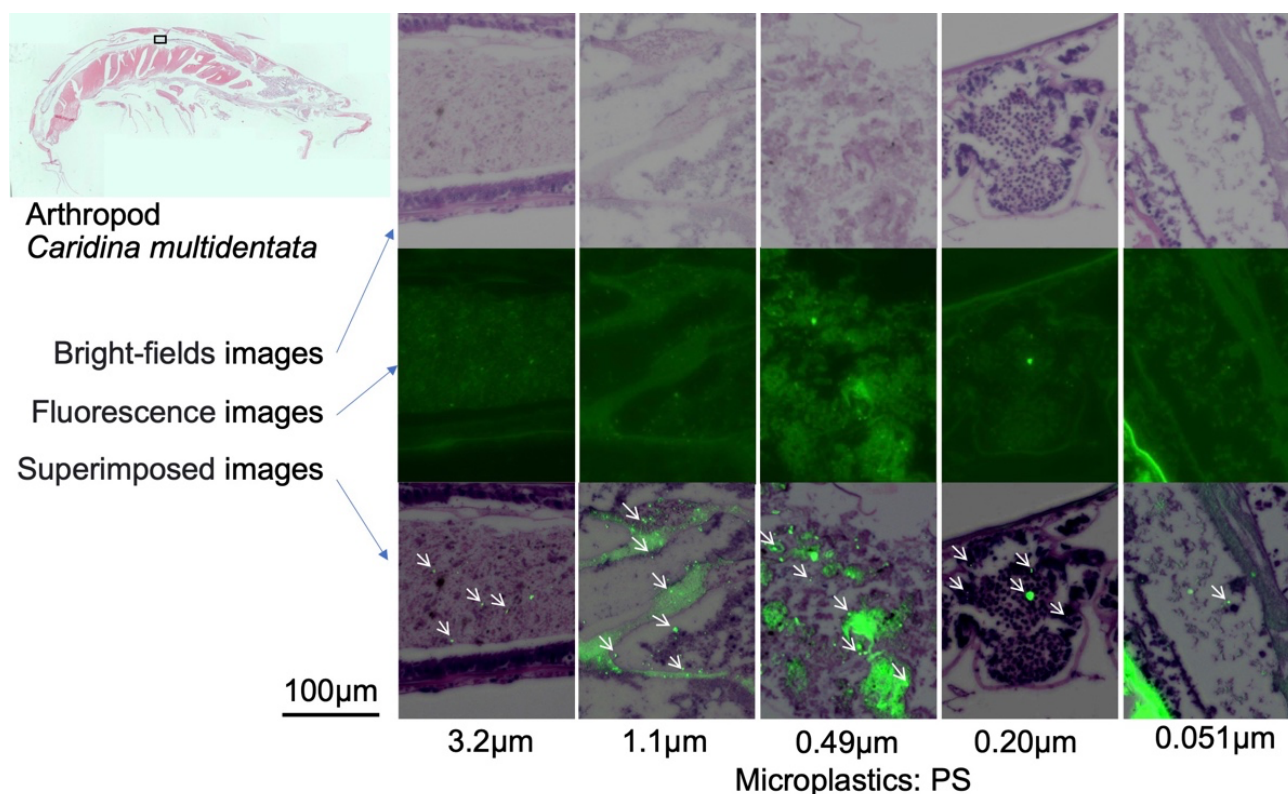


図1.16 PS製蛍光MPをヤマトヌマエビに急性曝露させた観察例

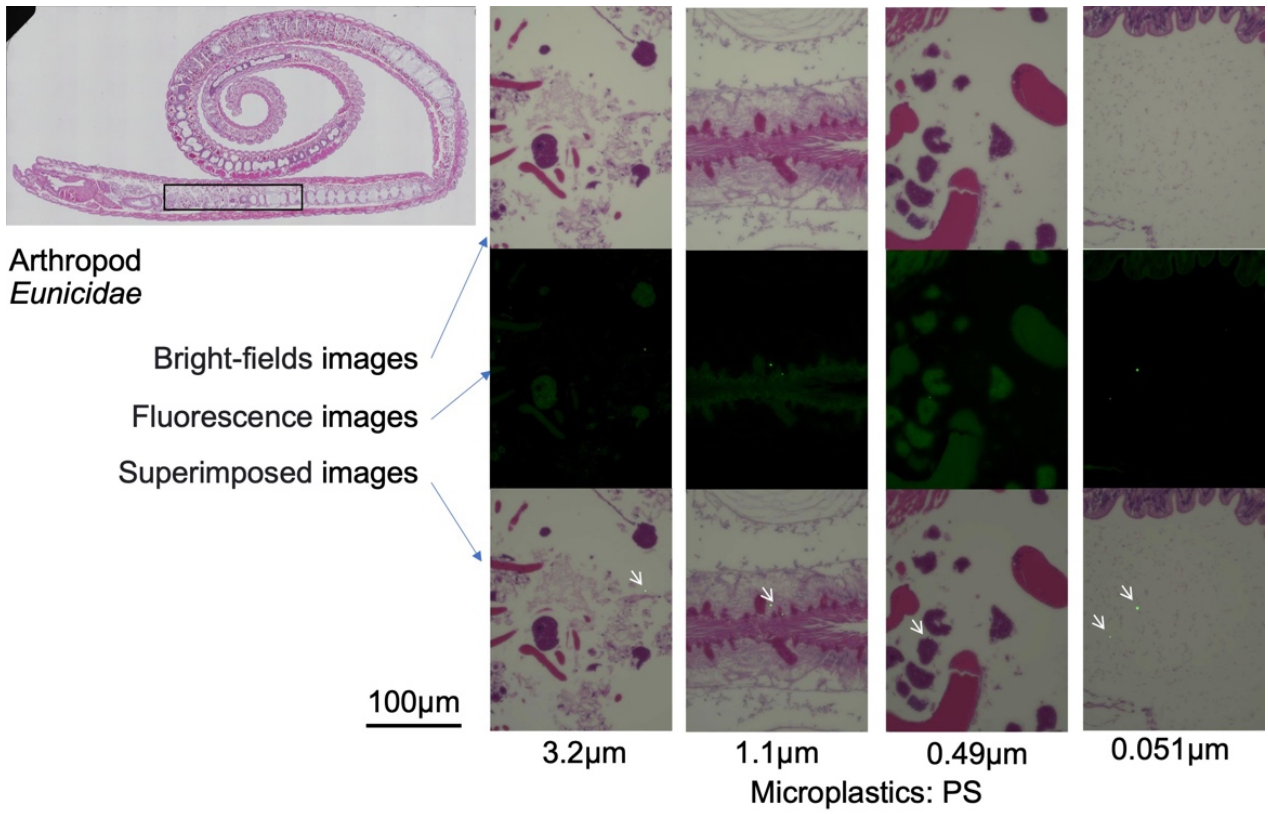


図 1.17 PS製蛍光MPを青イソメに急性曝露させた観察例

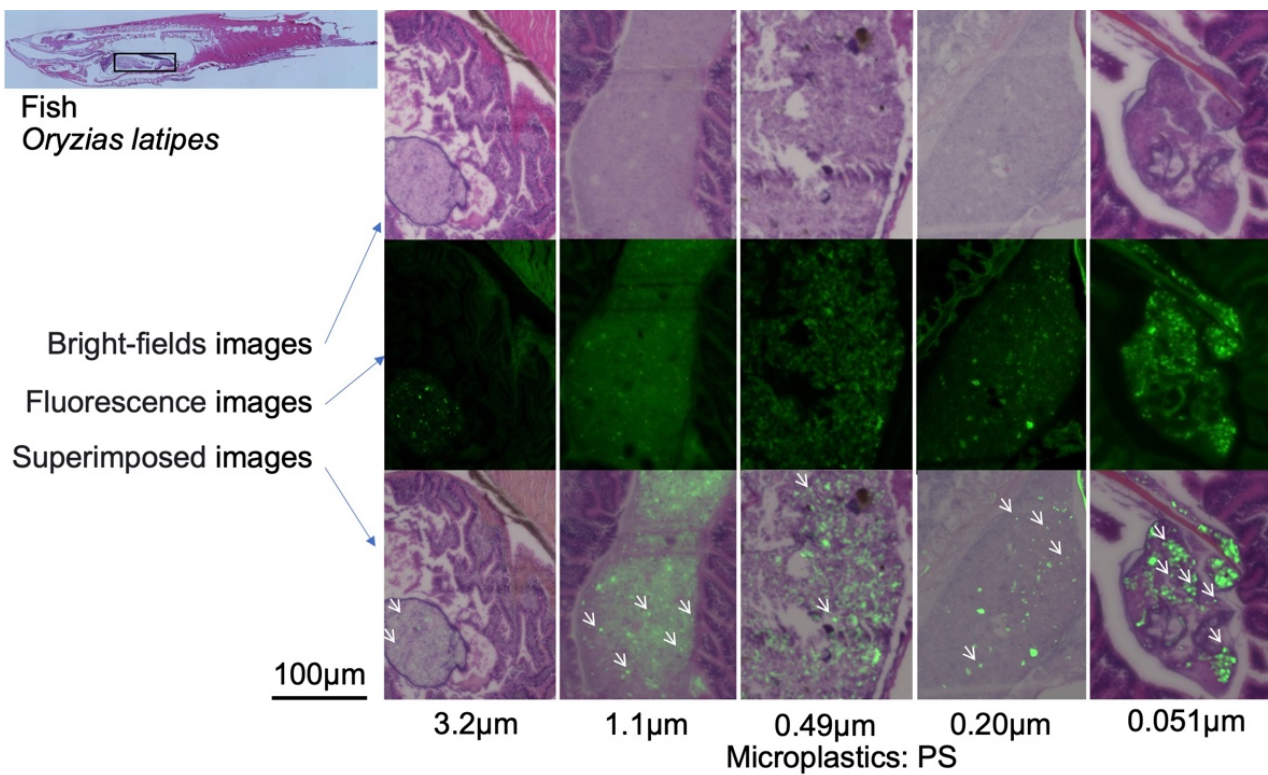


図 1.18 PS製蛍光MPをヒメダカに急性曝露させた観察例



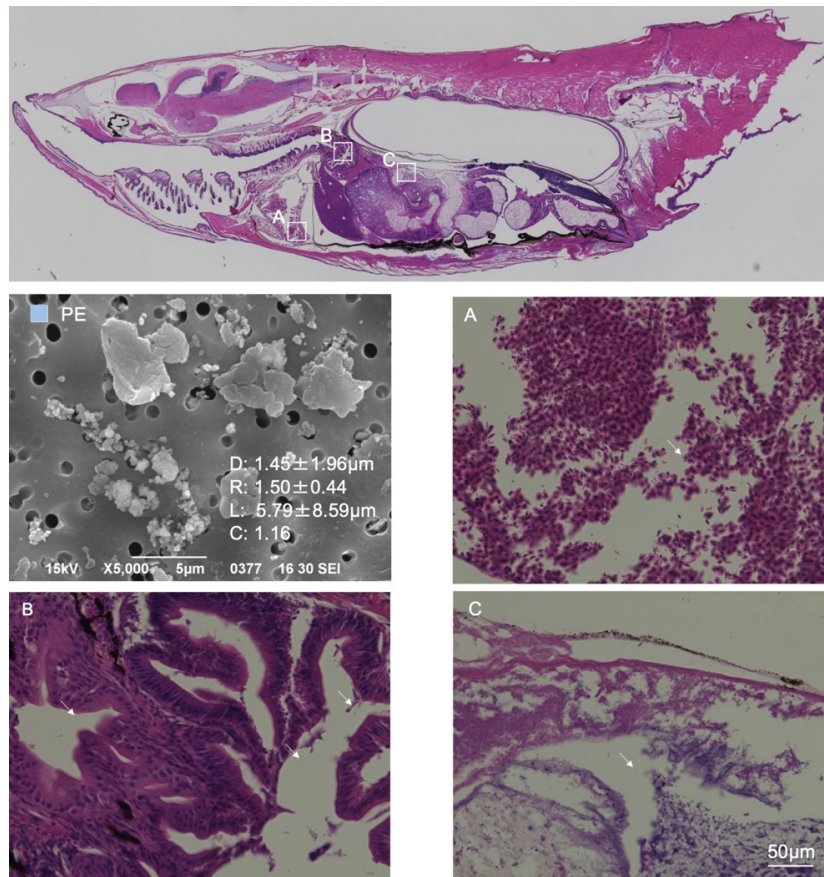


図 1.19 PE製MPをヒメダカに急性曝露させた観察例

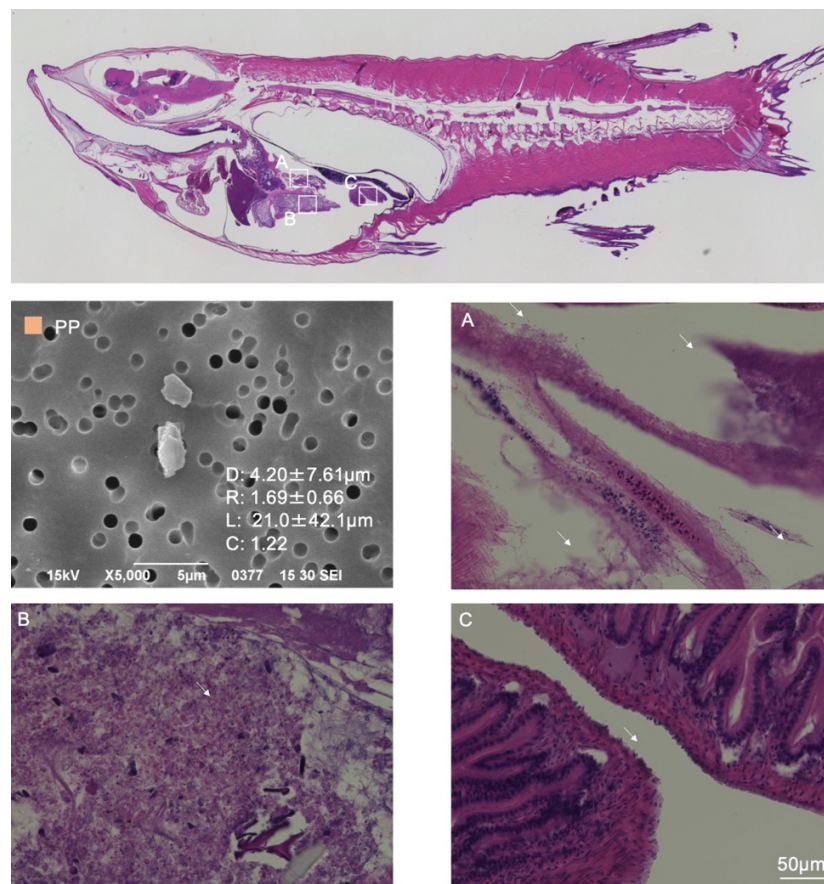


