

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

研 究 区 分 : 革新型研究開発（若手枠）

研 究 実 施 期 間 : 2022（令和4）年度～2024（令和6）年度

課 題 番 号 : 1RF-2202

体 系 的 番 号 : JPMEERF20221R02

研 究 課 題 名 : 環境にやさしい材料設計に向けた高分子及び分解産物の生物影響の解析

Project Title : Analysis of Biological Effect of Polymer Molecules and Their Degradation Products for Designing Biosafety Materials

研 究 代 表 者 : 宮川 一志

研 究 代 表 機 関 : 宇都宮大学

研 究 分 担 機 関 :

キ ー ワ ー ド : 海洋プラスチック問題、生物影響、高分子分解産物、オオミジンコ、Adverse outcome pathway

注： 研究機関等は研究実施期間中のものです。また、各機関の名称は本報告書作成時点のものです。

令和7（2025）年11月



目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書	1
研究課題情報	3
<基本情報>	3
<研究体制>	3
<研究経費の実績>	4
<研究の全体概要図>	5
1. 研究成果	6
1. 1. 研究背景	6
1. 2. 研究目的	8
1. 3. 研究目標	8
1. 4. 研究内容・研究結果	9
1. 4. 1. 研究内容	9
1. 4. 2. 研究結果及び考察	12
1. 5. 研究成果及び自己評価	34
1. 5. 1. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献	34
1. 5. 2. 研究成果に基づく研究目標の達成状況及び自己評価	36
1. 6. 研究成果発表状況の概要	37
1. 6. 1. 研究成果発表の件数	37
1. 6. 2. 主要な研究成果発表	37
1. 6. 3. 主要な研究成果普及活動	38
1. 7. 国際共同研究等の状況	38
1. 8. 研究者略歴	38
2. 研究成果発表の一覧	39
(1) 産業財産権	39
(2) 論文	39
(3) 著書	39
(4) 口頭発表・ポスター発表	40
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施	40
(6) マスメディア等への公表・報道等	41
(7) 研究成果による受賞	41
(8) その他の成果発表	41
権利表示・義務記載	41

Abstract

研究課題情報

<基本情報>

研 究 区 分	革新型研究開発（若手枠）
研 究 実 施 期 間	2022（令和4）年度～2024（令和6）年度
研 究 領 域	統合領域
重 点 課 題	【重点課題 6】グローバルな課題の解決に貢献する研究・技術開発（海洋プラスチックごみ問題への対応） 【重点課題 15】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究
行 政 ニ ー ズ	（1-2）マイクロプラスチックの物理化学的特性の違いを考慮した生物影響の研究
課 題 番 号	1RF-2202
体 系 的 番 号	JPMEERF20221R02
研 究 課 題 名	環境にやさしい材料設計に向けた高分子及び分解産物の生物影響の解析
研 究 代 表 者	宮川 一志
研 究 代 表 機 関	宇都宮大学
研 究 分 担 機 関	
研 究 協 力 機 関	京都大学、東京科学大学

注： 研究協力機関は公開の了承があった機関名のみ記載されます。

<研究体制>

サブテーマ1「生体内における高分子の挙動の解析」

<サブテーマリーダー（STL）、研究分担者、及び研究協力者>

役割	機関名	部署名	役職名	氏名	一時参画期間
リーダー	宇都宮大学	バイオサイエンス教育研究センター	准教授	宮川一志	
協力者	京都大学	大学院工学研究科	教授	沼田圭司	
協力者	東京科学大学	物質理工学院	教授	佐藤浩太郎	

注： 研究協力者は公開の了承があった協力者名のみ記載されます。

サブテーマ2「環境にやさしい高分子材料設計へのフィードバック方法の確立」

＜サブテーマリーダー（STL）、研究分担者、及び研究協力者＞

役割	機関名	部署名	役職名	氏名	一時参画期間
リーダー	宇都宮大学	バイオサイエンス教育研究センター	准教授	宮川一志	

注： 研究協力者は公開の了承があった協力者名のみ記載されます。

＜研究経費の実績＞

年度	直接経費（円）	間接経費（円）	経費合計（円）	備考（自己充当等）
2022	5,400,000	600,000	6,000,000	
2023	4,620,000	1,380,000	6,000,000	
2024	4,616,000	1,384,000	6,000,000	
全期間合計	14,636,000	3,364,000	18,000,000	

注： 環境研究総合推進費の規定する研究経費の支援規模を超えた額は自己充当等によるものです。

<研究の全体概要図>

環境にやさしい材料設計に向けた高分子及び分解産物の生物影響の解析

研究代表者：宮川 一志

研究代表機関：宇都宮大学

背景

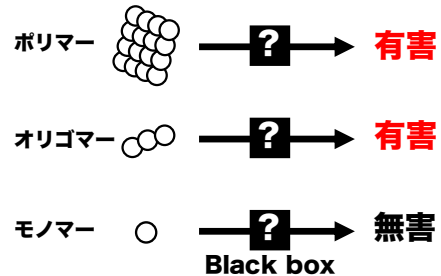
プラスチックの原料となる高分子材料およびその分解産物が生物に与える影響の解明は急務である（重点課題⑥）

問題点

- ・現状の高分子の毒性試験は生体内で物理化学的特性が異なる様々な分解物へと変化する過程を考慮できていない（行政ニーズ(1-2)）
- ・高分子やその分解産物の体内における振る舞いが完全にブラックボックス（重点課題⑤）

これまでの試験法

- ・生体内での分解を考慮しない
- ・生物影響の作用機序は不明

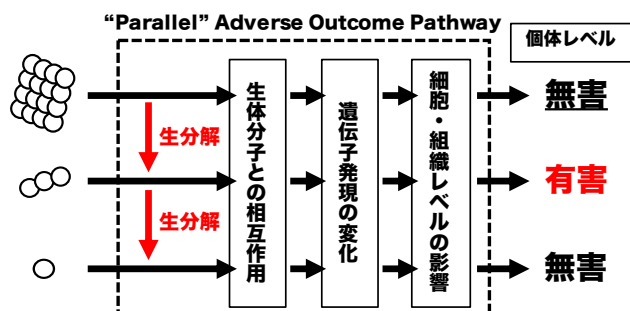
**本研究の目標**

高分子の分解・代謝を含む生体内での振る舞いを分子レベルで解明し、その知見を毒性試験や新規の高分子材料設計へと活用する基盤をつくる

研究課題の構成**サブテーマ1：生体内における高分子の挙動の解析**

- ・時空間的分解過程
- ・相互作用する生体分子
- ・遺伝子発現変化
- ・代謝に関与する酵素

Adverse Outcome Pathwayの構築

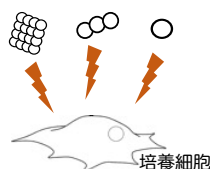


高分子毒性の詳細な
分子メカニズムの情報

サブテーマ2：環境にやさしい高分子材料設計へのフィードバック方法の確立

- ・毒性マーカー遺伝子
- ・レポーターアッセイ
- ・分解モデル

高分子のリスクを定量的に評価し、
材料設計へフィードバック



生物影響に基づいて
新規高分子材料の候補や
設計方法を提案

異分野研究者
(物理・化学・数理)
との有機的連携

高分子材料・分解物の提供
物性情報の提供

連携先：学術変革領域(B)
「高分子精密分解」

1. 研究成果

1. 1. 研究背景

1. 1. 1. 本研究課題に関連した国内外の環境問題の状況及び研究動向

軽量で加工しやすく、強度も高いプラスチックは我々の生活を助け豊かにしてきた。その一方で、プラスチックは原料である高分子材料の高い安定性によって使用後も分解されることなく環境中に長く滞留するため、海洋マイクロプラスチック汚染問題など、自然環境への悪影響が懸念されている。したがって、利用後のプラスチックをいかに速やかに分解し無毒化するかは重点課題⑥に示されるように現在社会が抱える現実的な課題である。さらに2022年3月の第5回国連環境総会再開セッション（UNEA5.2）において、2024年度末までの国際条約の策定を目指し海洋環境等のプラスチック汚染対策の議論を各国間で進める方針となった。UNEA5.2では決議案に日本の提案が多く反映されており、今後日本がプラスチック汚染問題対策を主導してゆくためにもプラスチックの分解と無毒化の研究の推進は急務であるといえる。国際条約については残念ながら2024年度末の合意には至らなかったが、2025年8月のINC-5.2でも引き続き議論が続けられることとなっている。

上記の課題の解決を目標として、代表者も参画する科研費・学術変革領域B「高分子材料と高分子鎖の精密分解科学」が令和2年度よりスタートした（令和5年3月終了）。当該学術変革領域では高分子の分解を物理劣化、化学分解、生物代謝に分割することで、高分子の分解機構が材料の階層構造と物性に与える影響を明らかにし、分解性を考慮した新しい高分子設計指針を生み出すことを目標としている。この目標は行政ニーズ（1-2）と完全に一致するものであり、同様の戦略目標のJST CREST・さきがけ領域が、代表者らの学術変革領域に追随する形で令和3年度からスタートしたことも、我が国の環境政策における重要性を示すものである。

代表者らの学術変革領域は高分子分解の学理の重要性にいち早く着目した画期的なものであるが、一方で基本的には高分子分解産物自体の物理・化学的性質の解明に注力している。そのため、生物に対する毒性の詳細な解析と評価は研究の主題ではなく、現時点では解析方法は単純な暴露試験にとどまっている。したがって、毒性の有無は判断できてもそのメカニズムまでは知ることはできず、材料設計へのフィードバックが難しいという、まさに重点課題⑤が扱う問題に現在直面している。この点は学術変革領域のアドバイザーからも将来的に克服すべき課題として指摘されている。

1. 1. 2. 本研究課題で克服すべき問題

生分解性プラスチックの環境リスク評価は主に微生物による分解速度や加水分解による自然分解の速度が基準となっており、数ヶ月に及ぶその分解過程で確実に様々な生物種の体内に取り込まれて影響を発揮する可能性があるにもかかわらず、それが考慮されているとは言い難い。生物試験が高分子材料設計において軽視されている背景には、もちろん微生物や酵素を使用する場合と比較して生物試験が高コストであることも大きい。それ以上に生物体内における高分子の振る舞いが完全にブラックボックスであり、たとえ有害影響が現れたとしてもそれをどう改善すればよいかについて全く指針を与えてくれない点が生物試験の致命的欠点であると考ええる。

上記の問題を解決し、環境にやさしい材料設計に貢献可能な生物試験システムを構築するために、本研究では近年OECDが化学物質の生物への影響を理解するための戦略指針として注力している「Adverse Outcome Pathway（AOP）解析」を実施する。AOP解析とは、化学物質が生物体内に取り込まれた際に、どのような生体分子と相互作用し生理機能を発揮することで最終的な個体レベルの毒性影響に至るのかという一連の流れを、分子・細胞・組織・個体という異なるスケールで連続的に理解しようとする試みである（Ankley et al., 2010）。

AOP解明によって毒性発揮の分子発生理機構が明らかになることで材料設計の方向性が明確に提案でき、またそのリスクを定量的に評価することが可能となる。しかしながら、本研究で扱う高分子には低分子化学物質では考慮する必要がなかった重要な相違点が存在する。それは、高分子材料は生物体内外において時間とともに分解され、物理化学的に全く異なる性質を持つ状態へと刻一刻と変化するという点である。このような高分子材料の性質を反映した新しい毒性影響モデルとして、代表者は異なる分解状態の高分子のAOPを並べたパラレルAOPモデルを本研究において提案する(図1)。本モデルでは生体内における高分子の分解過程を、並行する分解産物のAOPへの遷移として表すことができ、高分子を投与した際に実際には体内で分解された物質が毒性を示す場合など、従来のAOP解析では正確に扱いきれない事例にも対応可能となる。AOPを解析する対象生物種としては、本研究では世界中で毒性試験のモデル生物として使用されており、また代表者が次項1-3に記載する内分泌かく乱作用の研究で長年使用してきたオオミジンコDaphnia magnaを使用する。高分子のモデルとしては、主にポリカプロラクトン(PCL)を使用する。

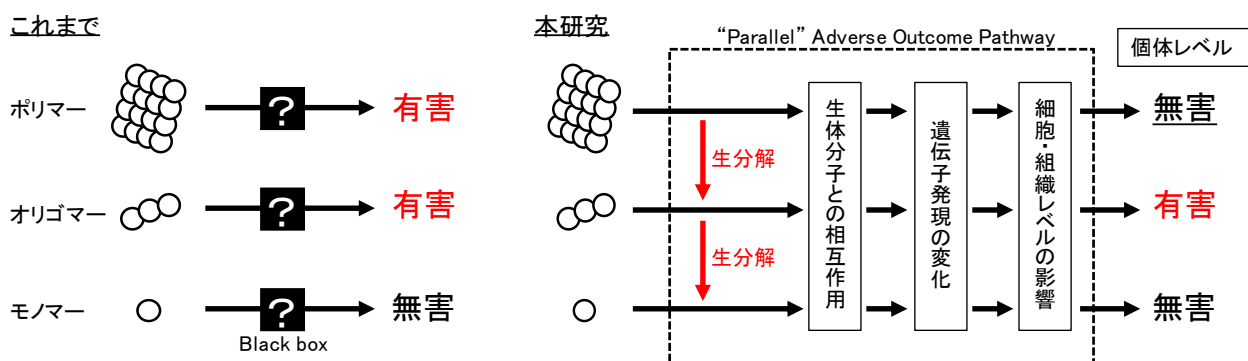


図1 本研究で提案する新しい高分子の毒性影響モデル。これまでの生物試験（左）では高分子の分解状態を考慮できず、また毒性影響のメカニズムも不明。本研究の平行AOPモデル（右）では、高分子およびその分解産物の毒性影響を分子から個体レベルまでの連続的な流れ（AOP）として扱うとともに、生体内における分解を分解産物のAOPへの遷移として表す。

1. 1. 3. 本研究課題と関連する代表者のこれまでの研究

代表者がこれまで幼若ホルモン（JH）によるミジンコの性のかく乱現象に着目し研究を行ってきた。淡水性動物プランクトンのミジンコは湖沼生態系において一次生産者（植物プランクトン）と高次消費者（魚など）の間を繋ぐ重要な役割を果たしており、湖沼環境の安定化に欠かせない動物である。ところが、近年殺虫剤として使用されているJHおよび人工的に合成したJH類似物質が、殺虫作用を示さない低濃度で暴露した際にミジンコの性のかく乱しオス化させることが明らかとなった（Tatarazako et al., 2003）。これはミジンコ個体群および湖沼生態系の壊滅につながりうる深刻な内分泌かく乱の事例である。そのためJH活性を持つ化学物質が不用意に野外で使用されることを防ぐべく、現在オオミジンコを使用した毒性試験法が整備されておりテストガイドライン（TG）211としてOECDに承認されている。しかしながら、単純に化学物質をミジンコに暴露し性比を確認する試験では、かく乱の分子機構に迫ることは不可能である。この状況を打開するために代表者はJHによるミジンコの性のかく乱のAOP解析に着手し、2013年にJHの毒性発揮の鍵となる受容体分子の同定に成功した（Miyakawa et al., 2013）。さらに受容体分子を用いたレポーターアッセイシステムを整備し、生物試験より遥かに簡便安価で迅速に、「受容体分子と相互作用するというメカニズムによってJH活性を示す分子」を検出できる試験管内毒性試験法を確立した（Tanaka et al., 2019）。代表者が確立し

たこの検出した物質の毒性作用機序が明確となる試験法は環境省の内分泌かく乱問題に対する取り組みであるEXTEND2016の報告書に掲載されたほか、産業界に活用してもらうべく環境アセスメント会社にも技術供与している。現在はさらに受容体の下流で働くシグナル経路の解明も進めており、代表者らの研究によってミジンコの性のかく乱現象のAOPの全貌が明らかになりつつある（Miyakawa et al., 2018a; 2018b）。これらの研究で培った、毒性物質暴露時に生体内で生じる変化（AOP）の解析と、その知見を用いた毒性物質検出手法の確立に関するノウハウを本研究課題にも活用する。

引用文献

- Ankley, G. T., et al. (2010) Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3), 730-741.
doi:10.1002/etc.34
- Miyakawa, H., et al. (2013) Nature Communications, 4, 1856. doi:10.1038/ncomms2868
- Miyakawa, H., et al. (2018a) Insect Biochemistry and Molecular Biology, 93, 12-18.
doi:10.1016/j.ibmb.2017.12.007
- Miyakawa, H., et al. (2018b) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 184, 62-68.
doi:10.1016/j.jsbmb.2017.12.006
- Tanaka, T., et al. (2019) Journal of Applied Toxicology, 39, 241-246. doi:10.1002/jat.3713
- Tatarazako, N., et al. (2003) Chemosphere, 53(8), 827-833. doi:10.1016/S0045-6535(03)00761-6

1. 2. 研究目的

より安全な高分子材料（プラスチック）を開発し海洋プラスチック汚染問題等の根本的解決につなげるべく、いまだに明らかになっていない高分子およびその分解産物が生物に示す毒性影響の発生メカニズムを生体内における分解挙動とともに連続的に明らかにする。さらに得られた知見を活用して生物毒性を回避するための高分子材料の設計・改変指針を提示する。

1. 3. 研究目標

<全体の研究目標>

研究課題名	環境にやさしい材料設計に向けた高分子及び分解産物の生物影響の解析
全体目標	環境指標生物であるオオミジンコを用いて、プラスチックなどの高分子材料およびその分解産物が生物に示す毒性影響の発生メカニズムを、生体内での分解挙動とともに分子レベルで連続的に明らかにすることで、生物毒性を正確に評価する手法を確立し、毒性回避のための高分子材料の設計・改変指針を明確に提示する。

<サブテーマ1の研究目標>

サブテーマ1名	生体内における高分子の挙動の解析
サブテーマ1実施機関	宇都宮大学

サブテーマ1 目標	<p>生体内に取り込まれた高分子が時間とともにどのように分解され、どのような分解産物がどの組織に蓄積するか、その時空間動態を明らかにする。得られた結果から毒性に主に寄与する分解産物について、結合する生体内分子・発現が誘導される遺伝子・代謝に関与する酵素群を探索し、明らかにする。これらの研究で得られた情報を、生体内の分解挙動を反映したAdverse Outcome Pathway（パラレルAOP）として整理し、サブテーマ2に提供する。</p> <p>サブテーマ1の研究項目</p> <p>① 生体内に取り込まれた高分子の時空間的分解過程の解明</p> <p>② 生体内で高分子および分解産物と直接相互作用する生体分子の同定</p> <p>③ 高分子を取り込んだ際に生じる遺伝子発現の変化の解明</p> <p>④ 取り込んだ高分子の代謝に関与する生体内酵素群の探索</p>
-----------	--

<サブテーマ2の研究目標>

サブテーマ2 名	環境にやさしい高分子材料設計へのフィードバック方法の確立
サブテーマ2 実施機関	宇都宮大学
サブテーマ2 目標	<p>サブテーマ1で得られた情報をもとに、毒性高分子分解産物に誘導される遺伝子の発現や代謝酵素の活性を検出することを原理とした毒性高分子のスクリーニング手法を開発する。同様にサブテーマ1で得られた生体内分子との相互作用情報をもとに、関与する官能基等を置換しその毒性を解析したり、体内における代謝スピードから要求される自然分解のスピードを見積ることで、毒性回避に向けた新規高分子のデザインを実践する。</p> <p>サブテーマ2の研究項目</p> <p>⑤ 高分子材料の生物毒性を正確に評価する新規試験法の確立</p> <p>⑥ 新たな高分子材料の設計・改変指針の創出</p>

1. 4. 研究内容・研究結果

1. 4. 1. 研究内容

1. 4. 1. 1. 課題全体の研究内容

この研究課題では、高分子の生物毒性の理解に資する基礎的知見を獲得し、その知見をもとに信頼性の高い高分子の毒性試験方や材料設計指針を見出すことを最終目標としている。そのために、サブテーマ1ではポリカプロラクトン（PCL）などの高分子を対象とし、高分子やその分解で生成されることが想定される化学物質が環境指標生物であるオオミジンコにどのような影響を与えるか、さらにはその影響がどのような機構で発揮されるかを解明すべく実験を行った。続いてサブテーマ1で得られた知見をもとに、サブテーマ2ではより信頼性の不溶性分子の毒性試験法を確立し、高分子材料の設計に貢献しうる統合的な毒性発揮機構のモデルを構築した。

1. 4. 1. 2. 【サブテーマ1】生体内における高分子の挙動の解析

実験① PCL分解産物の生物毒性の解析

近年ミジンコや魚類などの環境指標生物を用いてプラスチック材料などの高分子の毒性を解析する研究は世界中で急速に増えつつある(Rosenkranz et al., 2009; Rehse et al., 2016; Barboza et al., 2018; Kelpsiene et al., 2020)。しかし一方で、試験条件はいずれもサイズや形状が規格化された単一の物質について濃度（あるいは粒子数）を振るのみであり、高分子材料の分解状態によって毒性が変化する可能性はほとんど考慮されていない。また試験は急性毒性を調べるものがほとんどであり、繁殖に対する影響など生物

の生涯を通じてどのような影響が見られるかは依然として不明である。高分子材料の分解に伴う物性の変化が長期間の生物の生命活動にどのような影響を与えるかという視点は、高分子材料のリスクを正確に評価する上で重要である。

このような背景のもと、本実験では代表的な生分解性プラスチックであるポリカプロラクトン（PCL）を対象とし、PCLが環境中で分解された際に生じることが予想される物質の生物毒性を、環境指標生物のオオミジンコを用いて詳細に調べた。想定される分解産物としては、ポリマー骨格が切断されたオリゴカプロラクトン（OCL）、モノマー、および加水分解による劣化を抑えるために工業的にポリエステルを合成する際に一般的に添加されるカルボジイミドを選定し(Martelli et al., 2013; Stloukal et al., 2016)、それぞれをオオミジンコに暴露して急性および慢性毒性を調べた。毒性試験はOECDテストガイドライン211に従ったが、不溶性物質については試験中の沈降を考慮し、ローテーターを用いて5 rpmで常時容器を回転させた。

実験② PCLの生体内局在解析手法の確立

体内に取り込まれた高分子が生体内のどの部位に蓄積し毒性を発揮しているかはいまだに不明な点が多い。これは、特定の構造の高分子及び分解産物を生体内から部位特異的に検出する手法が乏しいことが原因である。本実験ではこれを解決すべく、MALDI-TOF-MSによるイメージングMSでミジンコ体内のPCL局在解析を行った。

実験③ RNA-Seqによるカルボジイミドの毒性発揮分子機構の解明

実験①の結果（「研究結果及び考察」参照）、PCL合成時に加水分解抑制剤として一般的に添加されるカルボジイミドが、産仔の完全な停止や致死といった強い毒性影響を発揮することが明らかとなった。特に医療用や食品用のポリマーの合成に用いられ、毒性が低いと考えられてきた1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) が(Cardoso et al., 2012; Park et al., 2002)、1-10 mg/Lの暴露で明確にオオミジンコの生存率の低下と産仔の抑制を引き起こした点は驚くべきことである(成果2)。これは、添加物は高分子化合物が分解される際に流出し、場合によっては高分子化合物そのものやその直接的な分解産物よりも強い毒性を示す可能性を示唆するものである(Tian et al., 2021)。

一方で、このような生物試験によって毒性の有無は明らかにできても、暴露された生物体内でそれがどのように振る舞うかについては完全にブラックボックスである。したがって、カルボジイミドやそれを含む高分子の生態リスクを正確に理解するためには毒性発揮の分子機構(Adverse Outcome Pathway: AOP)を明らかにする必要がある(Ankley et al., 2010; Vinken et al., 2017)。本実験では我々が新たにオオミジンコに対する毒性を見出したカルボジイミドEDCに着目し、EDCがどのようなメカニズムで個体の死亡や産仔数の低下を引き起こしているかを理解すべく、EDC暴露後にオオミジンコ体内で経時的に発現の変動する遺伝子をRNA-seqによって網羅的に解析した。

1. 4. 1. 3. 【サブテーマ2】環境にやさしい高分子材料設計へのフィードバック方法の確立

サブテーマ1の結果を踏まえ試験法の確立を目指す本サブテーマは、当初はレポーターアッセイや人工合成した高分子を用いた実験を計画していた。しかし、サブテーマ2に本格的に取り掛かる直前の2023年9月に代表者の研究室が他研究室で生じた火災に巻き込まれ、2ヶ月以上実験が一切できない状態になってしまった。多くの機器や消耗品類が焼失・汚損したため、当初の実験は設備的にも経済的にも実行不可能と判断し、POおよびアドバイザーに相談の上、現有設備と予算で実行可能かつ最終目標の達成につながる以下の実験④を行うこととした。

実験④ 不溶性物質の安定的な試験法の確立と、それを用いたポリスチレンマイクロビーズのサイズ依存的毒性の発揮機構の解明

マイクロプラスチックは自然環境中に広く偏在しており、多くの先行研究によって水性生物種に悪影響を引き起こすことが示されている (Geyer et al., 2017; de Sá et al., 2018; Triebkorn et al., 2019; Uddin et al., 2021)。この影響の評価には生物試験が有効であるが、もともと水に可溶な低分子化学物質の評価を目的に確立された試験法をマイクロプラスチック評価に用いる際には複数の問題が存在する。

第一の問題は、マイクロプラスチック粒子の不均一性である。現在までに行われた生物試験の多くには均質で球状のマイクロプラスチック粒子が用いられている。しかしながら、様々な種類の製品に由来するマイクロプラスチックは、形状や粒子特性の異なる様々なポリマーやその分解産物で構成される混合物であるため、その物理的毒性は単純な球状の粒子を同濃度で暴露した際とは異なる可能性がある (Lambert et al., 2017; Burns & Boxall, 2018; Rochman et al., 2019)。実際、オオミジンコにおいて、不均一な形状のマイクロプラスチックは球状の均一なマイクロプラスチックよりも急性毒性 (Frydkjær et al., 2017) や慢性毒性影響が強いことも示されている (Ogonowski et al., 2016)。

第二の問題は、オオミジンコを含む多くの水生生物の試験で用いられる半止水式試験法が水に不溶性物質の試験を全く想定していない点である。小型の容器に飼育水と試験生物、および試験物質を加え、数日おきに飼育水ごと試験物質を新しいものに置換する半止水式試験法では、不溶性のマイクロプラスチック粒子は数分のうちに容器の底に沈降してしまい安定的に生物に暴露することができない。第一の問題として示した粒子の不均一性を考慮して試験を行ったとしても、半止水式試験法を用いている限り正確な暴露は困難であり、得られた結果の信憑性に問題が生じる。

この半止水式試験法をマイクロプラスチックの毒性評価に用いる際の問題点を解決する方法として、代表者は実験①においてローテーターを用いて5 rpm程度の低速で常時回転浸透させながら暴露する手法を確立した (成果2)。この手法を用いることで、従来の半止水式試験法と比較してデータのばらつきが格段に抑えられ、また従来法が毒性を過大評価してしまう可能性を示した。安定的なデータが得られるこの手法を用いて、生分解性プラスチックの代表格であるポリカプロラクトン (PCL) のポリマー粒子を100 mg/Lでオオミジンコに暴露した際に、生存率の低下や産仔数の減少といった毒性影響が現れることを明らかにした (成果番号2)。

本実験では代表者の確立したローテーターを用いた安定的な半止水式試験法を用いて、マイクロプラスチックの毒性を理解する上での大きな問題である、粒子の不均一性が毒性に与える影響を再検討する。実験ではまず、異なる粒子サイズのポリスチレンマイクロビーズを、単独で、もしくは含まれる粒子の割合を変えながら混合してオオミジンコに暴露して毒性を評価した。続いて、発生段階に応じて暴露する粒子のサイズを変化させ毒性を評価することで、マイクロプラスチックの毒性にサイズ依存的な発生段階特性が存在するかを調べた。得られた結果をもとに、マイクロプラスチックの粒子サイズの不均一性が生物毒性に影響するメカニズムについて考察した。

1. 4. 2. 研究結果及び考察

1. 4. 2. 1. 個別の実験の結果および考察

実験① PCL分解産物の生物毒性の解析（成果1、2、3、6、7、8）

【結果】

PCLは、ポリマーは市販品をクロロホルムに溶解し、エタノールで析出させ微細粉末状にしたものを使用した。モノマーは市販品の6-ヒドロキシカプロン酸（6-HCa）と ϵ -カプロラクトン（ ϵ -CL）を使用した。オリゴマーであるオリゴカプロラクトン（OCL）は重合度10のもの（OCL_{10OH}）と重合度4のもの（OCL_{4Ac}）を合成して使用した（東京工業大学、佐藤教授の協力）。OCL_{4Ac}は末端をアセチル化したものを使用した。カルボジイミドは市販品のN,N'-dicyclohexylcarbodiimide（DCC）、N,N'-diisopropylcarbodiimide（DIC）、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide（EDC）の3種を用いた（図2）。