図 1.20 PP製MPをヒメダカに急性曝露させた観察例

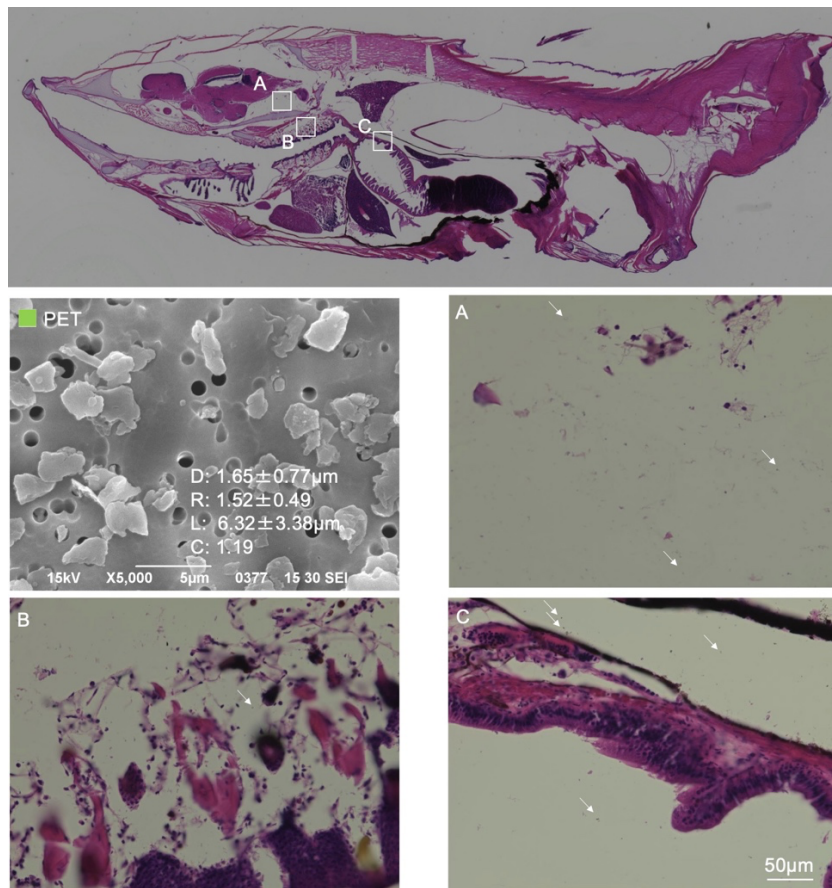


図 1.21 PET製MPをヒメダカに急性曝露させた観察例

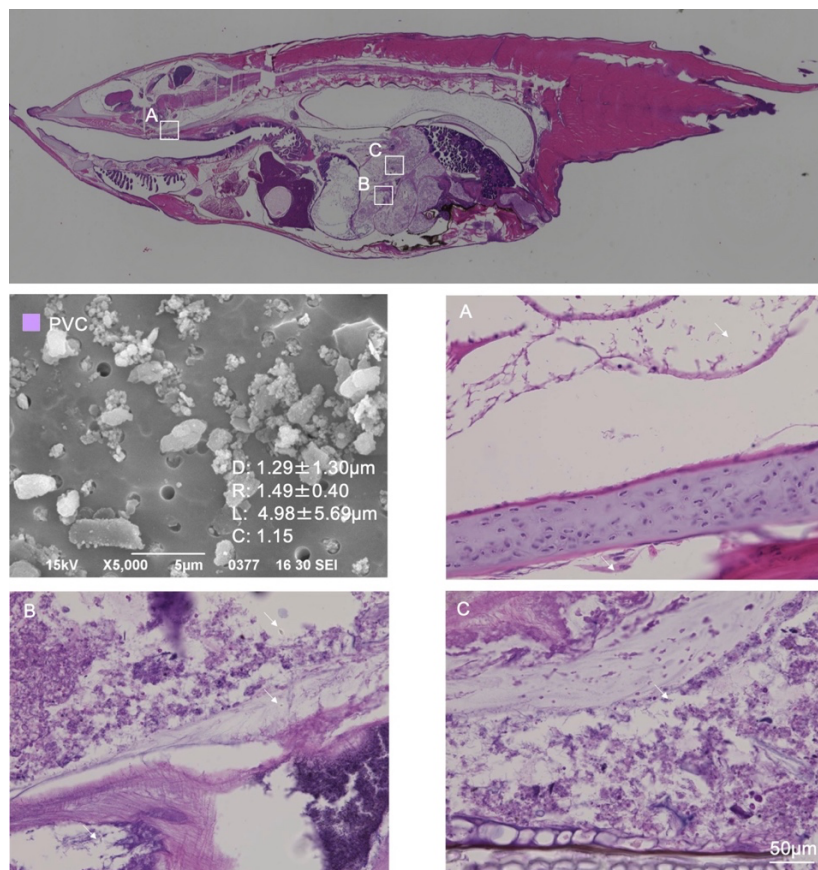


図 1.22 PVC製MPをヒメダカに急性曝露させた観察例



PS製蛍光MPを哺乳類（C57BL6マウス）に急性曝露させた観察例を図1.23に示す。節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）ならびに魚類（ヒメダカ）と同様に明視野像と蛍光観察像の比較や合成により、MPの移行・蓄積状態が観察できることが判明した。

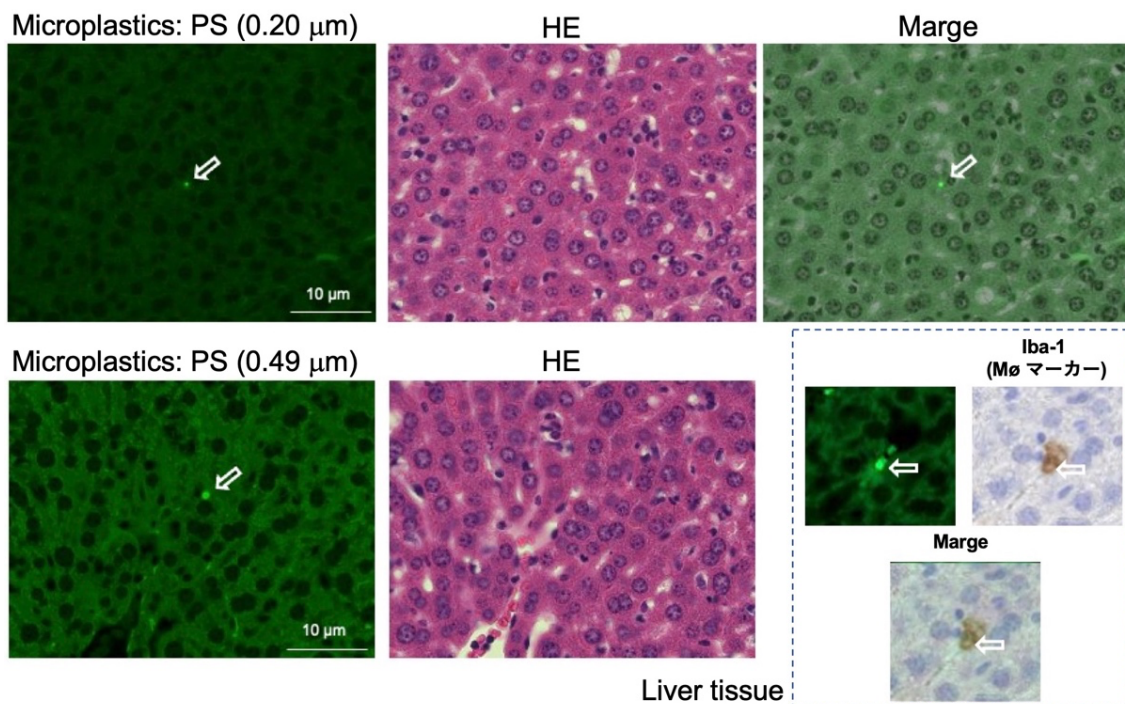


図 1.23 PS製蛍光MPを哺乳類（C57BL6マウス）に急性曝露させた観察例

肝臓組織の観察例を図1.24に示す。潰瘍性大腸炎モデルでは肝臓組織へのMPの移行・蓄積が確認された。これは腸管壁の炎症よりMPが脈管系によってさまざまな組織へ移行することを示唆していた。節足動物や魚類（ヒメダカ）でもさまざまな組織への移行・蓄積が確認できており、この移行・蓄積の原因は脈管系によるMPの運搬に起因すると考えられる。

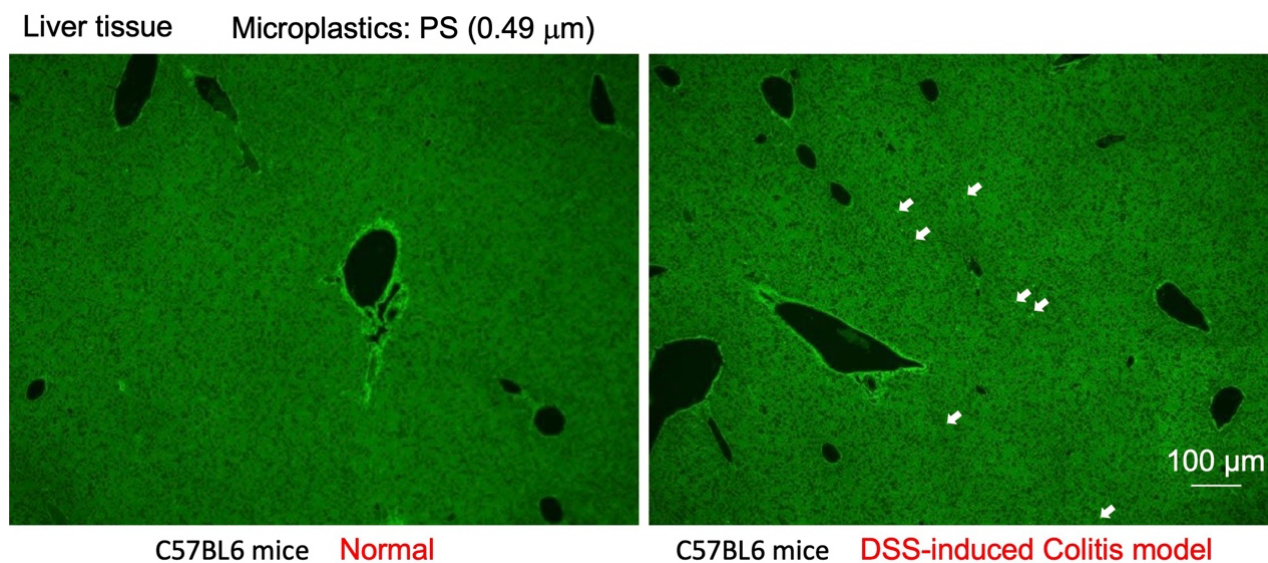


図 1.24 PS製蛍光MPを哺乳類（C57BL6マウス）に急性曝露させた観察例  
（観察組織：肝臓、右図：潰瘍性大腸炎モデル）

## 実施項目 2 : マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査

24ウェルプレートにHMDMを播種し、PET製MP (0.2~10.0  $\mu\text{m}$ の粒子分布) またはPS製蛍光MP (0.2  $\mu\text{m}$ の粒子径) とともに24時間培養した際の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の産生量を図1.25に示す。HMDM数に対してMP投与数を200倍にした場合 ( $\times 200$ )、PET製MPの方がサイトカインの産生が顕著であることが示された。また同じPET製MPでは、投与数が増えるに従ってサイトカインの産生が多くなる傾向にあることが示された。図1.25の結果にて、炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例することが示唆された。しかし、投与したMPは素材特性や幾何学的パラメータの差異により培地中で分散している場合、培地上方で浮遊している場合、培地下方で沈殿している場合、などが考えられ、MP投与数とHMDM数の関係を定量的に議論はしにくいと考えられた。この問題を僅少にするために、曝露するMPのほぼ全量がマクロファージ近傍を通過し、貪食可能な環境が実現できるように各種マイクロ細胞培養デバイス (図1.5~図1.10) の開発と運用が実施された。

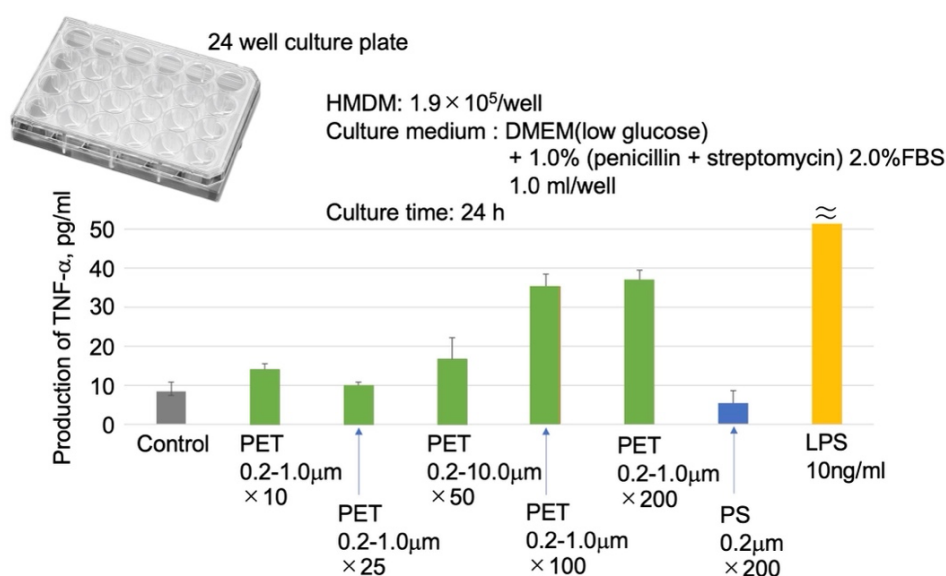


図1.25 PET製MPおよびPS製蛍光MPを投与した場合の炎症性サイトカインの産生量

マイクロ流路型細胞培養デバイス (図1.5~図1.6) にて培養したHMDMの状態例を図1.26に示す。1.1~0.046  $\mu\text{m}$ のPS製蛍光MPはすべてのサイズにおいてHMDMに貪食されていることが確認された。貪食したHMDMの中には形態が変化したり、マイクロ流路デバイス内壁から遊離したりする現象が観察された。これらの状態はHMDMの一般的な挙動であり、マイクロデバイス内でも良好なHMDM培養環境が実現できることが確認された。

図1.27はマイクロ流路型細胞培養デバイス内に送液したMP入り培地を回収し、炎症性サイトカインの産生量を調査した例である。わずか1mlの総液量にもかかわらず、サイトカイン産生が検出できていることが確認された。特定MP直径範囲で産生量のピークが存在する可能性も推察される。しかし、MPがHMDM近傍を連続的に移動し、それゆえに鋭敏に反応を示すデバイス形態であると考えられたため、定量的な判断については試験数の増加や流路形状の工夫などをさらに行う必要があると考えられた。



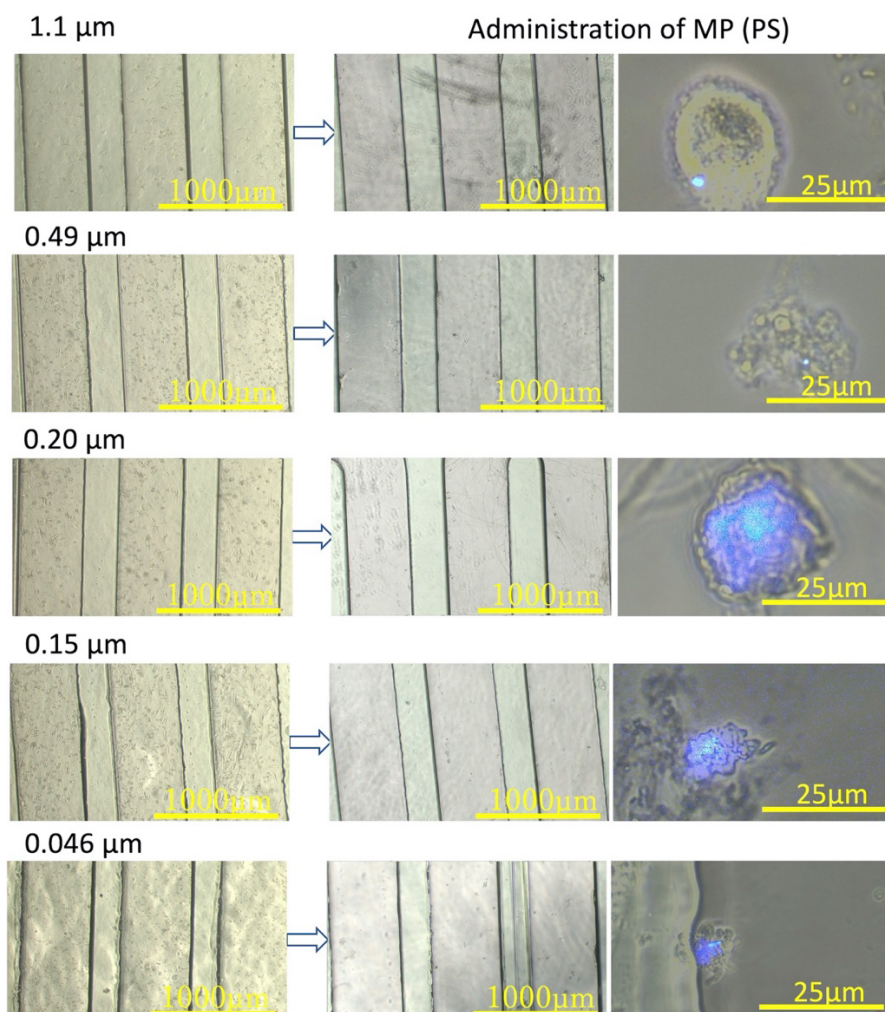


図 1.26 マイクロ流路型細胞培養デバイス内にて培養したHMDM (左図：MP 食食前、右図：食食後)