PEG、PGA、およびそれらの分解産物は可溶物質の通常上限濃度である10 mg/Lにおいて完全に溶解しており、この濃度でミジンコに暴露した際に死亡率および生涯産仔数に影響が見られなかったため、毒性は低いと判断した。

PCLではおおよそ1 mg/L以上の暴露濃度において明確な溶け残りが確認できたため、ローテーターを使用して試験期間中攪拌を行なった。まず、PCL、およびそのポリマー骨格が切断されたOCL、モノマーである6-HCaと ϵ -CLについて、OECDテストガイドライン211に従って21日間の暴露試験を行なった。結果、PCLでは33.3 mg/L以下の暴露濃度ではコントロールと比べて有意な変化は見られなかったが、100 mg/L暴露において、総産仔数が半減した（図3）。このとき、暴露された個体は9日目前後から死にはじめ、試験終了時の生存率は30%以下であった。ローテーターを使用しなかった場合、使用した場合と比較して個体ごとの結果に大きなばらつきが生じた（図4）。OCL_{10OH}とOCL_{4Ac}の二つのOCLsの結果は類似したものとなり、いずれも30 mg/L以下で総産仔数、生存率ともにコントロールと有意な差は見られなかった。6-HCaと ϵ -CLの結果も互いに類似したものとなり、50 mg/L以下の暴露濃度ではコントロールと比べて有意な変化は見られなかったが、100 mg/L暴露において、総産仔数がほぼゼロとなった。ほとんどの個体が暴露後24時間以内に急性毒性によって死亡しており、生き残った個体においてもほとんど産仔を行わなかった。

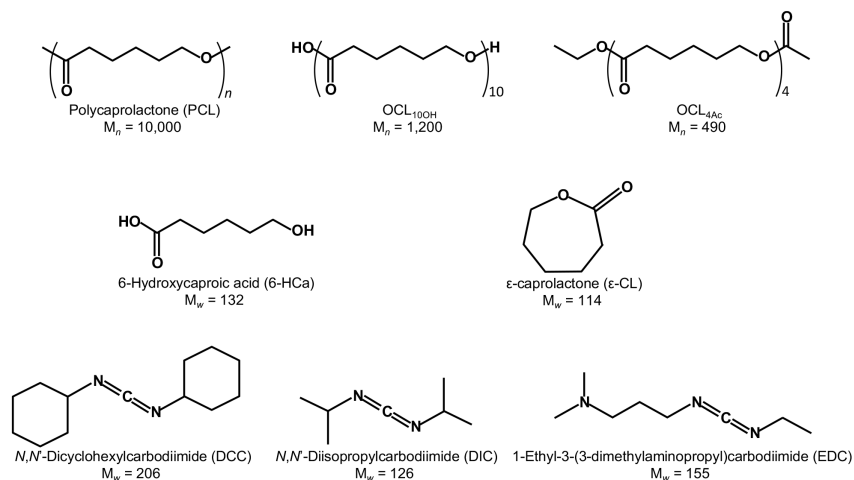


図2 本実験で暴露したPCLおよびその分解産物とカルボジイミド

続いてカルボジミドの暴露試験を同様の手順で行った。パイロット試験の結果、DCCとDICは0.1から1 mg/Lの間で、EDCでは1から10 mg/Lの間で、極端な産仔数の減少と生存率の低下が確認されたため、これらの濃度範囲でより細かく暴露濃度を設定して試験を行なった。その結果、DCC、DIC、EDCそれぞれ0.25、0.50、2.5 mg/Lにおいて顕著な総産仔数の減少が見られた。また、これらより高い濃度では暴露後数日で多くの個体が死亡する急性毒性が見られた（図5）。

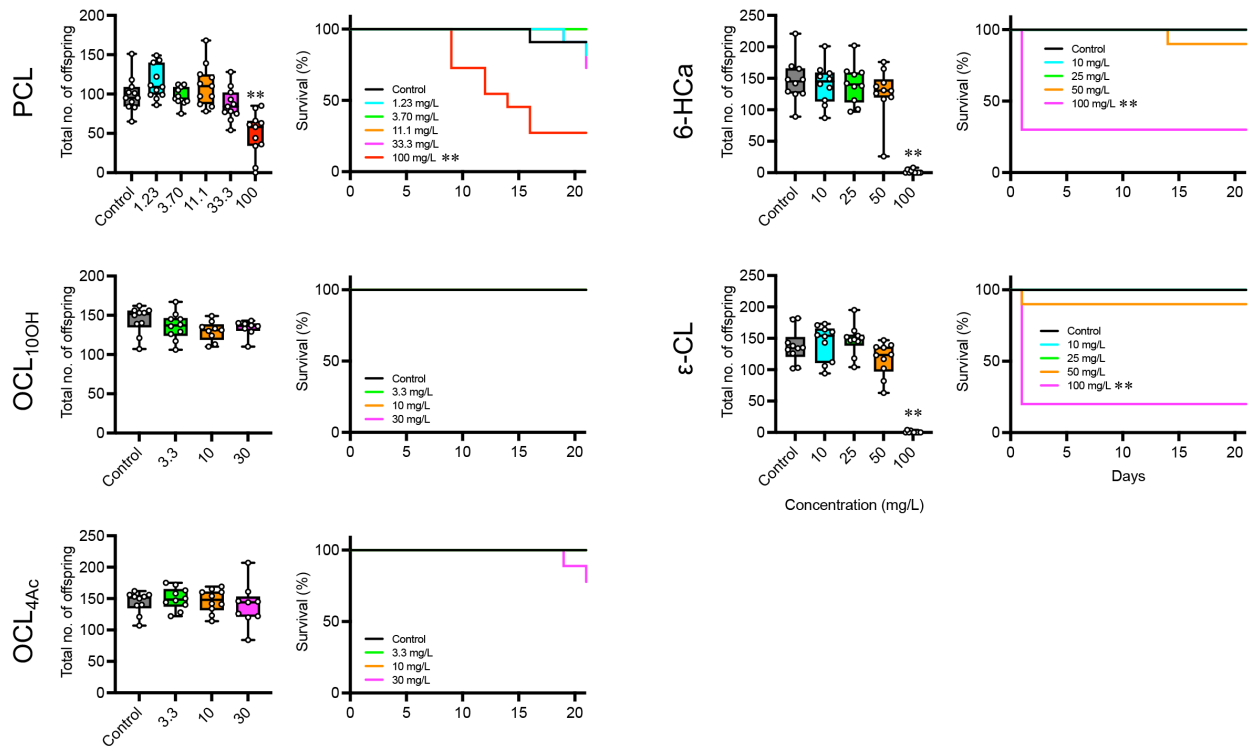


図3 PCLおよび分解産物の産仔数と生存率への影響。

**: $p < 0.01$ でコントロールと有意差あり。

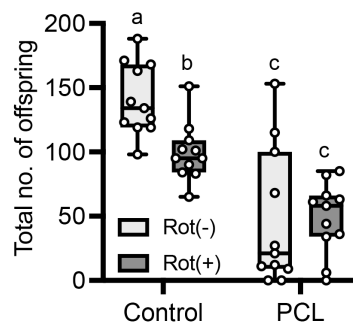


図4 ローテーター使用の影響。PCL濃度は100 mg/L。

異なるアルファベットの処理区間では $p < 0.05$ で有意差あり。

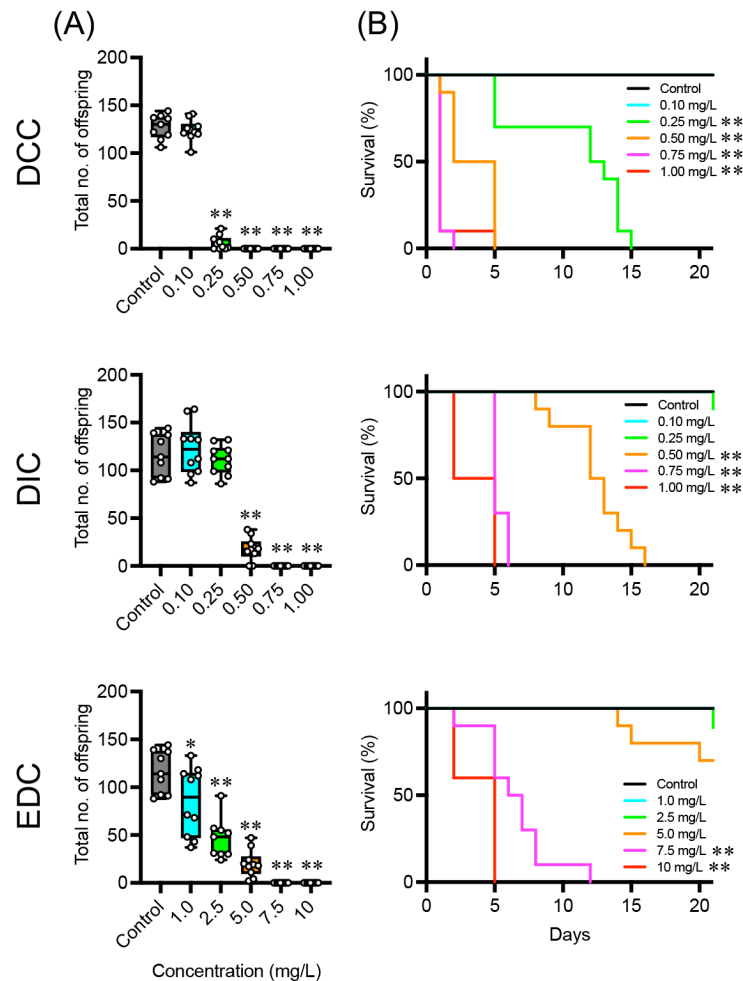


図5 カルボジイミドの産仔数 (A) と生存率 (B) への影響。

*, **: それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ でコントロールと有意差あり。

影響が見られた濃度において、生存個体の外部形態を観察したところ、カルボジイミドを暴露された個体では顕著な成長の遅延が見られた。一方PCL100 mg/Lを暴露された生存個体は若干の成長遅延と放卵数の減少が認められたものの、おおむね正常な形態をしていた。しかし、体の表面に多数のPCL粒子が付着しており、消化管内にも詰まっている様子が観察された（図6）。

【考察】

カルボジイミドは添加することでポリエステルに限らず様々な高分子の重合反応を促進し、また加水分解耐性や熱分解耐性を高めることができるため、様々な構造のものが開発され広く使用されている (Williams & Ibrahim, 1981)。DCCとDICはマウスを使用した試験で経皮毒性や発がん性を示すという報告がある (Hayes et al., 1998; Kato et al., 2002; Surh et al., 2012)。EDCについては現在のところ毒性は低いとされており、医療用や食用のポリマー合成も含め、DCCやDICよりも幅広く使用されている (Park et al., 2002; Cardoso et al., 2012)。今回、オオミジンコを用いた毒性試験の結果、カルボジイミドであるDCCとDICのみならず、EDCにも明確な毒性が確認できた。ポリマーを合成する際に、これらのカルボジイミドは数%程度添加されている (Martelli et al., 2013; Stloukal et al., 2016)。DCCやDICは1 mg/L以下でもオオミジンコに対して非常に強い毒性を示しているため、環境中や生体中で分解されたプラスチックから流出したカルボジイミドが生物に悪影響をもたらす可能性は否定できない。カルボジイミドのリスクを正確に判断するた

めに、実際にポリマーが分解された際にどの程度流出するかを今後詳しく調べる必要がある。また、カルボジイミドの毒性の分子メカニズムは今回の実験では知ることはできない。同じカルボジイミドのグループではあるが、DCC、DIC、EDCのそれぞれで異なる作用機序でミジンコに作用している可能性もある。哺乳類培養細胞を用いた実験より、EDCは二本鎖DNAの鎖間架橋によって細胞周期を乱し、細胞毒性を発揮するとの報告もあるため(Moshnikova et al., 2006)、ミジンコ生体内でも同様の現象が生じているのかもしれない。

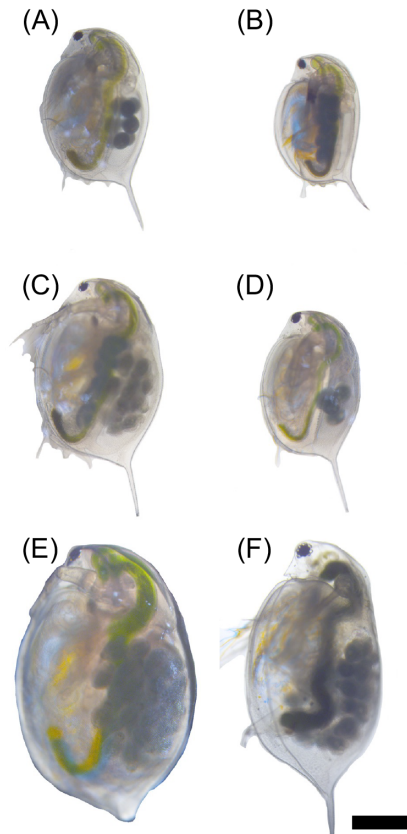


図6 試験個体の顕微鏡像。

(A) コントロール5日目。(B) 0.75 mg/L DIC暴露5日目。(C) コントロール9日目。
(D) 7.5 mg/L EDC暴露9日目。(E) コントロール19日目。(F) 100 mg/L PCL暴露19日目。
スケールバーは1 mm。

本実験に用いたPCLは、もとは市販品でありカルボジイミドが添加されている可能性があるが、一度クロロホルムに溶解する過程でそれらは取り除かれるためその影響は考慮する必要はない。またOCL合成過程ではカルボジイミドは使用していない。PCLおよびそのポリマー骨格が分解されたOCL、モノマーである6-HCa、 ϵ -CLについての毒性試験では、まずPCLが100 mg/Lの高濃度の場合に毒性が確認された。我々の以前の研究よりPCLの水に対する溶解度は25℃で10 mg/Lであるため、本実験では少なくとも11.1、33.3、100 mg/Lの3つの濃度区において、溶解しているPCLは飽和状態であると考えられる。にもかかわらず、毒性は100 mg/Lでのみ現れていることから、この毒性は水に溶けずに浮遊している粒子状のPCLによる物理的影響であると予想され