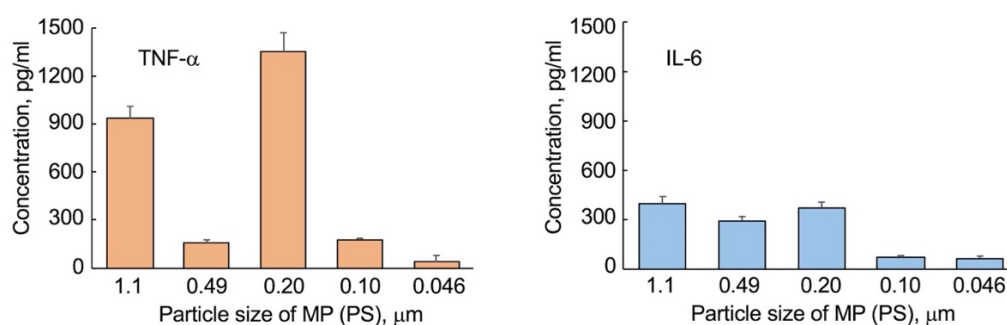


図 1.27 マイクロ流路型細胞培養デバイスを利用した炎症性サイトカイン産生量の測定例

図1.28にマイクロチャンバー型細胞培養デバイス (図1.7～図1.8) でのMP曝露研究結果例を示す。LPS (リポ多糖) によるHMDMへの刺激と同じように、各種MPの曝露量・時間の経過とともに炎症性サイトカインの産生量は増え、ピーク値に至ると一定または減少していくことが観察された。開発したマイクロデバイス群はこのような経時的な観察が可能であることも確認できた。PP製MPやPVC製MPの方がPE製MPやPET製MPよりもサイトカインの産生量が多かった。曝露したMP群にはサイズの違いがあるため、MP素材の影響なのか、サイズの影響なのかは明らかではなかった。しかし、HMDMは体内に移行・蓄積したサブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPを食食し、サイトカインの産生が顕在化することは明らかとなった。

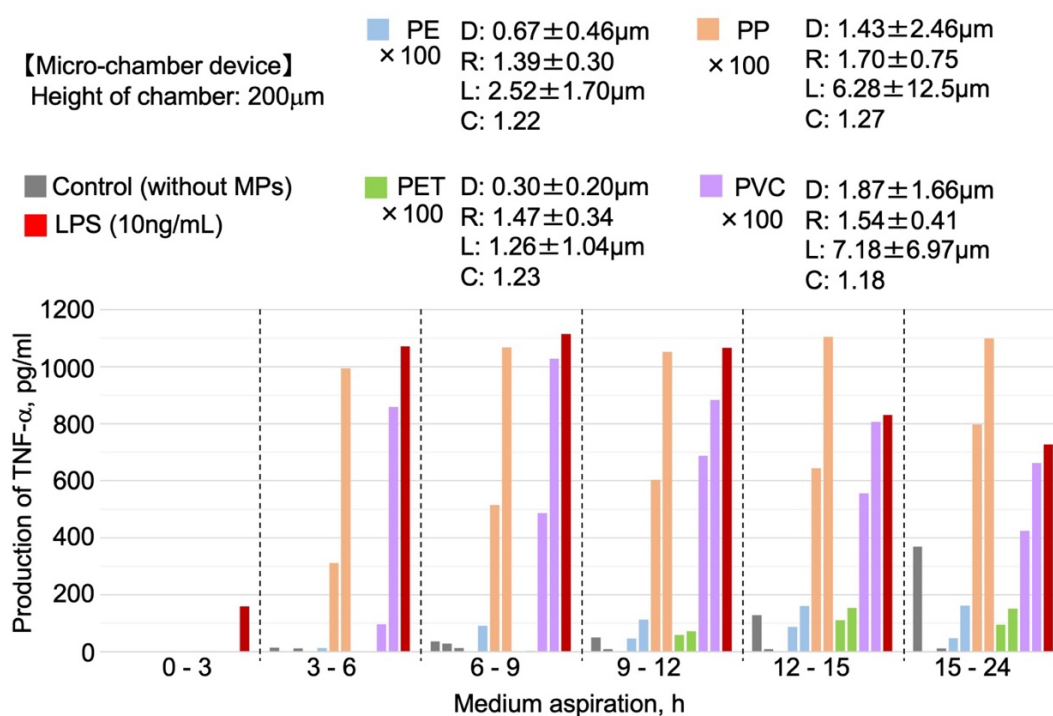


図 1.28 マイクロチャンバー型細胞培養デバイスでのMP曝露研究結果例

MPのサイズをサブミクロンに調整し曝露した結果を図1.29に示す。MPサイズと曝露濃度を統一した場合でも、PP製MPやPVC製MPの方で炎症性サイトカインの産生が確認された。これにより細胞に貪食されたMPの分子構造や表面構造、ならびに製造時に利用される添加剤の影響が存在することが確認された。PP製MPの方がPVC製MPよりもサイトカインの産生量が小さかった。曝露したPVC製MPのアスペクト比が高く、紐状のMPであったため幾何学的な影響が現れたのか、もしくはMP素材の影響によるものかは、今後の実験パラメータの多様化により明らかにすることができると考えられた。

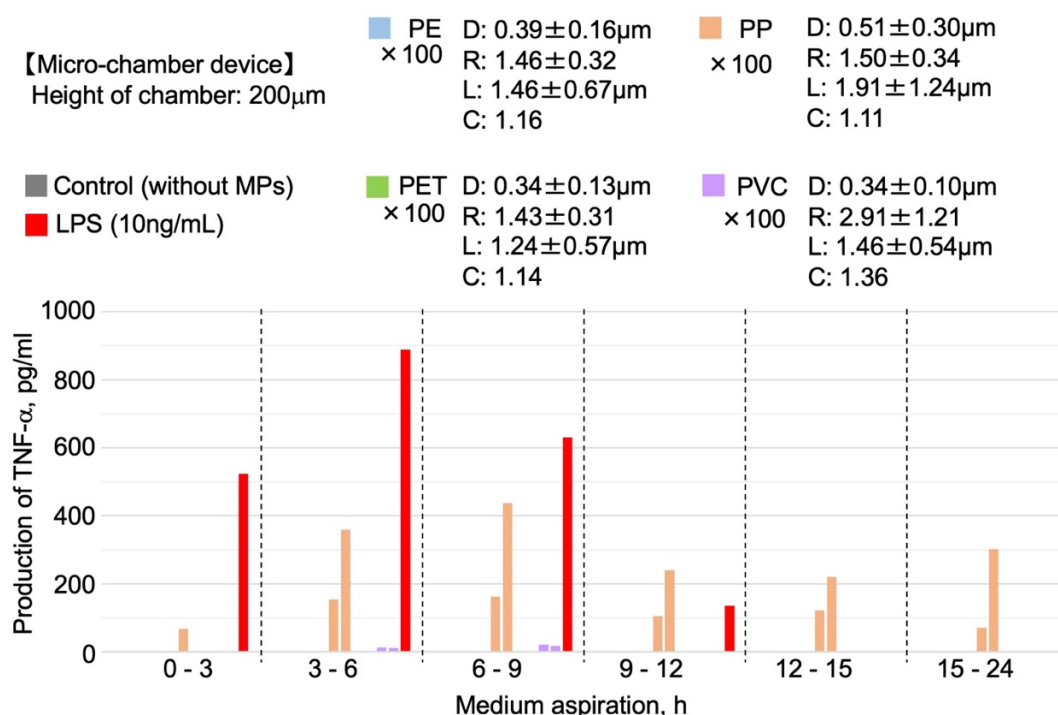


図 1.29 マイクロチャンバー型細胞培養デバイスでのMP曝露研究結果例



### 実施項目 3 : マイクロプラスチックの調整

PS製MPの表面調整前後の状態を図1.30および1.31に示す。MP表面性状を統一するため、界面活性剤をMP表面に再吸着させている(図1.11)。SEMによる観察結果よりMP形態に変化がないこと、倒立蛍光顕微鏡観察よりMPの蛍光性能に影響がおよばないこと、ならびにレーザ回折式粒子径分布測定によりMP粒子直径に影響がないこと、が確認できた。これにより、研究用MP群は“結果の見える化”と幾何学的パラメータ(MPサイズ)の影響解明に関する研究に供することができることがあきらかとなった。

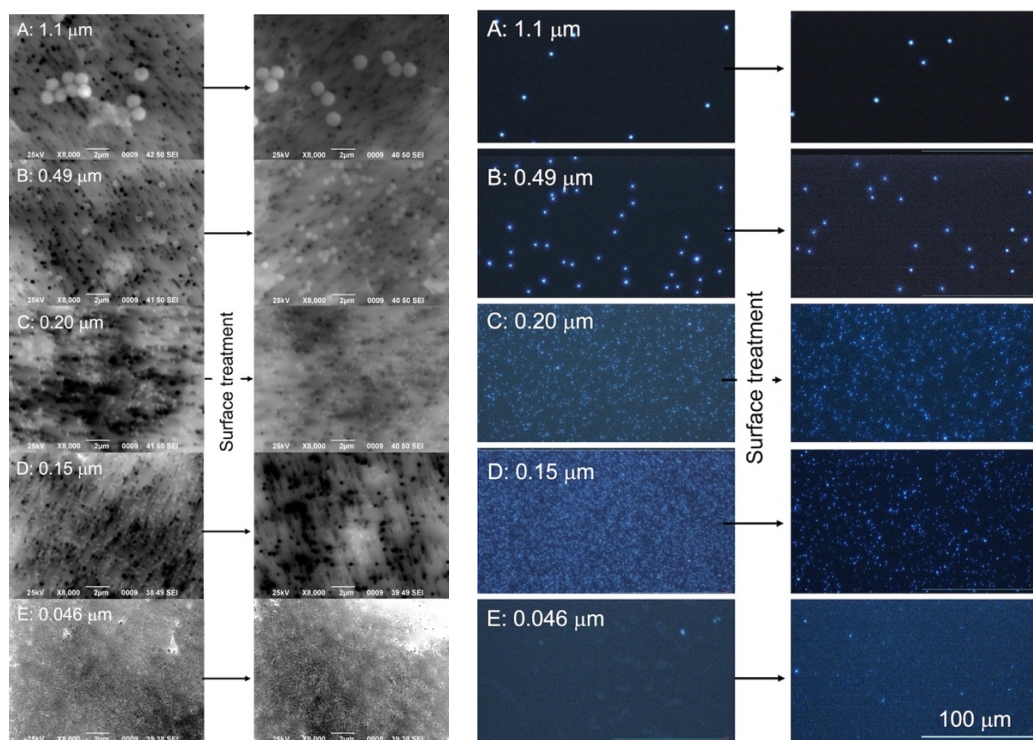


図 1.30 PS製MP表面調整前後の状態

(左図：SEMによる観察、右図：蛍光顕微鏡による観察)

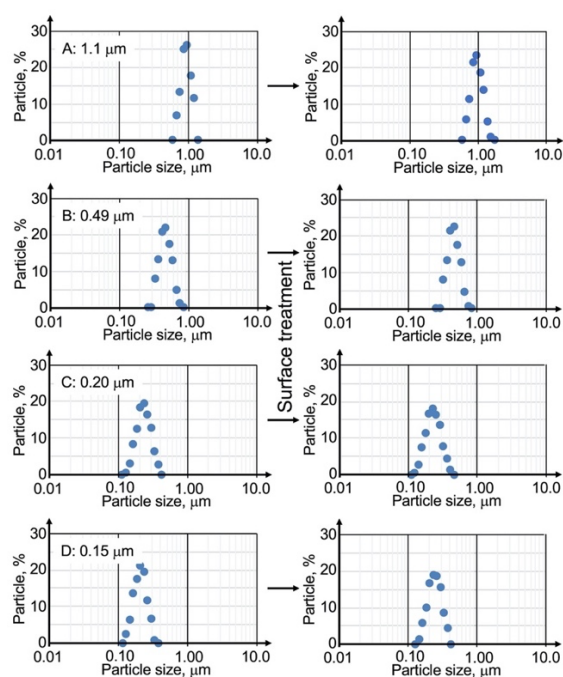


図 1.31 PS製MP表面調整前後の状態 (粒子径の度数分布)

PE、PP、PVCならびにPETのような利用量の多いプラスチック素材を、研究用MP調整システム（図1.12）を利用して自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら調整した。透明石英ガラスディスク表面の凸部分をMP素材が繰り返し変形しながら移動することで海洋中での微小繰り返し変形による疲労破壊を模擬させた。

マイクロ・ナノ構造として図1.32を採用した場合のMP生成状況を図1.33に示す。PEやPPよりもPETの方が発生量は多く、PVCが最も生成量が大きかった。PE、PPおよびPETが結晶性樹脂であるのに対し、PVCのみが非結晶樹脂である。非結晶樹脂は高分子主鎖が規則正しく並んでおらず、ランダム配向となっている。また、外力に対して主鎖がより柔軟に動くと考えられる。PVCがガラス凸部で柔軟に弾性変形を繰り返し、疲労破壊が多くなったと予測される。PETはPEやPPと同じ結晶性樹脂であり、熱可塑性樹脂でもある。ただし、PEやPPが単量体より付加重合で合成されるのに対し、PETは縮合重合により合成されている。MP素材（ピン）と石英ディスクの間の相対運動面は人工海水で湿潤している。そのため、主鎖の加水分解が加わりMP生成量が増えている可能性がある。紫外線照射により、すべてのプラスチック素材においてMP発生量が増加した。紫外線の照射により高分子主鎖の切断が促されていると考えられた。

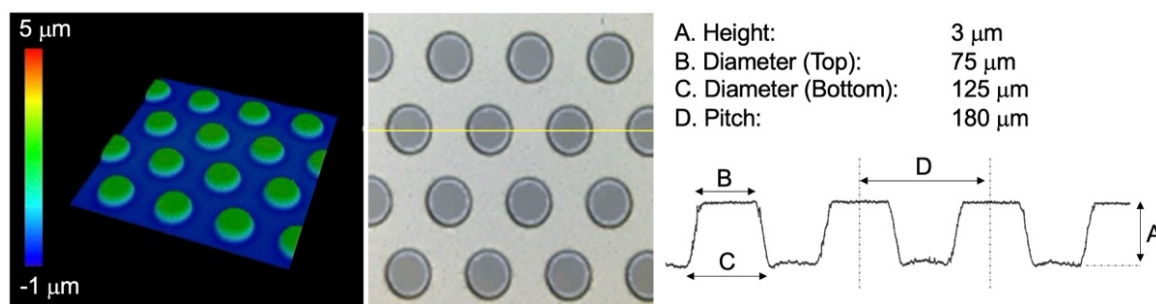


図 1.32 研究用MP調整システム（図1.12）に供した石英ガラスディスク表面のマイクロ・ナノ構造

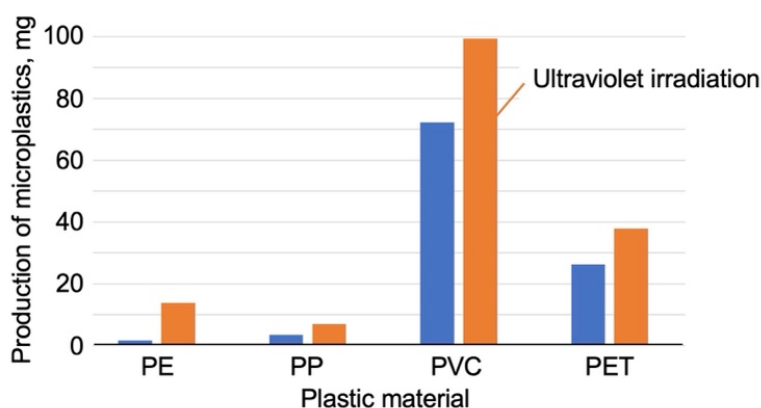


図 1.33 MP生成状況（利用石英ディスク：図1.32）

生成させたMPの幾何学的パラメータ分析を実施した結果を図1.34～1.37に示す。MPのSEM画像を処理し、等価円直径（D）、アスペクト比（R）、周囲長（L）、ならびに複雑度（ $=L/D$ ）を求めた。非結晶性樹脂のPVCおよび縮合重合により合成されるPETではフレーク状のMPが多数観察された。これはPVCの主鎖やPETのアモルファス部分での切断が起こっているためと考えられた。熱可塑性樹脂で結晶性樹脂でもあるPEやPPでは丸みをおびたMP形態となっていた。PPの高分子側鎖は水素のみ、PEの高分子側鎖では一部にメチル基があるが、総じて単純な形状の高分子鎖である。本実験で採用した石英ガラス凸形状はnmレ

ベルの表面粗さを有する数 $\mu\text{m}$ の高さの凸を多数配置し、疲労破壊の誘発を期待していたが、MP形態および分子構造から推察するに凝着性の摩耗が発現している可能性は否定できない。同じプラスチック素材同士を比較した場合、紫外線照射はMPサイズに影響を与えていた。つまり、アスペクト比や複雑度への影響は小さかった。ほとんどのプラスチック素材では紫外線照射でMPは大きくなり疲労破壊の誘発が起こっていると考えられた。しかし、PPにおいては紫外線照射でMPが小さくなっており、凝着性摩耗における微細化の促進が含まれるのではないかと考えられた。

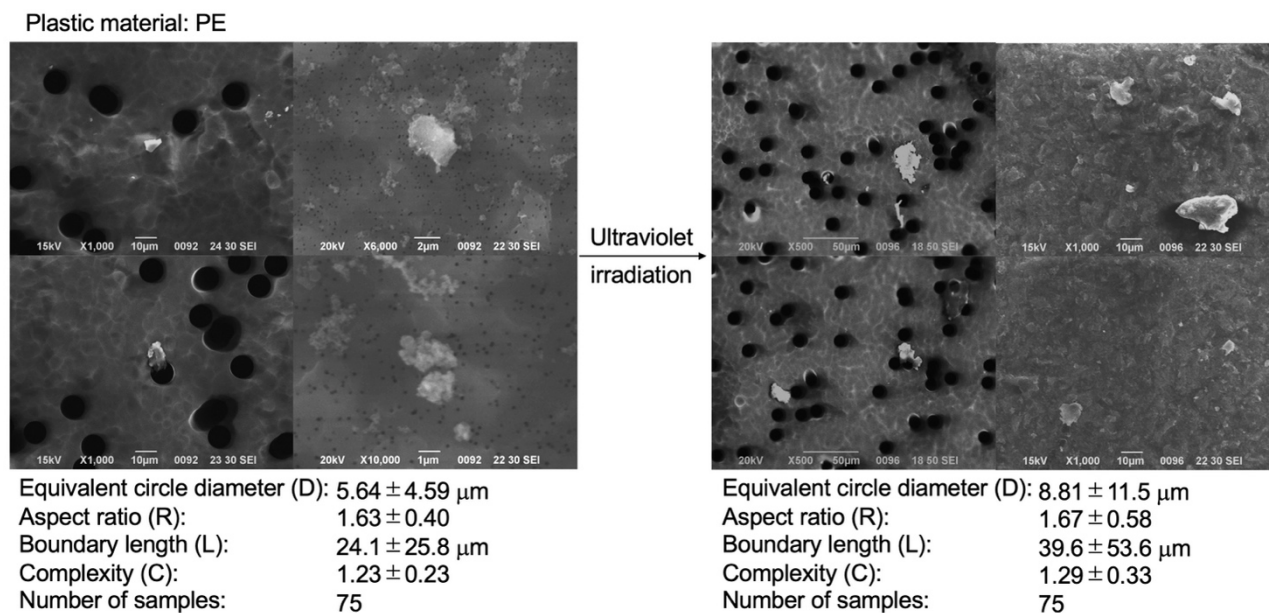


図 1.34 MPの幾何学的パラメータ分析 (PE製MP)