る。形態観察ではPCLが個体周辺や消化管内に多数存在することが確認できた。毒性の詳細なメカニズムは不明だが、餌を濾し取るための胸脚に付着したり、消化管内に詰まることで摂食が阻害されていることが原因かもしれない。一方で、同じ濃度で暴露しても強い毒性が現れた個体もいれば、消化管内や体表にPCLが確認できていながら全く影響が見られない個体もいた。暴露しているPCL粒子が不均一であることから、毒性が生じやすい特定の形状やサイズが存在していて、そのような粒子を多く取り込んだ個体に強い影響が出ているのかもしれない。近年簡単に入手でき、蛍光によって追跡も容易なポリスチレンビーズがプラスチックの毒性試験に広く用いられており、ミジンコにおいても例外ではない (Nasser & Lynch, 2016; Burn et al., 2017; Cui et al., 2017; Kelpsiene et al., 2020)。しかしながら、市販のポリスチレンビーズはサイズや形状が高度に均質化されており、自然環境で生じたプラスチック片の現状を全く反映していない。今後は粒子の単純な濃度／密度だけではなく、形状により着目した解析が必要になると考えられる。

我々の以前の研究ではOCL_{40H}がミジンコに対して比較的強い毒性を示していた。一方今回OCL_{40H} やOCL_{10Ac}については顕著な毒性は確認できなかった。ミジンコにおける毒性発揮には主鎖の繰り返し数とともに末端構造が重要であると考えられ、分解時に生じる産物の末端構造の制御によって高分子の生態リスクを低減できる可能性がある。またモノマーに関しては100 mg/Lで毒性が見られているが、PCLとは異なりほぼ完全に溶解した上でOECDテストガイドライン211の一般的な上限濃度 10 mg/L以上であることから、毒性は低いと言える。

本実験の結果から予想された、PCLの分解過程によって生じる産物がミジンコに与える毒性について図7にまとめる。まず、水に溶けないPCLは高濃度で暴露された際に消化管に詰まるなどの作用を引き起こし、物理的毒性を発揮する。PCLが分解されたOCLは可溶か不溶かはその分解の程度や水温によって異なる。OCLsは末端構造によっては毒性を発揮する可能性が考えられる。また、可溶性状態で細胞内に取り込まれたのちに凝集し不溶化することで強い毒性を発揮する可能性もあり(成果1)、その毒性の全貌理解には今後さらなる研究が要求される。さらに分解されたモノマーの毒性は低い。さらに、これらポリマー主鎖の分解とともに、添加物のカルボジイミドが流出する。カルボジイミドは可溶性低分子であり生体内に取り込まれて生理的毒性を発揮する。

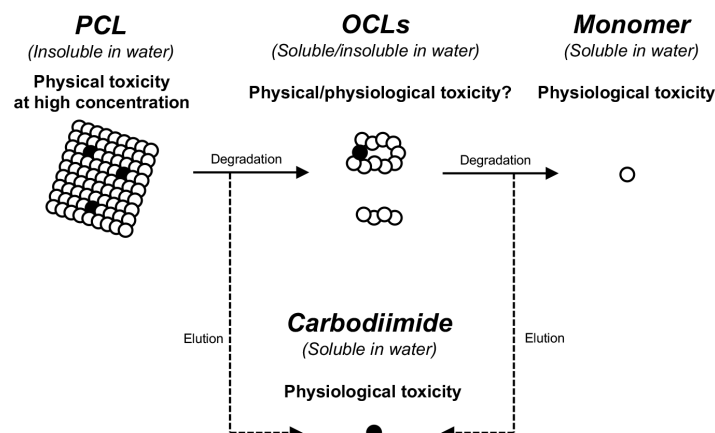


図7 本実験から予想されるPCLおよび分解産物のミジンコに対する毒性。

実験② PCLの生体内局在解析手法の確立（成果6、10）

【結果】

PCLに暴露したミジンコをゼラチンに包埋し、凍結切片を作成した。作成した切片にマトリックスを噴霧し、MALDI-TOF-MSを用いてイメージングした。その結果、ミジンコ生体内からPCLのポリマーの繰り返し単位である分子量114の幅を持ったMSが検出された。これらのMSのうちいくつかを選択し、切片上にイメージングして重ね合わせることで、PCLポリマーの存在部位を示すことができた（図8）。

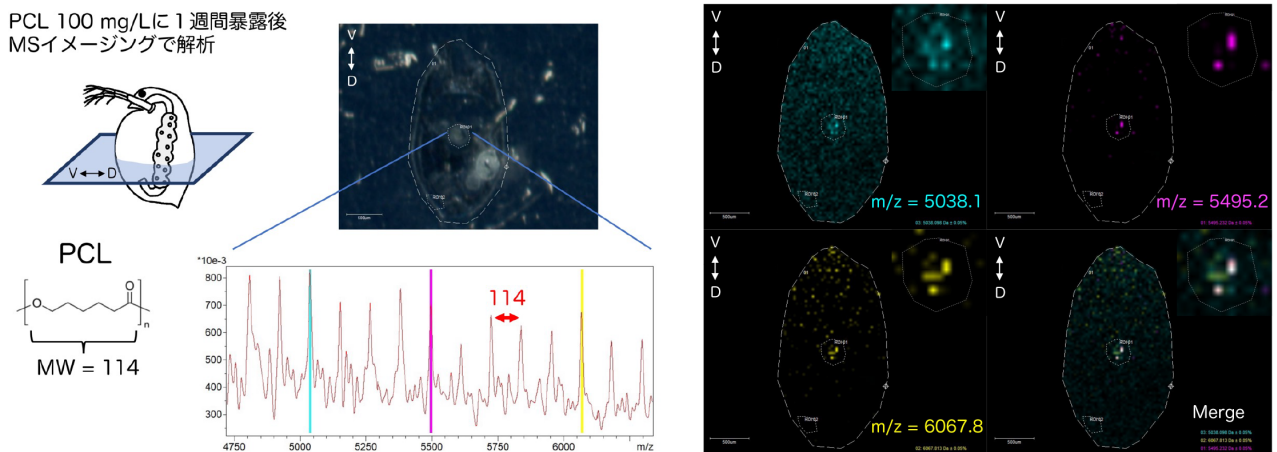


図8 MSイメージングによるPCLの生体内局在の解析。PCL由来の複数のMSピークをイメージングし、重ね合わせることで信頼性の高いイメージング像が得られる。

【考察】

本実験の結果より、MALDI-TOF-MSを用いたMSイメージングが生体内の高分子の局在解析に有効であることが示された。また、PCLのシグナルがミジンコの消化管から強く検出されたことから、実験①-2の予想と同じく、不溶物質であるPCLが消化管内に多く蓄積しており、それがミジンコに悪影響を与えていると予想された。今後は生体内で局在だけでなく分解による分子量の変化も追跡できるようにするため、得られたMSスペクトルから高分子の分子量分布をいかにして推定してゆくかが課題である。

実験③ RNA-Seqによるカルボジイミドの毒性発揮分子機構の解明（成果4、9、10）

【結果】

暴露試験の結果、EDCは5 mg/L 以下の濃度の暴露であれば21日間の試験終了時に大部分の個体が生存していたが、7.5 mg/Lを超える濃度で暴露すると、生存する個体は現れなかった（図9）。一方平均総産仔数は最低濃度の1 mg/Lにおいてもコントロールと比較して減少しており、その影響は濃度依存的に大きくなった（図9）。これらの結果は過去の同様の実験であるMatsumoto et al. 2023（成果2）の結果と完全に一致していた。この結果を元に、以降の遺伝子発現解析では、多くの個体が生存する一方で、総産仔数が著しく減少する5.0 mg/Lの濃度でEDCを暴露することとした。

RNA-Seqでは全てのサンプルにおいて、フィルタリング後18,000,000を超える数のペアエンドリードが得ら

れ、いずれのサンプルのマップ率も95%を上回った。PCA解析の結果、コントロールではいずれのタイムポイントでも生物学的繰り返し間のばらつきが小さかった一方で、EDC処理では5日目や14日目のサンプルにおいて繰り返し間でのばらつきが見られ、また対応する日にちのコントロールと離れた位置にプロットされた(図1 0A)。各タイムポイントにおいてコントロールとEDCの間でFDR < 0.05で発現差のある遺伝子を解析すると、2日目では741個、5日目では336個、9日目では443個、14日目では69個となった(図1 0B)。また、全てのタイムポイントにおいてEDCの暴露で発現が上昇したる遺伝子は2つ、発現が低下した遺伝子は1つであった(図1 0B)。

G0エンリッチメント解析の結果、EDC暴露で有意に発現上昇した遺伝子群で濃縮されたG0タームは2日目では64個、5日目では9個、9日目では45個、14日目では0個であり、逆に有意に低下した遺伝子群で濃縮されたG0タームは2日目では14個、5日目では58個、9日目では18個、14日目では0個であった(図1 1A)。

KEGG Gene set enrichment analysis (GSEA) の結果、EDC暴露で有意に活性化されたパスウェイは2日目では19個、5日目では1個、9日目では2個、14日目では1個であり、逆に有意に抑制されたパスウェイは2日目では10個、5日目では3個、9日目では6個、14日目では3個であった。また、全てのタイムポイントにおいてEDCの暴露で抑制されたパスウェイが1つあった(図1 2A)。

【考察】

成果2ではEDCを5 mg/Lで暴露することで、産仔数の激減という顕著な慢性毒性が引き起こされたが、本実験でもそれが完全に再現できた。この産仔数の減少がどのような分子機構で引き起こされるかを解明するべくRNA-Seq解析を行い、EDC暴露に応じて発現の変化する遺伝子を2日目(急性毒性の指標)、5日目(幼生期)、9日目(性成熟付近)、14日目(完全性成熟)という発生段階ごとに見出した。毒性によって形態的な差異が大きく現れる14日目において、多数の遺伝子の発現に差が生じていると考えられるが、予想に反して有意な発現変動を見せた遺伝子は全タイムポイントの中で14日目是最も少なく、逆にこの濃度では表現型にほとんど差が見られない2日目是最も多くなった(図1 0B)。PCAより、これはEDC暴露群では暴露から時間が経ち成長が進むにつれて個体間で毒性影響の出方にばらつきが生じ、生物学的繰り返し間での差異が大きくなったことが要因と考えられる(図1 0A)。したがって以降では、EDC暴露直後であり毒性機構解明の鍵となる初期応答遺伝子が含まれると考えられ、また解析の精度が高いと考えられる2日目のデータに主に着目し考察する。

本実験では、EDC暴露によって小胞体ストレス応答が誘起されている可能性が強く示唆された。Endoplasmic reticulum (ER)はタンパク質の合成やfolding、糖鎖付加などの修飾、細胞膜脂質の合成など非常に多くの機能を果たす細胞内小器官である(Schwarz & Blower, 2016)。細胞内外からの刺激によって細胞内の環境が変化し、その結果ERが正常なfoldingや修飾をされたタンパク質を作れなくなってしまう状態をERストレス状態と呼び、このERストレスを軽減する生物に広く保存された反応をERストレス応答と呼ぶ(Patil & Walter, 2001; Ma & Hendershot, 2001; Urade, 2007; Schwarz & Blower, 2016)。小胞体ストレス応答が生じると、(1)異常タンパク質を増やさないために翻訳が抑制され、(2)異常な折りたたみや修飾を分子シャペロンの働きによって修正し、(3)処理しきれないタンパク質についてはER associated degradation (ERAD)で分解する(Mori, 2000)。我々のKEGG GSEAの結果、Ribosome (dmk03010)が顕著に抑制されていた(図1 2B)。その詳細を確認すると、100以上の数が存在するribosomal protein遺伝子の実に75%以上において、その発現が低下しており、翻訳が抑制されていることが示唆された。続いて同じくKEGG GSEAより、Protein processing in endoplasmic reticulum (dmk04141)が活性化していることが示された(図1 2B)。これはまさに異常な構造のタンパク質を修正するために、積極的にタンパク質のfoldingや修飾が行われていることを示唆しており(Patil & Walter, 2001; Ma & Hendershot, 2001; Urade, 2007; Schwarz & Blower, 2015)、修飾のための糖鎖合成が活発に行われていることが、N-Glycan biosynthesis (dmk00510)、Various types of N-

glycan biosynthesis (dmk00513)、Mannose type O-glycan biosynthesis (dmk00515)がいずれも活性化していることから支持される(図1 2B)。さらに、G0エンリッチメント解析により、EDC暴露で発現上昇した遺伝子群において、proteolysis (G0:0006508)、peptide metabolic process (G0:0006518)が有意に濃縮されており(図1 1B)、不要なタンパク質をERAD経路で積極的に分解・排除していると予想される。この他にERストレス応答を示唆するものとして、セラミドなどのスフィンゴ脂質代謝に関する遺伝子発現の変化が挙げられる。セラミドやそれに糖が付加されたグリコシルセラミドはERで合成される、細胞膜を構成する重要な成分の一つであるが(Russo et al., 2018)、その量が増加することでERストレスが誘起されることが知られている(Park & Park, 2020)。G0エンリッチメント解析ではsphingolipid catabolic process (G0:0030149)、carbohydrate metabolic process (G0:0005975)、ceramide metabolic process (G0:0006672)がEDC暴露で発現上昇した遺伝子群において有意に濃縮されていた(図1 1B)。またKEGG GSEAではSphingolipid metabolism (dmk00600)、Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series (dmk00601)、Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series (dmk00603)の活性化が示された(図1 2B)。さらに、両解析において、セラミド代謝の場であるリソソーム (G0:0005764、dmk00511)での遺伝子発現が活性化していることが示されている(図1 1B、1 2B)。EDCを暴露されたミジンコにおいてセラミド合成が活性化することでERストレスが生じているのかもしれない。