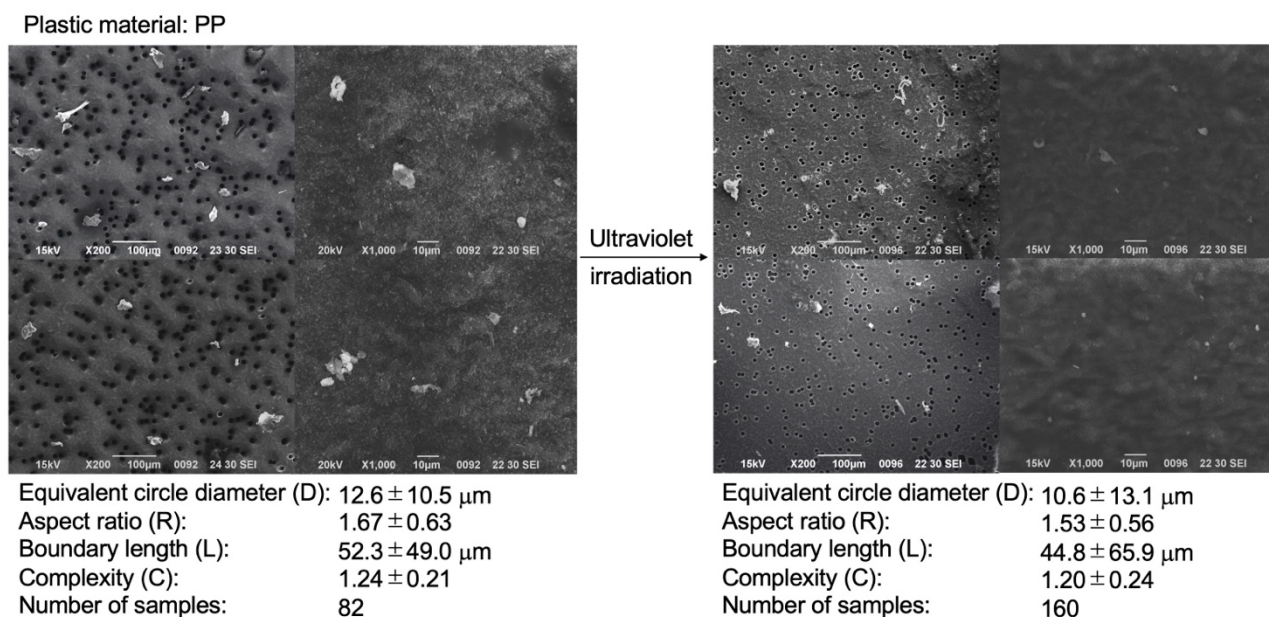


図 1.35 MPの幾何学的パラメータ分析 (PP製MP)



Plastic material: PVC

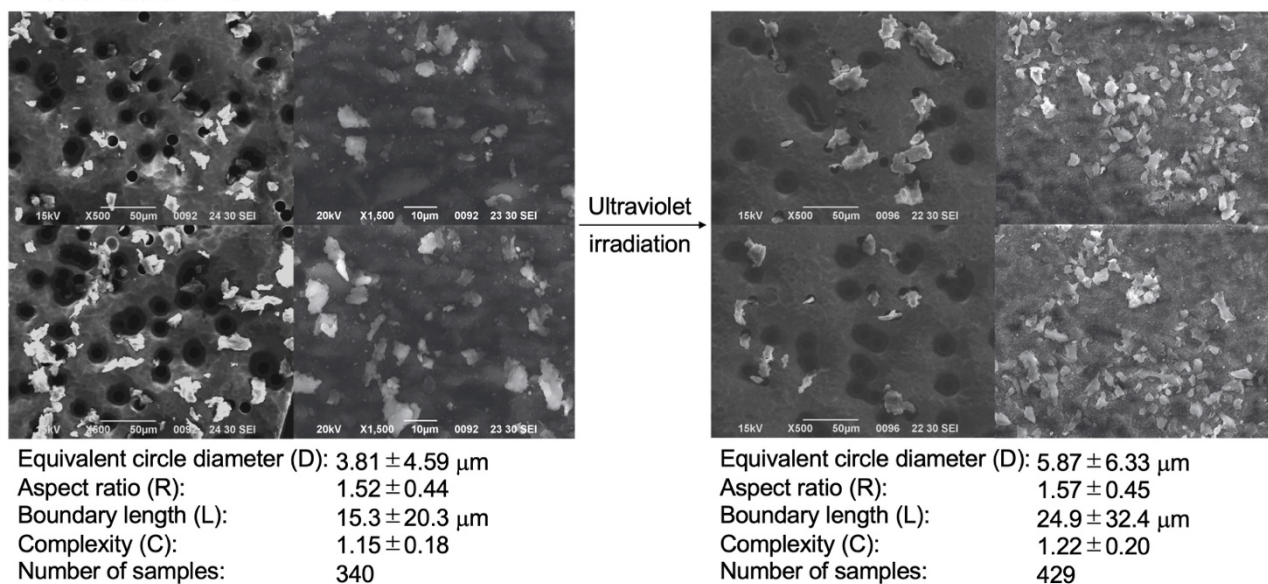


図 1.36 MPの幾何学的パラメータ分析 (PVC製MP)

Plastic material: PET

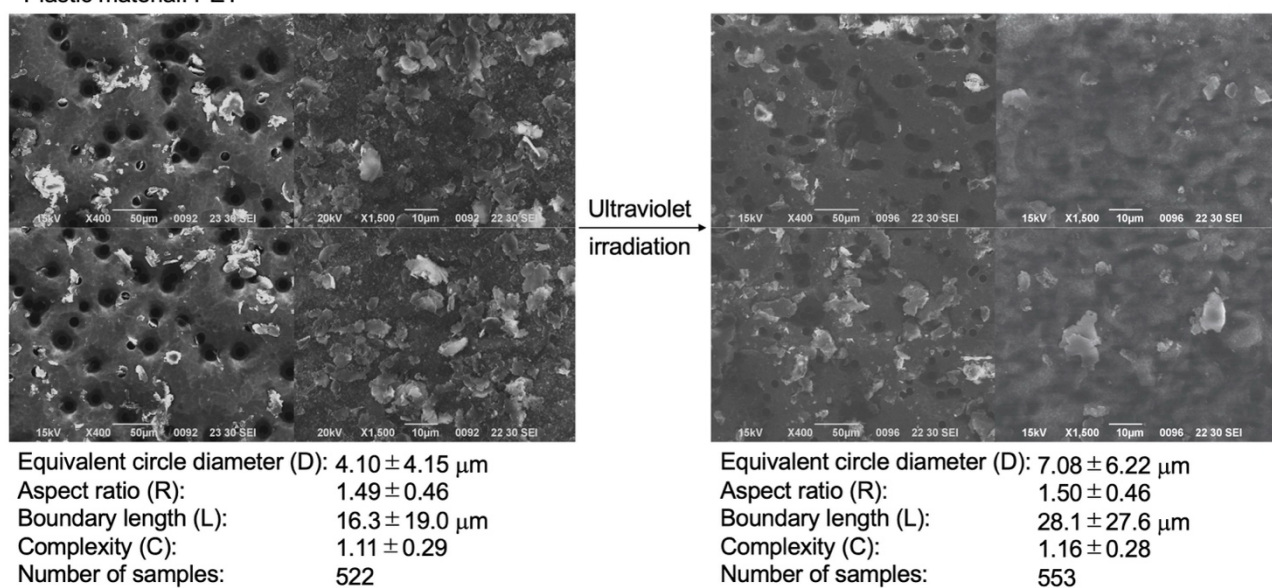


図 1.37 MPの幾何学的パラメータ分析 (PET製MP)

研究用MP調整システム (図1.12) は、自然界のMP微細化メカニズム (プラスチックの疲労破壊と紫外線による劣化促進) を取り入れており、微細化の過程で何が起きているのかを解明する手がかりを得る方法にも活用できると考えている。環境中から発見されるMPとの比較<sup>1-4)</sup>により、ほぼ同じ幾何学的パラメータの研究用MPが生成・供給できることも明らかとなった。

実施項目 1～3 の一連の研究により、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPは外部環境と接触する生体器官 (消化器官など) に移行することが確認された。また、腸管壁の炎症などによりMPが脈管系によって移行する現象も観察された。この場合は体内の諸器官にMPが移行・蓄積する現象

も観察された。生体内に移行・蓄積されたさまざまな物理的・化学的特徴を有するMPは、門番の役割を果たし、免疫反応を制御するHMDMに貪食されることが確認された。MPを貪食したHMDMは炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を発現させる可能性が示された。炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例すること、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPの貪食で産生が顕在化すること、MP素材の違いにより産生量が異なることが明らかとなった。生体の免疫に影響を与えるサブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPはすでに環境中でも発生していることが他研究者からの調査<sup>1-4)</sup>であきらかになっている。免疫に影響を与えるMP曝露濃度が比較的高いと考えられること、MPの微細化メカニズムが本研究で取り入れた波力などの外部力によるプラスチックの疲労破壊と紫外線によるプラスチックの劣化促進にあるのであれば、その微細化速度は比較的低いと考えられることから、現時点で環境中への廃棄プラスチックの量を減らし、可能であれば廃棄プラスチックの回収を進めることで環境保全が行えると予想できる。今後、開発・利用するべきエコフレンドリープラスチックのあり方については、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルの幾何学的パラメータによる影響が確認された以上、分解の過程でこのサイズ帯の壁を飛び越えるマテリアル開発が良いと思われる。例えば、素材表層より分子レベルで溶解・分解していくようなマテリアルであれば、微細粒子が及ぼす影響を回避できる可能性がある。

## 5. 研究目標の達成状況

<p>全体目標 および 達成状況</p>	<p><u>実施項目 1：生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査</u></p> <p><b>【目標】</b> 節足動物 2 種以上、魚類 1 種以上、ほ乳類 1 種以上の生体に、材質 4 種以上と幾何学的パラメータ（粒子径、アスペクト比、ポーラス比）を調整した研究用MPを曝露する。どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを明らかにする。</p> <p><b>【達成状況】</b> 目標どおりの成果をあげた。</p> <p><b>【判断に至った理由】</b> 節足動物（ヤマトヌマエビ、青イソメ）、魚類（ヒメダカ）ならびにはほ乳類（C57BL6マウス）へのMP曝露研究を実施できた。PS、PE、PP、PVCならびにPET製の研究用MPを調整し、生体に曝露することができた。これら研究用MPの幾何学的パラメータ（等価円直径、アスペクト比、周囲長、複雑度）を解析し、曝露実験に供することができた。 サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPがさまざまな組織に移行・蓄積することは確認できたが、アスペクト比や複雑度に対する影響は継続した研究が必要となった。</p> <p><u>実施項目 2：マクロファージによる貪食とその影響の免疫学的調査</u></p> <p><b>【目標】</b> MPが免疫に与える影響をHMDMにより明らかにする。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、Bio-MEMS技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用する。ヒト免疫に影響を与えるMPの素材、幾何学的パラメータおよび濃度を明らかにする。</p>
------------------------------	--