KEGG GSEAよりCitrate cycle (TCA cycle) (dmk00020)が非常に強く抑制されていることが示された(図1 2B)。また、TCA cycleの駆動に必要なpyruvate、acetyl-CoA、succinyl-CoAを作り出すCarbon metabolism (dmk01200)、Propanoate metabolism (dmk00640)、Valine, leucine and isoleucine degradation (dmk00280)、Glycine, serine and threonine metabolism (dmk00260)も抑制されていた(図1 2B)。さらに、Oxidative phosphorylation (dmk00190)も強く抑制されていることから(図1 2B)、TCA cycleが抑制された結果ATP産生が低下していると考えられる。このTCA回路の抑制が生じる意味として、近年GSHの減少を介してERストレスを低減する効果があることが報告されている(Gansemer et al., 2020)。ミトコンドリアにおいて、TCA回路は細胞内で様々な反応に用いられるNADPHを作り出す(Rydstrom, 2006)、このNADPHはGlutathione Reductaseとともにcofactorとして働き、酸化型グルタチオン(GSSG)を還元型グルタチオン(GSH)へと変換する(Sies et al., 2017)。GSHは生体を酸化ストレスから守る非常に重要な抗酸化因子である。このGSSGとGSHの酸化還元のバランスがERにおけるoxidative protein maturationに影響を与えており、ERストレス下ではTCA回路を抑制することでNADPHを減らしGSSG/GSH ratioを高めることで、ERストレスを低減しているとされているという説がある(Gansemer et al., 2020)。本実験においてもKEGG GSEAでGlutathione metabolism (dmk00480)の活性化が示されており(図1 2B)、パスウェイを詳細に確認するとGSHを代謝・分解しGSSG/GSH ratioを高める遺伝子群の発現が上昇していることがわかる。またG0エンリッチメント解析ではEDC暴露で発現が低下した遺伝子群において濃縮されているG0タームとしてoxidoreductase activity (G0:0016491)が見出されており(図1 1B)、これからもGSHの産生が抑制されていることが示唆される。これらの結果より、このTCA回路の抑制はEDCによる直接的影響ではなく、EDCによって誘起されたERストレスを軽減するための応答であると考えられる。

上記のように、本実験よりEDCが暴露されたミジンコではERストレスが引き起こされており、これが産仔数の減少や死亡率の上昇といった毒性影響につながることを示唆されるとともに、ERストレスを低減するために様々な生体内応答が生じていることが明らかになった(図1 3)。EDCは様々な高分子材料の機能性向上のために添加される化学物質である。このような工業製品由来の物質がERストレスを引き起こす例としては、EDC同様に高分子材料に添加されるビスフェノールAやフタル酸エステルが最近になって報告されている(Chen et al., 2023; Yöntem et al., 2024)。これら高分子添加物は高分子の分解とともに環境中に流出する恐れがあるため、今後そのリスクを注視してゆく必要があるかもしれない。

EDCがどのようなメカニズムでERストレスを引き起こしているかはまだわからない。しかし、EDCはタンパ

ク質と反応して分子内または分子間で架橋することが知られている (López-Alonso et al., 2009; Cammarata et al., 2015)。細胞内で合成されたタンパク質がEDCで架橋されることで高次構造の異常や修飾の異常が起こり、小胞体ストレスが引き起こされている可能性が考えられる。もしくは、何らかのメカニズムでセラミドの合成を活性化することを介してERストレスを生じているのかもしれない。さらに、このERストレスの誘起がEDCだけでなく、他のカルボジイミドでも引き起こされるかについても現在のところ不明である。環境中の化学物質がERストレスを誘起するその分子機構の解明は今後より重要になると考えられる。

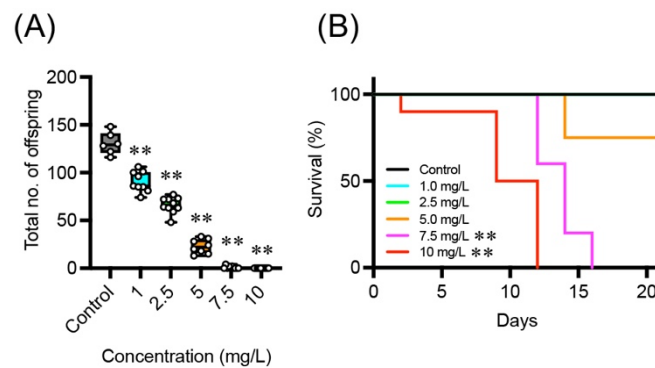


図9 EDCがオオミジンコに及ぼす影響

(A) 21日間の試験期間を通じた総産仔数のボックスプロット。

(B) カプラン・マイヤー生存曲線。**: Controlと有意差あり ($p < 0.01$)。

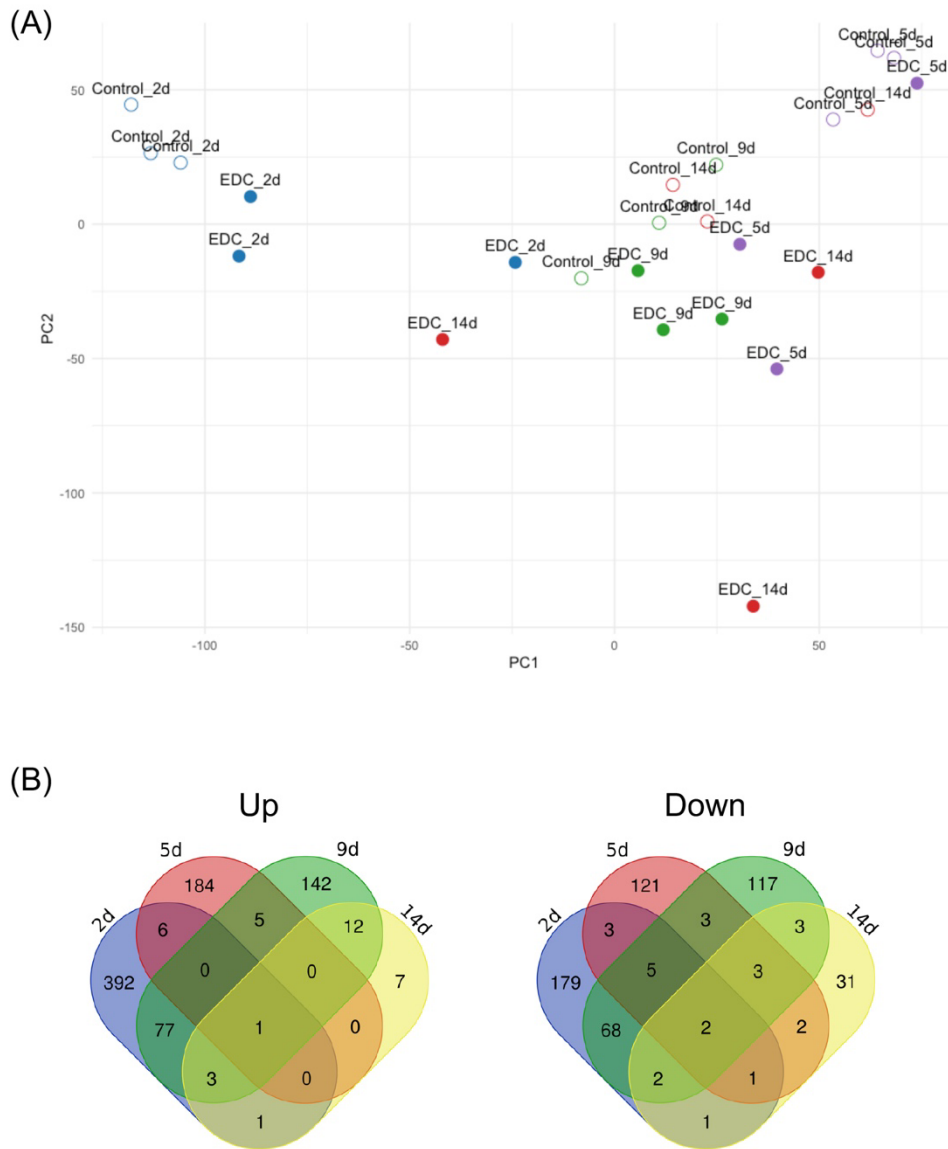


図 1 0 RNA-Seq解析の結果

(A) RNA-Seqデータの主成分分析。(B) 各時間点（2日、5日、9日、14日）において、対照群とEDC暴露群の間で発現レベルに有意な変化が見られた遺伝子（FDR < 0.05）のベン図。

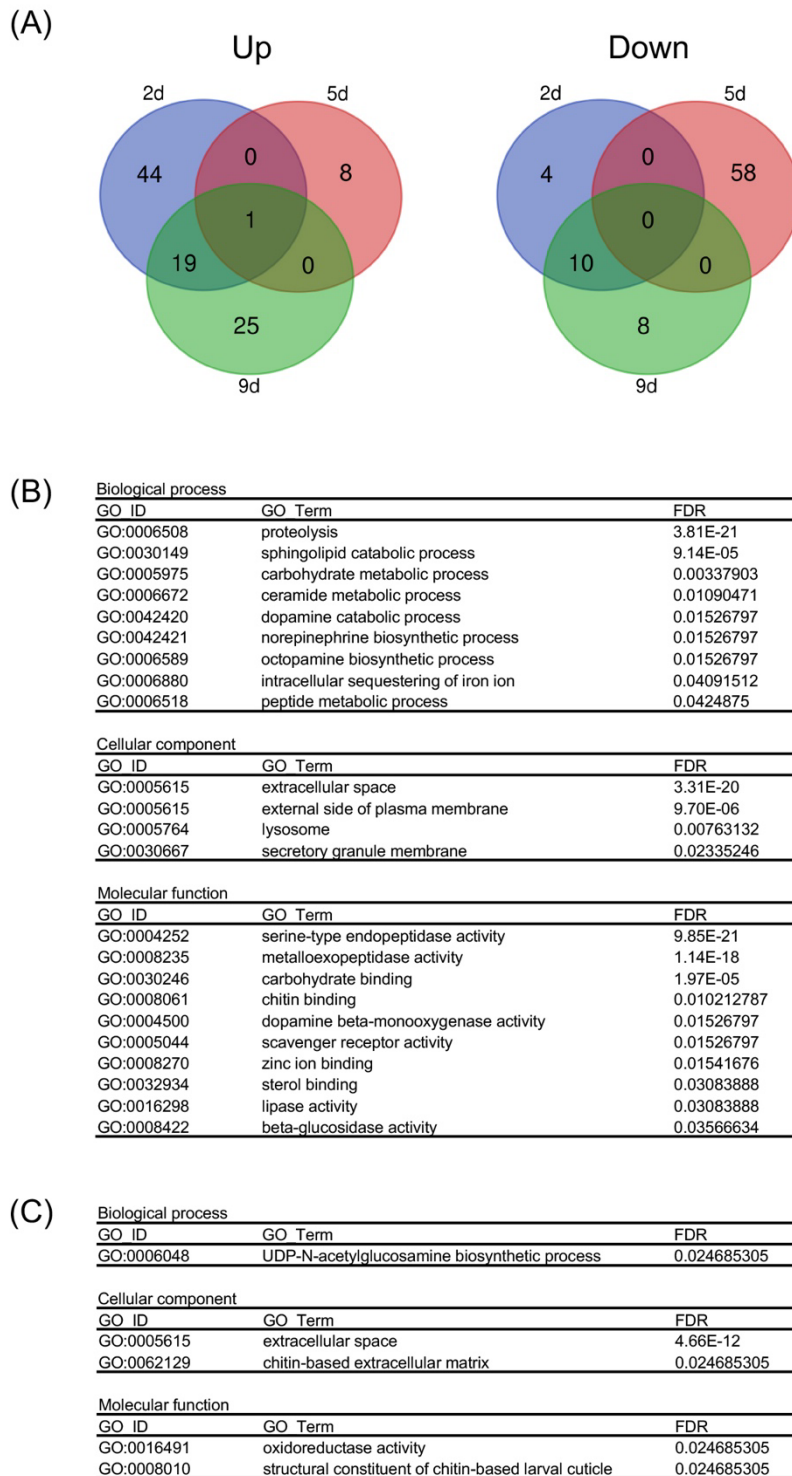


図11 Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析の結果

(A) 各時点（2日、5日、9日、14日）において、対照群とEDC暴露群の間で発現変化を示した遺伝子において有意に濃縮されたGO Term (FDR < 0.05) のベン図。(B、C) 2日目において有意に濃縮されたGO Term (FDR < 0.05) の一覧。(B) 発現が上昇したもの。(C) 発現が低下したもの。ここでは、冗長性を避けるため、最も特異的なGO用語のみを示している。

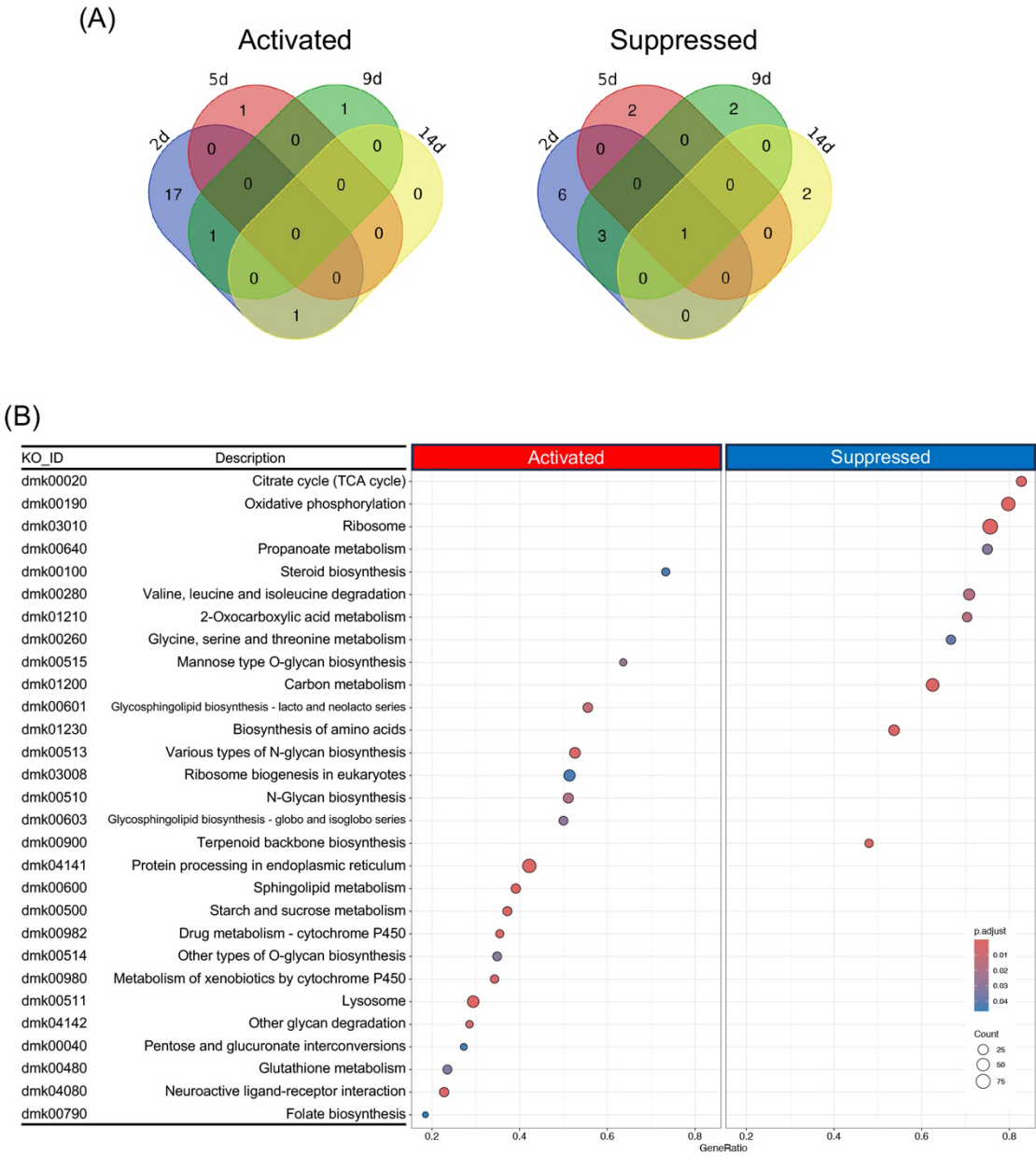


図1 2 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) gene set enrichment解析 (GSEA) の結果
(A) 各時間点 (2日、5日、9日、14日) において、対照群とEDC暴露群の間で変化を示したKEGG経路 (FDR < 0.05) のベン図。(B) 2日目において有意に変化した経路 (FDR < 0.05) のドットプロット。

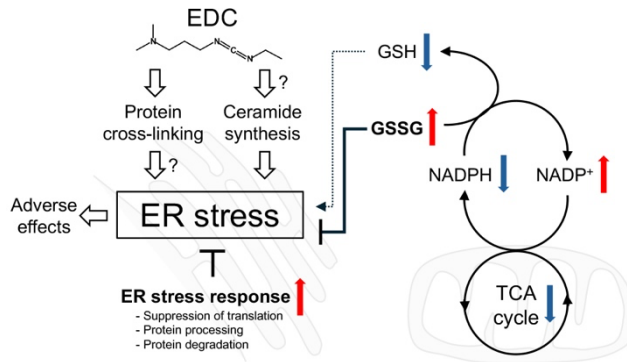


図13 本研究で示唆された、EDCによって誘導される小胞体（ER）ストレスに起因する毒性作用と、それに対する生体応答の概略図

実験④ 不溶性物質の安定的な試験法の確立と、それを用いたポリスチレンマイクロビーズのサイズ依存的毒性の発揮機構の解明（成果5、11、12）

【結果】

以下の三種類の暴露方法で実験を行った（表1）。

Experiment 1（単独暴露：Single Exposure）：オオミジンコを3 μmまたは30 μmのビーズに個別に暴露し、それぞれの濃度は25、50、75 mg/Lとした。

Experiment 2（混合暴露：Mixed Exposure）：3 μmおよび30 μmのビーズを混合し、総濃度100 mg/Lで暴露した。ビーズのサイズ比は100:0、75:25、50:50、25:75、0:100の5通りとした。

Experiment 3（連続暴露：Sequential Exposure）：試験期間の前半（1～7日目）は3 μmビーズに暴露し、後半（8～21日目）は30 μmビーズに暴露した。濃度は50、75、100 mg/Lとした。

ポリスチレンマイクロビーズ溶液を静置した際の、ビーズ粒子の沈降の程度はビーズの粒径によって大きく異なった（表2）。3 μmビーズの濃度は静置後2時間で若干低下し、24時間後にはおよそ6割程度になっていた。一方で、30 μmビーズの場合は、静置後2時間でほとんどビーズ粒子が観察できなくなり、24時間後には水面から1 cmの深さからは一つもビーズが回収されなかった。ローテーターを用いて回転振とうした場合は、3 μmビーズの濃度は、使用しない場合と比べて2時間時点の濃度の減少が大きいものの、24時間後は同じく6割程度になっていた。3 μmビーズの濃度はローテーターを使用しない場合と大きく異なり、24時間後でも濃度はあまり減少していなかった。これらの結果から、ビーズの粒子サイズが大きくなると短時間で沈殿してしまうため、一定の濃度でビーズを暴露するにはローテーター等で攪拌し続ける必要があることが明らかとなった。また、両ビーズにおいてはチューブ壁への付着に起因すると思われるビーズ濃度の低下が、ローテーター使用の有無にかかわらず見られた。以降の実験では、ビーズサイズにかかわらず常にローテーターを使用して暴露試験を行った。

表1 実験デザイン及び生存率

Treatment	N*	Survival (%)
Experiment 1 (単独暴露: Single Exposure)		
Control	12 (7)	100
25 mg/L of 3 μ m beads	10 (5)	100
50 mg/L of 3 μ m beads	10 (5)	100
75 mg/L of 3 μ m beads	10 (5)	100
25 mg/L of 30 μ m beads	10 (5)	100
50 mg/L of 30 μ m beads	10 (5)	100
75 mg/L of 30 μ m beads	9 (5)	100
Experiment 2 (混合暴露: Mixed Exposure)		
Control	13 (4)	100
100 mg/L of 3 μ m beads	14 (4)	100
75 mg/L of 3 μ m beads and 25 mg/L of 30 μ m beads	13 (4)	100
50 mg/L of 3 μ m beads and 50 mg/L of 30 μ m beads	14 (4)	100
25 mg/L of 3 μ m beads and 75 mg/L of 30 μ m beads	14 (4)	100
100 mg/L of 30 μ m beads	14 (4)	100
Experiment 3 (連続暴露: Sequential Exposure)		
Control	9 (6)	100
50 mg/L of 3 μ m beads (day 1-7) and 50 mg/L of 30 μ m beads (day 8-21)	10 (6)	100
75 mg/L of 3 μ m beads (day 1-7) and 75 mg/L of 30 μ m beads (day 8-21)	10 (6)	100
100 mg/L of 3 μ m beads (day 1-7) and 100 mg/L of 30 μ m beads (day 8-21)	10 (6)	100

*括弧内は7日目の体調測定に用いられた個体数

表2 3 μ m および 30 μ m ポリスチレンマイクロビーズの分散に対するローテーターの効果

	Concentration of 3 μ m beads ($\times 10^6$ /mL)			Concentration of 30 μ m beads ($\times 10^3$ /mL)		
	0 hr	2 hr	24 hr	0 hr	2 hr	24 hr
w/o rotation	7.57	6.70	4.74	5.87	0.70	0
w/ rotation	8.15	4.87	4.79	5.40	3.70	4.47

PCLポリマー粒子を観察したところ、様々なサイズや形状のものが見られ、中には多数の粒子が凝集した非常に大きなものも存在した(図1 4C, D)。計測した1019個のPCLポリマー粒子において、長径の中央値は3.26 μ m、短径の中央値は2.07 μ mであった。このうち、長径が10 μ m以上の粒子は55個(5.4%)であり、その中央値は23.4 μ mであった(図1 4C)。形状の指標として短径に対する長径の比(長径/短径)をとり、これを長径に対してプロットすると図1 4Dのようになった。長径/短径と長径の間には弱い統計的に有意な正の相関が見られ($r = 0.364$, $p \approx 0.000$)、長径が大きいほど形が球形から遠ざかる傾向があることが明らかとなった。

バイオアッセイにおいては、すべての実験を通じて、操作のミスに起因する人為的なものを除いて死亡個体は観察されず、21日間における生存率はいずれも100%となった(表1)。以降では生存率以外のエンドポイント

トについて記載する。

単一の種類のビーズを21日間継続暴露したExperiment 1では、3 μm のビーズにおいて、すべてのエンドポイントについて濃度依存的な毒性影響が見られた。すなわち、ビーズの暴露によって総産仔数と産仔回数は有意に減少し、初回産仔までの時間は有意に長くなり、体長は有意に小さくなった（図15～18）。30 μm のビーズの場合でも同様の傾向が見られたが、産仔回数や初回産仔までの時間には有意差は検出されず、総じて3 μm ビーズの方が30 μm ビーズより毒性影響が強いという結果となった（図15～18）。さらに、体長については7日目の時点では3 μm ビーズでのみ有意な影響が見られ、30 μm ビーズはほとんど影響が見られなかったが、21日目になると30 μm ビーズにおいても3 μm ビーズと同程度の有意な影響が見られた（図18）。

Experiment 2では、暴露総量100 mg/L を変えずに粒径の異なる二種類のポリスチレンマイクロビーズの含まれる割合を変えてオオミジンコに暴露をした。その結果、総産仔数、産仔回数、初回産仔までの時間については、3 μm ビーズの比率が増加するにつれて大きな毒性影響が現れており（図15～17）、Experiment 1と同様に3 μm ビーズのより高い毒性が示される結果となった。体長についてはこれらとは少し異なる結果となっており、7日目においては同様に3 μm ビーズの比率が高いほど体調が小さくなっていたが、21日目においては3 μm と30 μm のビーズをそれぞれ等量ずつ（50 mg/L each）混ぜて暴露した試験区において、最も体長が小さくなり、混合暴露特有の毒性が観察された（図18）。

Experiment 1および2の体長の結果より、30 μm ビーズは試験期間の中盤以降（すなわち個体の成体期）に、より強い毒性影響を発揮する可能性が考えられた。このステージ特異的な影響をさらに検証するため、Experiment 3では試験7日目まで3 μm ビーズのみを、8日目以降は30 μm ビーズのみを暴露した。その結果、ビーズ暴露区では観察した全てのエンドポイントにおいて、濃度依存的な悪影響が見られた（図15～18）。この転換暴露では、概ね3 μm ビーズのみを21日間暴露した結果と同等の影響が見られたが、100 mg/L暴露時の総産仔数（3 μm ビーズ単独暴露の平均：41.2匹、転換暴露の平均：32.7匹）や（図15）、50 mg/L暴露時の産仔回数（3 μm ビーズ単独暴露の平均：3.7回、転換暴露の平均：3回）など（図16）、一部転換暴露の方が影響が強いものもあった。

【考察】

ポリスチレンマイクロビーズはさまざまな規格のものが容易に入手できるため、マイクロプラスチック研究のモデル物質として広く使われており（Miloloža et al., 2021; Leistenschneider et al., 2023; Pencik et al., 2023）、本実験でも対象としたオオミジンコにおいても様々なサイズのビーズを用いた膨大な量の先行研究が存在する（Rist et al., 2017; Aljaibachi & Callaghan, 2018; Eltemsah & Bøhn, 2019; Zhang et al., 2019; Isinibilir et al., 2023, etc.）。これらの研究においては、使用するビーズのサイズが変われば毒性影響の結果も当然変化するが、一方で類似したサイズのビーズを用いていたとしても互いに異なる結果が得られている例も多数存在する。このような、試験結果の一貫性のなさが何に起因するかはまだあまりよくわかっていない。本実験において我々は、ポリスチレンマイクロビーズを用いた毒性実験の結果に影響する要因として、生物側の要因である「発生段階依存的な捕食開口制限」と、技術的な要因である「ビーズのサイズ依存的な沈みやすさの違い」を見出した。

オオミジンコにおいては1 μm を下回るサイズのポリスチレンナノビーズが比較的低濃度で急性毒性を示し、（Fadare et al., 2019）、10 μm を超えるサイズだと毒性が低いという傾向が見られている（Schwarzer et al., 2022）。一般的に、特定のサイズのプラスチック粒子が生物の体内、特に消化管に蓄積し毒性を示すか否かは生物の口器サイズに依存すると考えられている（Cole et al., 2013; Setälä et al., 2014; Desforges et al., 2015）。今回我々の実験では、3 μm ビーズの暴露は体サイズの小さな発生初期により強く作用した。逆に、30 μm ビーズの暴露では発生初期はほとんど影響が現れないのに対し、ある程度成長してから毒性影響が観察され始めた。さらに、発生初期に3 μm ビーズを暴露し、ある程度成長してから30 μm ビーズを暴露した

転換暴露において、一部の総産仔数や産仔回数に最も強い毒性が示唆された（図15～18）。これらの結果は、上記の口器サイズに依存した取り込み粒子サイズの選択性は存在するものの、現実的には個体が成長することで口器サイズが変化し、それに伴って取り込める粒子サイズが変化することを示している。したがって、ある生物においてマイクロプラスチックの毒性を評価する際には「その生物の生涯において、そのマイクロプラスチックが取り込まれうる発生ステージはいつであり、どれくらいの長さか」という生物側の特性も考慮しなければならないことを意味する。少なくとも、初期のステージにおける毒性しか評価しない急性毒性試験はマイクロプラスチックのリスク評価には不適であり、慢性毒性試験を行うことが望ましいと言える。本実験では3 μm ビーズと30 μm ビーズを共暴露することで、単独暴露よりも強い毒性が発揮された。これは個々のビーズの濃度は低くても、複数のサイズの粒子が存在することで長期間影響を受け続けた結果であると考えられる。このような状況は野外で普通に起こりうることである。

また、本実験では様々な条件でポリスチレンマイクロビーズを暴露したが、どの試験区においてもばらつきの小さい安定した結果が得られており、ビーズの混合比率の違いなどの繊細な実験条件の差がもたらす影響を感度良く検出できた。これにはローテーターの使用が大きく貢献していると考えられる。表2に示すように、ローテーターを用いない場合、30 μm ビーズは暴露2時間の時点でほぼ全て沈降してしまっている。このような状況だと、遊泳している状態のオオミジンコにはビーズはほとんど暴露されないだけでなく、一度底付近へ移動すると沈殿した多量のビーズに一気に曝されることとなる。したがって、その影響は個体ごとに過小評価される場合もあれば過大評価される場合もあり、非常にばらつきの大きなデータとなってしまう。小さな3 μm ビーズの場合はローテーターの有無で浮遊しているビーズの量に変化は無いため、ローテーター使用の意義はあまり無いが、粒子が沈降するか否かはサイズだけでなく、材質、密度、形状、試験容器の素材や形状といったあらゆる要因で変化すると予想されるので、不溶物質の暴露試験を行う際はサイズに関わらずローテーターを使用することが望ましいと考える。また、小さい粒子ほど沈みにくく、大きい粒子ほど沈みやすいというこの事実自体が、先行研究で示されてきたサイズ依存的な毒性影響の背景にあることも否定できない。同時に試験ができる個体数が使用できるマシンの台数に応じて限られてしまうなど、これまでに無い制約も生じるが、不溶物質の半止水式試験において、暴露物質の沈降を防ぐ措置は今後必要不可欠であり、論文においてはどのような措置を講じたかを明記しなくてはならないと考える。