**【達成状況】**

目標どおりの成果をあげた。

**【判断に至った理由】**

生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけ、かつ定量的・経時的な分析が可能な培養システム（マイクロ流路型細胞培養デバイス、マイクロチャンバー型細胞培養デバイス、A11ガラス製マイクロチャンバー）を開発・運用した。

HMDMはさまざまな幾何学的パラメータのMPを貪食することが確認された。MPを貪食したHMDMは炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を発現させる可能性が示された。炎症性サイトカインの産生量はMPの曝露量に比例すること、サブマイクロメートルからマイクロメートルレベルのMPの貪食で産生が顕在化すること、MP素材の違いにより産生量が異なることが明らかとなった。より定量的・経時的な結果をえるためには、継続した研究が必要となった。

**実施項目 3：マイクロプラスチックの調整****【目標】**

ポリスチレン（PS）、ポリエチレン（PE）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリプロピレン（PP）のような利用量の多いプラスチック4種以上の素材に対して、研究用MPとして調整・生産したものを実施項目1～2に活用できる体制を整える。

**【達成状況】**

目標を上回る成果をあげた。

**【判断に至った理由】**

結果の“見える化”を容易にするための研究用MPとしてPS製蛍光MPの準備が整い、曝露研究に供することができた。PE、PP、PVCおよびPET素材を自然環境中で発生している微細化メカニズムを取り入れながら研究用MPとして調整することができる装置の開発と運用、ならびに実施項目1～2の研究に活用され、よりの確な研究成果を得る体制が整えられた。

当該研究用MPの他研究機関への供給も始まった。また、実施項目3によるMPの微細化メカニズムの考察と実施項目1～2の考察結果より、現在廃棄されているプラスチック、ならびに将来的なエコフレンドリープラスチックのあり方についての考察を行うことができた。

## 6. 引用文献

- 1) Martin Pivokonsky, Lenka Cermakova, Katerina Novotna, Petra Peer, Tomas Cajthaml, Vaclav Janda: Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of the Total Environment* 643 (2018) 1644-1651.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.102>
- 2) Omayma Missawi, Nouredine Bousserhine, Sabrina Belbekhouche, Nesrine Zitouni, Vanessa Alphonse, Iteb Boughattas, Mohamed Banni: Abundance and distribution of small microplastics (<3  $\mu\text{m}$ ) in sediments and seaworms from the Southern Mediterranean coasts and characterisation of their potential harmful effects. *Environmental Pollution* 263 (2020) 114634. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114634>
- 3) Shuaipeng Zhang, Yucui Sun, Beibei Liu, Ruilong Li: Full size microplastics in crab and fish collected from the mangrove wetland of Beibu Gulf: Evidences from Raman Tweezers (1-20  $\mu\text{m}$ ) and spectroscopy (20-5000  $\mu\text{m}$ ). *Science of the Total Environment* 759 (2021) 143504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143504>
- 4) Nesrine Zitouni, Nouredine Bousserhine, Sabrina Belbekhouche, Omayma Missawi, Vanessa Alphonse, Iteb Boughatass, Mohamed Banni: First report on the presence of small microplastics (<3  $\mu\text{m}$ ) in tissue of the commercial fish *Serranus scriba* (Linnaeus. 1758) from Tunisian coasts and associated cellular alterations. *Environmental Pollution* 263 (2020) 114576. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114576>

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

##### <査読付き論文>

- 1) Yoshitaka Nakanishi, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Nana Motojima, Haruki Miyamoto, Hajime Yamaguchi, Masaaki Morita, Kazuma Shibata, Yoshihiro Komohara, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, Hidehiko Higaki: *Biotribology* 23(2020)100137(h-index:13)  
Microfluidic device used for the secretion of inflammatory cytokines from human monocyte-derived macrophages stimulated by ultra-high molecular weight polyethylene particles.
- 2) Yoshitaka Nakanishi, Yuta Nakashima, Emile van der Heide: *Precision Engineering* 67(2021)172-177(IF:3.156) Microstructuring glass surfaces using a combined masking and microslurry-jet machining process.
- 3) Hajime Yamaguchi, Koshi Sakatal, Keiji Kasamura, Yuta Nakashima, Yoshitaka Nakanishi: *Frontiers in Mechanical Engineering* 7(2021)631093 (h-index:7) Texturing of Glass Surface using Micro-Slurry Jet Machining Process.
- 4) Haruki Miyamoto, Katsunori Higuchi, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Yoshihiro Komohara, Yoshitaka Nakanishi: *Frontiers in Mechanical Engineering* 7 (2021) 631128 (h-index:7) Culture system for a closer biological contact between macrophages and microparticles.
- 5) Yoshitaka Nakanishi, Hajime Yamaguchi, Yusuke Hirata, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara: *Wear* 477 (2021) 203816 (IF:3.892) Micro-abrasive glass surface for producing microplastics for biological tests.

##### <その他誌上発表 (査読なし) >

- 1) H.Miyamoto, N.Motojima, Y.Fujiwara, Y.Nakashima, Y.Nakanishi: *Proceedings of Life Engineering Symposium 2019(LE 2019)*, 80-84(2019), New mechanical surface processing for bearing part in artificial joint to reduce macrophage activation.
- 2) 中西義孝, 山口先, 笠村啓司, 中島雄太: *非破壊検査* 70(4) (2021) 154-157, 接触と材料表面加工.
- 3) 中西義孝, 中島雄太, 藤原章雄: *化学とマイクロ・ナノシステム*20(1) (2021) 1-6, マイクロプラスチック研究におけるマイクロ・ナノシステム.
- 4) 中西義孝: *トライボロジスト*, 機械的除去加工による表面テクスチャリング, 印刷中.

#### (2) 口頭発表 (学会等)

- 1) Binti Mat Rajab Maisarah, Fujiwara Yukio, Komohara Yoshihiro, Nakanishi Yoshitaka, Nakashima Yuta: 第58回日本生体医工学会大会 (2019) Experimental Evaluation for Macrophage Responses Stimulated by PMMA Micro Particles for Immune Therapy
- 2) 宮本陽来, 本島那奈, 中島雄太, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝: 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会 (2019) ポリエチレン摩耗粉と炎症性サイトカイン産生量の関係に関する研究
- 3) 柴田司真, 中島雄太, 中西義孝: 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会 (2019) Micro slurry-jet プロセスによる生体模倣表面の創製
- 4) Y.Nakanishi, N.Motojima, H.Miyamoto, Y.Nakashima, Y.Fujiwara, Y.Komohara, M.Takeya, H.Higaki: *International/American Society of Biomechanics (ISB/ASB 2019)*



- Effect of surface profile of co-cr-mo alloy on wear behaviour of polyethylene in artificial joint
- 5) Y.Nakanishi, K.Shibata, Y.Nakanishi: Life Engineering Symposium 2019(LE 2019) (2019) Three-dimensional multiscale surface-processing for creation of bio-inspired surfaces
  - 6) Y.Nakanishi, K.Shibata, Y.Nakashima: 46th Leeds-Lyon Symposium on Tribology (2019) BIO-INSPIRED SURFACE FABRICATED USING MICRO SLURRY JET METHOD AFFECTS EVERYDAY TRIBOLOGY
  - 7) 中西義孝、中島雄太、Ling YIN: 日本機械学会2019年度年次大会 (2019) 歯科セラミックスの表面仕上げと曲げ強度の関係
  - 8) Haruki Miyamoto, Nana Motojima, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Yoshihiro Komohara, Kazunori Hino, Hiromasa Miura, Hidehiko Higaki, Yoshitaka Nakanishi: International Tribology Conference Sendai 2019 (ITC Sendai 2019) (2019) Influence of Co-Cr-Mo alloy surface processed by micro slurry jet on tribological behavior of ultra-high molecular weight polyethylene in artificial joint
  - 9) Yoshitaka Nakanishi, Yuta Nakashima, Yukio Fujiwara, Kazunori Hino, Hidehiko Higaki, Hiromasa Miura: International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA), 32nd Annual Congress (2019) New mechanical surface processing for bearing part in artificial joint in order to reduce macrophage activation
  - 10) 中西義孝, 中島雄太, 藤原幸雄, 菰原義弘, 日垣秀彦, 日野和典, 三浦裕正: 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 (2019) 招待講演: トライボロジー関連研究
  - 11) 中西義孝, 中島雄太, 藤原幸雄, 菰原義弘, 日野和典, 三浦裕正, 日垣秀彦: 第46回日本臨床バイオメカニクス学会 (2019) 表面プロファイルが摩耗粉に及ぼす影響
  - 12) 中西義孝, 柴田司真, 中島雄太: 日本機械学会九州支部沖縄講演会 (2019) 機械的除去法によるバイオインスパイアード表面加工
  - 13) Yoshitaka Nakanishi, Kazuma Shibata, Yuta Nakashima: The 17th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME) Three-Dimensional Multiscale Surface Processing Methods to Create Bio-Inspired Surface
  - 14) Y.Nakashima, M.MatRajab, Y.Fujiwara, Y.Komohara, Y.Nakanishi: 8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (ICMOBT) (2019) Experimental evaluation of influence of microplastics on macrophage responses
  - 15) Y.Nakanishi, K.Shibata, Y.Nakashima: 8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (ICMOBT) (2019) Three-dimensional multiscale surface-processing methods to create bio-inspired surfaces on artificial materials
  - 16) Yukio Fujiwara, Yoichi Saito, Yuta Nakashima, Yoshitaka Nakanishi, Yoshihiro Komohara: 8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (ICMOBT) (2019) Application of substances regulating macrophage phenotype to biomaterials
  - 17) 中西義孝: 第50回日本人工関節学会 (2019) 招待講演: 工学的手法を用いた人工関節関連技術の開発
  - 18) 藤原章雄: 2020年日本生体医工学会九州支部学術講演会 (2020) マクロファージがつなぐ異分野連携の実践
  - 19) Yoshitaka Nakanishi: Invited lecture in the University of Adelaide (2020) Three-dimensional multiscale surface processing methods for bio-inspired surfaces
  - 20) Yuta Nakashima: Invited lecture in the University of Adelaide (2020) Development of microfluidic devices and micro-nano technology for bio-medical applications