本実験の暴露実験では球状粒子のサイズにのみ着目しているが、実際にはその形状も毒性に大きく関係すると思われる(Ogonowski et al., 2016; Frydkjær et al., 2017)。実験的に作成したPCLに含まれている粒子のサイズ域は本実験で用いた粒径ポリスチレンマイクロビーズ（3 μm と30 μm ）と近いが、先行研究でPCLポリマー粒子を暴露した際には産仔数の現象だけでなく、ビーズでは見られなかった生存率の低下が見られた（成果2）。この違いは、人工的なビーズには存在しない粒子の形状のばらつきが影響している可能性がある。PCLポリマーの不均一な形状の粒子の中には長径と短径が大きく異なる尖ったものも多く見られている（図14C, E）。ビーズが消化管に詰まり栄養摂取を阻害するのに対し、PCLポリマー粒子は加えて形状によって消化管上皮に傷をついたり、突き刺さったりすることで、より直接的に傷害を与えている可能性がある(Wright et al., 2013; Setälä et al., 2014)。

マイクロプラスチックの生態リスクの把握は喫緊の課題であり、その解決に向けて様々なプラスチック粒子を用いた生物試験が盛んに行われている。膨大な実験データが日々公開され続ける一方で、水に不溶でサイズや形状に無限のバリエーションが存在するプラスチック粒子の毒性を正確に再現よく評価する試験方法はいまだに定まっておらず、互いに矛盾した玉石混合の報告から共通原理を導き出すことは至難の業である。より正確な生物試験方法を提案し、プラスチック粒子のサイズ依存的な毒性発揮のメカニズムの一端を解き明かした本実験は、このような現状を打破し生物多様性の保全に貢献するものである。

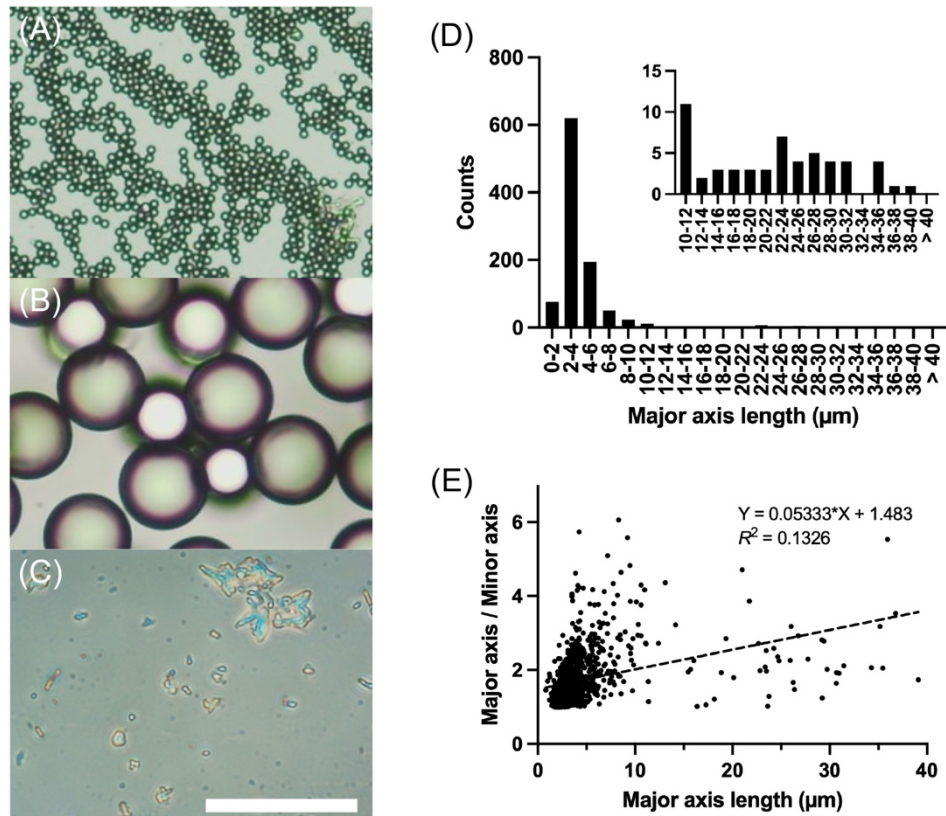


図1-4 実験で使用したポリスチレンマイクロビーズ (3 μmおよび30 μm) およびPCLのサイズと形状。

(A-C) : 3 μmビーズ (A) 、30 μmビーズ (B) 、およびPCL (C) の顕微鏡画像。スケールバー : 50 μm。

(D) : 100 mg/LのPCL溶液1 μL中に含まれる粒子 (n = 1019) の長軸長のヒストグラム。挿入図では、10 μmを超える粒子数が明瞭になるよう、y軸を拡大して表示している。(E) : アスペクト比 (長軸長/短軸長) と長軸長との関係を示す散布図。

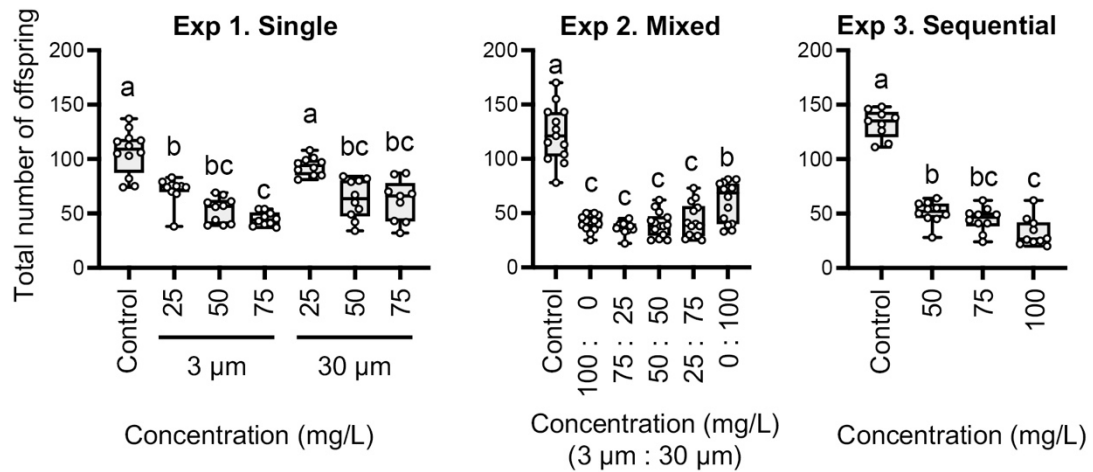


図 15 3 μmおよび30 μmポリスチレンマイクロビーズがオオミジンコの総産仔数に及ぼす影響。21日間の試験期間における総産仔数の箱ひげ図。異なる英字は各実験内の有意な群間差 ($p < 0.05$)。

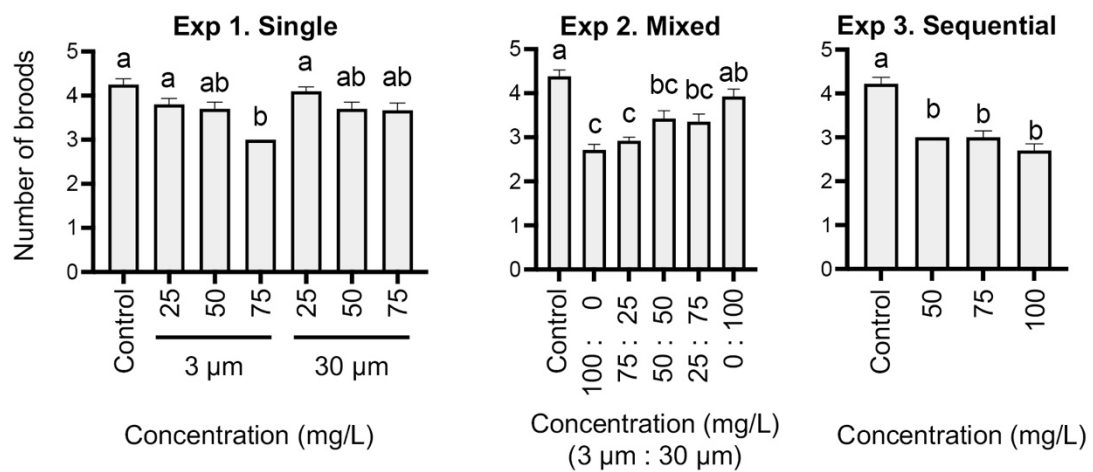


図 16 3 μmおよび30 μmポリスチレンマイクロビーズがオオミジンコの産仔回数に及ぼす影響。21日間の試験期間における平均産仔回数のグラフ。異なる英字は各実験内の有意な群間差 ($p < 0.05$)。エラーバーは標準誤差を示す。

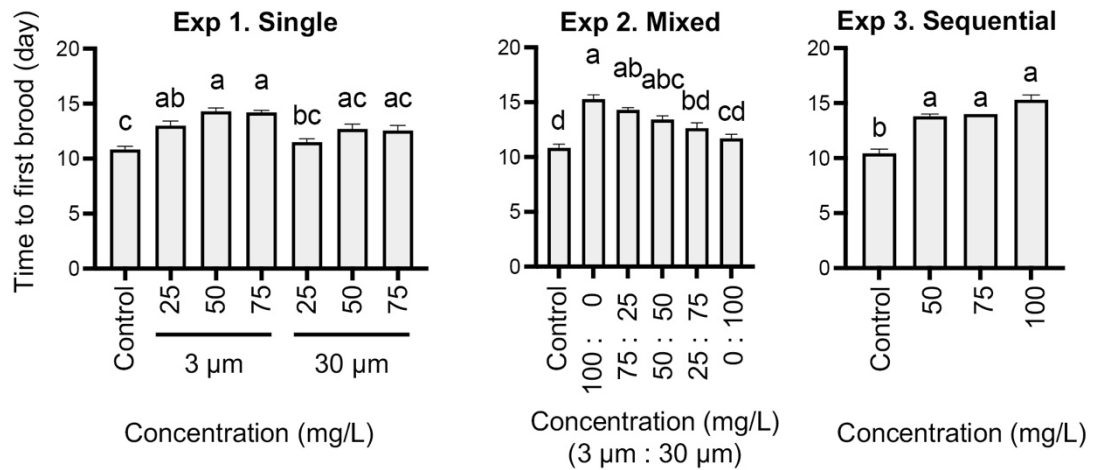


図17 3 μmおよび30 μmポリスチレンマイクロビーズが

オオミジンコの初回産仔までの時間に及ぼす影響。

異なる英字は各実験内の有意な群間差 ($p < 0.05$)。エラーバーは標準誤差を示す。

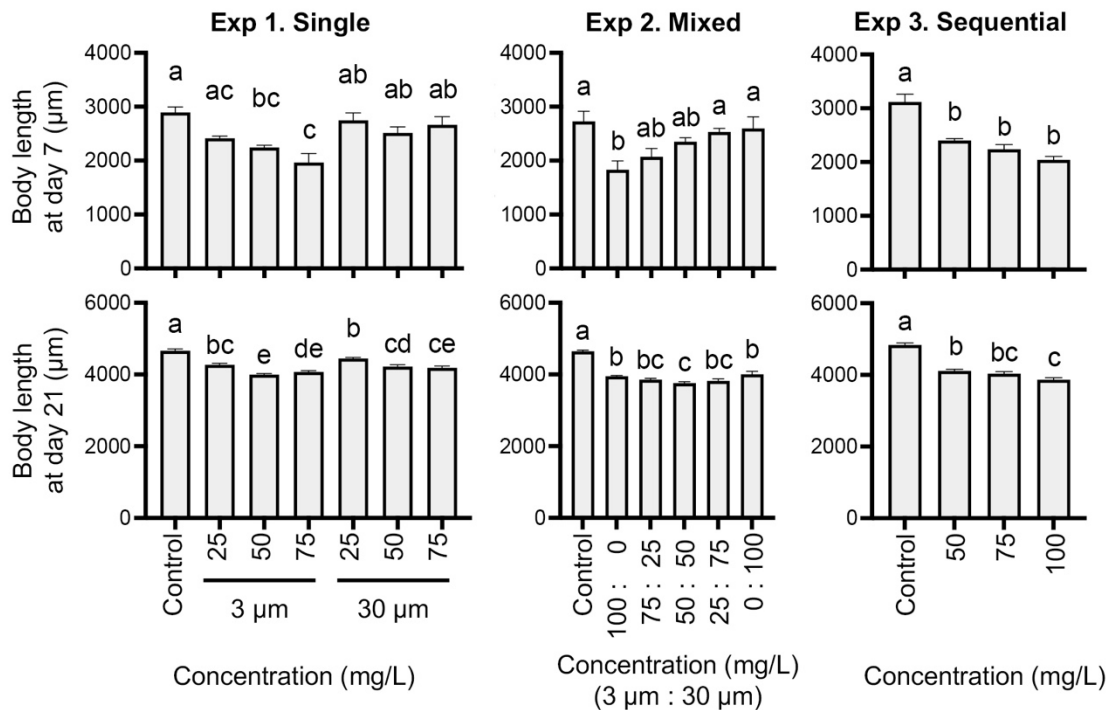


図18 3 μmおよび30 μmポリスチレンマイクロビーズがオオミジンコの体長に及ぼす影響。

7日目および21日目における平均体長のグラフ。異なる英字は各実験内の有意な群間差 ($p < 0.05$)。

エラーバーは標準誤差を示す。

1. 4. 2. 2. 課題全体のまとめ

サブテーマ1

本研究より明らかになった高分子の分解に伴う毒性の変化過程と、想定される毒性発揮の分子機構について以下にまとめる（図19）。

高分子（プラスチック）は環境中において物理化学的に分解され、さまざまな分解産物を生じる。代表的な分解過程には、プラスチック粒子が物理的に破碎されサイズが小さくなる「物理的分解」と、高分子主鎖が加水分解などで化学的に切断され分子量が小さくなる「化学的分解」がある。またこれらの分解過程において、高分子の材料としての機能を高めるために添加された様々な添加物が流出する。

物理的分解ではサイズの異なるさまざまな粒子が生じる。本研究では、サイズの異なるポリスチレンマイクロビーズを用いた毒性試験（実験④）によって、発生過程に応じて粒子の取り込みに関係する口器サイズが変化することで、体内に取り込まれやすい粒子サイズも変化することが明らかになった。つまり、ある生物に対して最も強い毒性を示す粒子のサイズは、その生物がどの発生段階にあるかによって変化するということを意味する。一方で、サイズだけでなく粒子の形状も毒性に影響することも示唆された。