- 21) Yoshitaka Nakanishi: 9th International Engineering Symposium (IES 2020) (2020) 招待講演: Bio-inspired Materials & Surfaces - Methods and applications -
- 22) 中西義孝、山口先、中島雄太、藤原幸雄: 日本トライボロジー学会トライボロジー会議2020秋 別府 (2020) 切削性摩耗による研究用マイクロプラスチックの調整.
- 23) 山口先, 坂田晃至, 笠村啓司, 中島雄太, 中西義孝: バイオメカニズム学会第41回バイオメカニズム学術講演会 (2020) Bio-inspired表面の創製とその効果 (第3報)
- 24) 中西義孝、中島雄太、藤原幸雄: バイオメカニズム学会第41回バイオメカニズム学術講演会 (2020) マイクロプラスチックが生体組織に与える影響.
- 25) K.Higuchi, Y.Nakashima, Y.Fujiwara, Y.Komohara, Y.Nakanishi: 5th International Conference on BioTribology (2021) Microfluidic device used for the secretion of inflammatory cytokines from human monocyte-derived macrophages stimulated by microscopic particles.
- 26) Y.Nakanishi, H.Yamaguchi, Y.Hirata, Y.Nakashima, Y.Fujiwara: 23rd International Conference on Wear of Materials (2021) Micro-abrasive glass surface for producing microplastics for biological tests.
- 27) 伊賀颯人, 樋口勝識, 平田祐介, 中島雄太, 藤原章雄, 中西義孝: 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会 (2021) マクロファージ食作用解明のための培養システムの開発.
- 28) 伊賀颯人, 樋口勝識, 武田恭佳, 中島雄太, 藤原章雄, 中西義孝: 生体医工学シンポジウム2021 (2021) ヒト単球由来マクロファージの食作用と炎症性サイトカインの産生に関する研究.
- 29) Hayato IGA, Ryota TASHIRO, Yutaro DOI, Katsunori HIGUCHI, Hajime YAMAGUCHI, Yuta NAKASHIMA, Yukio FUJIWARA, Hidehiko HIGAKI, Yoshitaka NAKANISHI: The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (2021) Micro-chamber device used for secretion of inflammatory cytokines from human monocyte-derived macrophages stimulated by ultra-high molecular weight polyethylene particles.
- 30) Yoshitaka NAKANISHI, Hajime YAMAGUCHI, Yuta NAKASHIMA: The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (2021) Top-down mechanical removal method for creating bio-inspired geometrical surfaces onto artificial materials.
- 31) 樋口勝識, 宮本陽来, 坂田晃至, 中島雄太, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝: 日本生体医工学会九州支部 学術講演会 (2021) マクロファージ培養システムの開発 (第1報 マイクロ流路デバイスの設計と評価)
- 32) 宮本陽来, 樋口勝識, 坂田晃至, 中島雄太, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝: 日本生体医工学会九州支部 学術講演会 (2021) マクロファージ培養システムの開発 (第2報 マイクロチャンバーの設計と評価)
- 33) 宮本陽来, 樋口勝識, 坂田晃至, 中島雄太, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝: 日本機械学会九州支部 第74期総会・講演会 (2021) ヒトマクロファージ食作用過程における微細粒子の幾何学的パラメータの影響
- 34) 山口先, ハディアルハイ, 坂田晃至, 笠村啓司, 秋山哲也, 中島雄太, 中西義孝: 日本機械学会九州支部 第74期総会・講演会 (2021) 機械的除去加工による微細構造表面のシンプルな加工法
- 35) 中西義孝, 山口先, 伊賀颯人, 中島雄太, 藤原章雄: 日本トライボロジー学会 トライボロジー会議2021春 東京 (2021) 長周期うねり成分を含む相手面に対する樹脂の摩擦摩耗特性
- 36) Yoshitaka NAKANISHI, Nana MOTOJIMA, Kazuma SHIBATA, Keisuke NOGUCHI, Hajime YAMAGUCHI, Yusuke HIRATA, Yuta NAKASHIMA: Malaysian International Tribology Conference 2020 (2021) Micro-abrasive surface for producing microplastics for testing

- 37) 中西義孝, 山口先, 伊賀楓人, 土井悠太郎, 田代稜太, 中島雄太, 藤原章雄: 第36回 ライフサポート学会大会 (2021) 研究用マイクロプラスチック生産システムの構築
  - 38) 中西義孝, 中島雄太, 藤原章雄: 第36回 ライフサポート学会大会 (2021) マイクロチャンバーによるヒト末梢血由来単球マクロファージの食食作用解明
  - 39) 中西義孝, 山口先, 中島雄太, 藤原章雄: トライボロジー会議2021 秋 松江 (2021) 紫外線照射が樹脂の摩耗に及ぼす影響
  - 40) 武田恭佳, 伊賀楓人, 中島雄太, 藤原幸雄, 菰原義弘, 日野和典, 三浦裕正, 日垣秀彦, 中西義孝: 第48回日本臨床バイオメカニクス学会 (2021) 人工関節摩耗粉のヒト末梢血由来単球マクロファージによる食食評価システムの構築
  - 41) 中西義孝, 山口先, 笠村啓司, 中島 雄太: 第42回バイオメカニズム学術講演会 (2021) Bio-inspired表面の創生とその効果第4報: 3次元曲面加工対応装置の開発
  - 42) 田代稜太, 山口先, 中島雄太, 藤原章雄, 中西義孝: 第42回バイオメカニズム学術講演会 (2021) マイクロプラスチックがヒトの免疫に与える影響 第1報 研究用マイクロプラスチックの調整
  - 43) 土井悠太郎, 樋口勝識, 中島雄太, 藤原章雄, 中西義孝: 第42回バイオメカニズム学術講演会 (2021) マイクロプラスチックがヒトの免疫に与える影響 第2報: マクロファージ培養システムの開発
- (1) 「国民との科学・技術対話」の実施
- 1) QBキャピタル・技術交流会「さまざまな材質の大面積・3次元曲面上にBio-Inspired Surfaceを形成できるIoTグローバル分散システム」(主催: QBキャピタル合資会社、令和元年7月1日、SRPセンタービル、観客約50名)にて講演
  - 2) 2019年度第2回ガラス科学技術/評価技術合同研究会「三次元表面への機械的除去加工によるマイクロパターニング」(主催: 一般社団法人ニューガラスフォーラム、令和元年10月8日、日本ガラス工業センター地下会議室、観客約50名)にて講演
  - 3) 教育研修講演「工学的手法を用いた人工関節関連技術の開発」(主催: 第50回日本人工関節学会、令和2年10月27日、福岡国際センター、観客約50名)にて講演
  - 4) Interdisciplinary symposium「Bio-Tribology & Bio-inspired Surface」(主催: Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences、2020年8月22日、Shanghai Advanced Research Institute、観客約100名)にてオンライン講演
  - 5) 第42回研究会「マイクロプラスチック研究におけるマイクロ・ナノシステム」(主催: 化学とマイクロ・ナノシステム学会、2020年10月27日、熊本城ホール、観客約70名)にてオンライン講演
  - 6) シンポジウム「表面加工と摩耗」(主催: 日本臨床バイオメカニクス学会、2020年10月27日、朱鷺メッセ、観客約30名)にてハイブリッド講演
  - 7) 設計・ネットワーク最適化における新展開の検討研究会「親水性高分子の調整と応用」(主催: 金沢大学・JAIST、2021年2月19日、金沢大学、観客約40名)にてオンライン講演
  - 8) 14th Engineering Workshop between Shandong University and Kumamoto University in 2021「Practical applications in microfabrication technology」(主催: Shandong University, China、2021年12月10日、熊本大学、観客約90名)にてオンライン講演

#### (4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

**(5) 本研究費の研究成果による受賞**

- 1) 柴田司真, 中島雄太, 中西義孝: 日本機械学会若手優秀講演フェロー賞, Micro slurry-jet プロセスによる生体模倣表面の創製, 第30回バイオフィロンティア講演会, 令和元年7月20日
- 2) 中西義孝: 第1回SIIQ技術大賞(銀賞), さまざまな表面に「期待する機能を直接刻む」技術, 九州半導体・エレクトロニクスイノベーション協議会(SIIQ), 令和元年7月30日
- 3) 中西義孝: KUMAMOTO TECH PLAN GRAND PRIX 特別賞, 望む機能を材料に直接刻み込む“3-dSupreme”テクノロジー, 熊本県次世代ベンチャー創出支援コンソーシアム, 2020年7月18日



## IV. 英文Abstract

**Assessing the Influence of Microplastics on the Immune System with Bio-MEMS Technologies**

Principal Investigator: Yoshitaka NAKANISHI

Institution: Faculty of Advanced Science and  
Technology, Kumamoto University

2-39-1 Kurokami Chuo-ku Kumamoto, 860-8555 JAPAN

Tel: +81-96-342-3733 / Fax: +81-96-342-3733

E-mail: y-naka@mech@Kumamoto-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Macrophage, Immunology, histology, Bio-MEMS, Tribology

Plastic wastes can be fragmented into small debris. The ubiquitous presence of microplastics (MPs) in the environment is a cause for great concern. This study aimed to develop a method for producing MPs in the micrometer range for various biological tests, where the morphology and constituents of the MPs were guaranteed. The proposed production system was a pin-on-disc machine with multi-directional sliding motions. Pins made of polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride, or polyethylene terephthalate were pressed onto a quartz glass disc under the lubrication of artificial sea water. Micro-textured glass surfaces were prepared by the combined application of a masking process and a micro-slurry jet process for generating particles with various morphologies. Ultraviolet irradiation (UV: 280-315 nm) was performed through the glass disc to the sliding surfaces during fragmentations of the polymer plastics. The UV promoted the fragmentation of polymer plastics. The UV was believed to influence the equivalent circle diameters of MPs but did not affect the aspect ratios and complexity. Differences in the crystalline or amorphous plastic and the copolymer or condensation polymer might affect fragmentation speeds. The morphological aspects of the generated MPs are confirmed to be similar to those of the MPs collected and analyzed in our environments. The transfer and accumulation of MPs in the micrometer range to *Caridina multidentata* (Arthropod), *Eunicidae* (Arthropod), *Oryzias latipes* (Fish), and C57BL6 mice (Normal/Colitis model) were experimentally verified. The MPs were transferred to, and accumulated in, various living organisms. Transferring and microparticle accumulation were observed in not only the digestive system but also the other organs through the vascular system. Human monocyte-derived macrophages (HMDMs) phagocytize various MPs and secrete a number of proinflammatory cytokines. In in vitro experiments, the HMDMs are cultured in a medium with the MPs. However, the MPs suspend or hydrate in the medium or settle out in the medium. These microparticle phenomena show difficulty of elucidating the relationship between the microparticles administrated in a medium and the microparticles phagocytized by HMDMs. A micro-chamber with a height greater than 20 micrometers was fabricated, and the configuration enabled the MPs to pass nearby the HMDMs, which is important in the phagocytosis of MPs. By adopting the culture system, the observation of the phagocytic processing by HMDMs and the evaluation of the time-dependent change of secretion of cytokines were realized.