化学的分解では主鎖の切断とともに分子量が低下し、結果として可溶性が増す。本研究では、PCLを用いて主鎖の切断によって生じたオリゴマーやモノマーの物性と毒性をポリマーと比較した（実験①）。その結果、ポリマーは不溶であり消化管に蓄積することで毒性が現れたが（実験②）、可溶性オリゴマーやモノマーは体内に蓄積せず、毒性も低いことがわかった。この化学的分解は生分解性プラスチックの無毒化過程であるため、生分解性プラスチックの有効性が示される結果となった。

添加物の流出においては、本研究では加水分解抑制剤であるカルボジイミドに着目し、その毒性を評価した。その結果、カルボジイミドは比較的強い生理的毒性を発揮し、高分子の正しいリスク評価には添加物流出を考慮する必要性が示唆された（実験①）。遺伝子発現解析よりこのカルボジイミドの毒性は小胞体ストレスの誘起によるものであることが示され、カルボジイミドの高い反応性がタンパク質を架橋し細胞に負荷をかけている可能性が考えられた（実験③）。

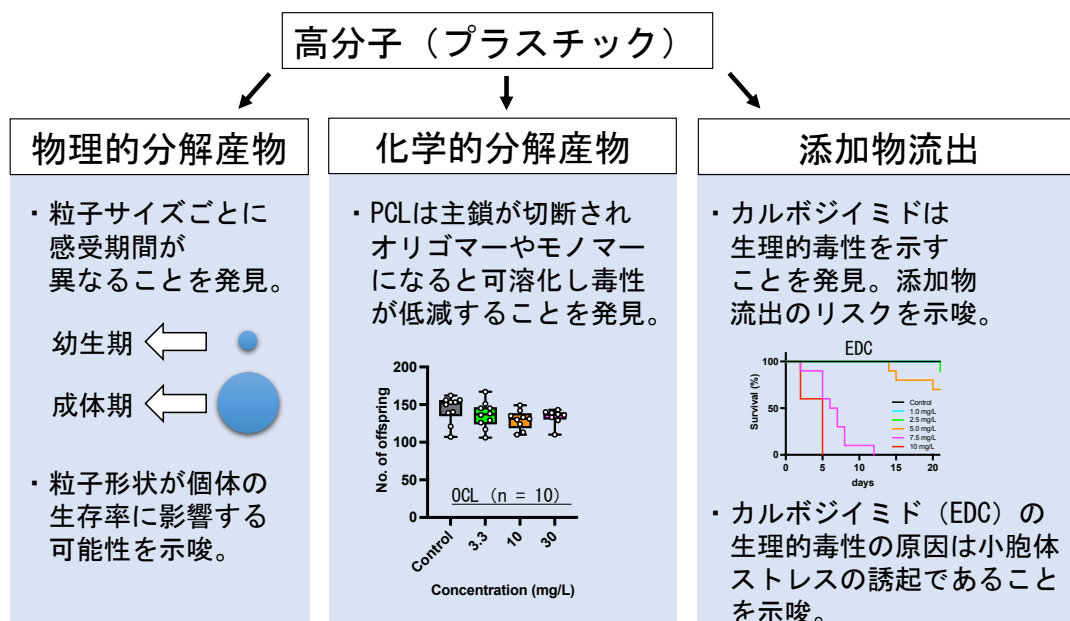


図19 本研究で明らかとなった高分子の分解に伴う毒性の変化とその発揮機構のまとめ

サブテーマ2

また、上記サブテーマ1の結果を踏まえ、環境にやさしい高分子材料設計に貢献する高分子の毒性評価手法や基準策定に関するして以下のことが示唆された。

- ①：高分子は時間とともに物理的分解、化学的分解、添加物流出が生じることで毒性が変化するため、その生態リスク評価にはこれら異なる分解過程のそれぞれで生じる分解産物のリスクも考慮する必要がある。
- ②：高分子のような不溶性物質の生物毒性試験では、従来の可溶性物質の試験法をそのまま用いると粒子の沈降の影響を受けてしまい正しく評価することができないため、ローテーターで攪拌しながら暴露するなど粒子を分散させる措置が必要不可欠である。
- ③：どのようなサイズの不溶性粒子が生物体内に取り込まれるかはその生物の口器サイズに依存するが、その口器サイズは生物の発生段階で大きく変化する。従って、不溶性粒子の毒性試験では発生過程のごく一部にしか着目しない急性毒性試験などは不適であり、できる限り様々な発生段階を網羅する形で試験を行う必要がある。
- ④：③と関連し、単一の粒子の暴露では最も取り込みやすい感受期（発生段階）を過ぎればその影響が低減するが、異なるサイズの粒子に同時に暴露されると、個体の成長に伴い次々に取り込みやすいサイズの粒子を連続的に取り込み続けることで、より長期的かつ重篤な影響が現れる可能性がある。このようなシナジー効果の考慮は実験室における生物試験と実環境における実態の溝を埋める上で重要な要素の一つである。

引用文献

- Aljaibachi, R., & Callaghan, A. (2018) PeerJ, 6, e4601. doi: 10.7717/peerj.4601
- Andrady, A. L. (2011) Marine Pollution Bulletin, 62(8), 1596-1605.
doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- Ankley, G. T., et al. (2010) Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3), 730-741.
doi:10.1002/etc.34
- Barboza, L. G. A., et al. (2018) Environmental Pollution, 236, 1014-1019.
doi:10.1016/j.envpol.2017.12.082
- Burns, E. E., & Boxall, A. B. A. (2018) Environmental Toxicology and Chemistry, 37(11), 2776-2796. doi: 10.1002/etc.4268
- Cammarata, C. R., et al. (2015) Molecular Pharmaceutics, 12(3), 783-793. doi: 10.1021/mp5006118
- Cardoso, C., et al. (2012) European Food Research and Technology, 234, 935-943.
doi:10.1007/s00217-012-1713-z
- Chen, J., et al. (2023) Frontiers in Medicine, 10, 1255121. doi: 10.3389/fmed.2023.1255121
- Cole, M., et al. (2013) Environmental Science & Technology, 47(12), 6646-6655. doi:
10.1021/es400663f
- Cui, R., et al. (2017) Scientific Reports, 7(1), 12095. doi:10.1038/s41598-017-12299-2
- de Sá, L. C., et al. (2018) Science of the Total Environment, 645, 1029-1039. doi:
10.1016/j.scitotenv.2018.07.207
- Desforges, J. P., et al. (2015) Environmental Contamination and Toxicology, 69(3), 320-330. doi:
10.1007/s00244-015-0172-5
- Eltemsah, Y. S., & Bøhn, T. (2019). Environmental Pollution, 254(Pt A), 112919. doi:

- 10.1016/j.envpol.2019.07.087
- Fadare, O. O., et al. (2019) *Environmental Science: Nano*, 6(5), 1466-1477. doi: 10.1039/C8EN01457D
- Frydkjær, C. K., et al. (2017) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(6), 655-661. doi: 10.1007/s00128-017-2186-3
- Gansemmer, E. R., et al. (2020) *iScience*, 23(5), 101116. doi: 10.1016/j.isci.2020.101116
- Geyer, R., et al. (2017) *Science Advances*, 3(7), e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782
- Hayes, B. B., et al. (1998) *Drug and Chemical Toxicology*, 21(2), 195-206. doi:10.3109/01480549809011647
- Isinibilir, M., et al. (2022) *Microplastics*, 2(1), 27-38. doi: 10.3390/microplastics2010002
- Kato, H., et al. (2002) *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1713-1718. doi:10.1016/s0278-6915(02)00132-1
- Kelpsiene, E., et al. (2020) *Scientific Reports*, 10(1), 5979. doi:10.1038/s41598-020-63028-1
- Lambert, S., et al. (2017) *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 470-475. doi: 10.1002/ieam.1901
- Leistenschneider, D., et al. (2023) *Science of the Total Environment*, 896, 164955. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164955
- López-Alonso, J. P., et al. (2009) *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1459-1473. doi: 10.1021/bc9001486
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2001) *Cell*, 107(7), 827-830. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00623-7
- Martelli, S. M., et al. (2013) *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 39-45. doi:10.1007/s10924-012-0550-2
- Miloloža, M., et al. (2020) *Water*, 13(1), 56. doi: 10.3390/w13010056
- Mori, K. (2000) *Cell*, 101(5), 451-454. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80855-7
- Moshnikova, A. B., (2006) *Cellular and Molecular Life Science*, 63(2), 229-234. doi:10.1007/s00018-005-5383-x
- Nasser, F., & Lynch, I. (2016) *Journal of Proteomics*, 137, 45-51. doi:10.1016/j.jprot.2015.09.005
- Ogonowski, M., et al. (2016) *PLoS One*, 11(5), e0155063. doi: 10.1371/journal.pone.0155063
- Park, S. N., et al. (2002) *Biomaterials*, 23(4), 1205-1212. doi:10.1016/s0142-9612(01)00235-6
- Park, W. J., & Park, J. W. (2020) *FEBS Letters*, 594(22), 3632-3651. doi: 10.1002/1873-3468.13863
- Patil, C., & Walter, P. (2001) *Current Opinion in Cell Biology*, 13(3), 349-355. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00219-2
- Pencik, O., et al. (2023) *Journal of Hazardous Materials*, 454, 131476. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131476
- Rehse, S., et al. (2016) *Chemosphere*, 153, 91-99. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.133
- Rist, S., et al. (2017) *Environmental Pollution*, 228, 398-407. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.048
- Rochman, C. M., et al. (2019) *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 703-711. doi: 10.1002/etc.4371
- Rosenkranz, P., et al. (2009) *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(10), 2142-2149.

doi:10.1897/08-559.1

- Russo, D., et al. (2018) *Journal of Cell Science*, 131(24). doi; 10.1242/jcs.219204
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016) *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79-94. doi: 10.1007/s00018-015-2052-6
- Schwarzer, M., et al. (2022) *Journal of Hazardous Materials*, 426, 128136. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128136
- Setälä, O., et al. (2014) *Environmental Pollution*, 185, 77-83. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.013
- Sies, H., et al. (2017) *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Stloukal, P., et al. (2016) *Polymer Testing*, 54, 19-28. doi:10.1016/j.polymertesting.2016.06.007
- Surh, I., et al. (2012) *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31(3), 177-187. doi:10.3109/15569527.2011.629384
- Tatarazako, N., et al. (2003) *Chemosphere*, 53(8), 827-833. doi:10.1016/S0045-6535(03)00761-6
- Tian, Z., et al. (2021) *Science*, 371(6525), 185-189. doi:10.1126/science.abd6951
- Triebkorn, R., et al. (2019) *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 375-392. doi: 10.1016/j.trac.2018.11.023
- Uddin, S., et al. (2021) *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111973. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.111973
- Urade, R. (2007) *FEBS Journal*, 274(5), 1152-1171. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05664.x
- Vinken, M., et al. (2017) *Archives of Toxicology*, 91(11), 3697-3707. doi: 10.1007/s00204-017-2020-z
- Williams, A., & Ibrahim, I. T. (1981) *Chemical reviews*, 81(6), 589-636. doi:10.1021/cr00046a004
- Wright, S. L., et al. (2013) *Current Biology*, 23(23), R1031-1033. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.068
- Yöntem, F. D., et al. (2024) *Toxicology*, 501, 153695. doi: 10.1016/j.tox.2023.153695
- Zhang, P., et al. (2019) *Environmental Science and Pollution Research*, 26(17), 17010-17020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05031-2>

1. 5. 研究成果及び自己評価

1. 5. 1. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

本研究は、生分解性プラスチックを含む高分子材料が環境中で分解・変質する過程において、どのような生物影響を引き起こすかを明らかにするとともに、それらの毒性評価手法の精緻化を図った点で、環境毒理学および高分子科学の双方において重要な知見を提供した。具体的には、①高分子の分解産物や添加剤が環境指標生物に与える急性・慢性毒性の定量的評価、②高分子および分解産物の生体内挙動の可視化、③毒性発揮メカニズムの分子レベルでの解明（AOP構築への貢献）、④不溶性物質に対する新規かつ再現性の高い暴露試験法の確立、という4点において新規性と独自性を有する。

特に、PCL分解により流出する添加物カルボジイミド（EDCなど）といった各構成要素が、従来想定されていたよりも強い毒性を示す可能性を明確にした点は、高分子材料における「分解後のリスク」に光を当てた先駆的研究として評価できる。これは、材料設計段階における安全性評価において、製品のライフサイクル全体を通じた毒性の把握が不可欠であることを実証的に示すものである。このEDCの毒性のメカニズムにつ

いては、遺伝子発現解析より小胞体ストレスの誘起である可能性が示された。高分子分解産物による小胞体ストレスの誘起は近年報告された極めて新しい知見であり、まだ詳細な情報はほとんど得られていない。本研究の成果は環境科学分野における最新トピックを拡充する重要な基礎的知見であると言える。

また、試験法に関しては、従来の半止水式試験法では評価が困難であった不溶性高分子粒子に対して、ローターを用いた安定的かつ再現性の高い暴露試験法を確立した点が特筆される。この手法により、従来法に比してばらつきの少ない信頼性の高いデータ取得が可能となり、微小粒子による毒性評価の精度向上に大きく貢献する。

さらに、マイクロプラスチックの粒子サイズや発生段階による毒性の違いの解析を通じて、「粒子の物理特性と生物毒性の関係性」について新たな視座を提示し、物理的なストレスや摂取効率の違いが生体影響に及ぼす役割を実証的に示した。

以上の成果は、環境中での高分子材料の影響評価を科学的に高度化するだけでなく、将来的な「環境にやさしい高分子材料設計」へのフィードバック基盤としても機能する。すなわち、本研究は高分子材料の環境安全性に関する学術的枠組みの形成に寄与し、リスク評価と材料設計の双方を接続する学際的研究として高い学術的意義を有する。

＜環境政策等へ既に貢献した研究成果＞
特に記載する事項はない。

＜環境政策等へ貢献することが見込まれる研究成果＞

本研究では、高分子材料およびその分解産物が環境中で示す生物影響について、モデル生物オオミジンコを用いた包括的な毒性評価を実施することで、環境政策や化学物質管理の高度化に資する科学的知見を提供した。ここでは、今後の環境行政や国際規制のあり方に対して、本研究から実践的かつ戦略的な示唆を与えるべく、以下の4つの提言を行う。

提言1：「高分子」や「微粒子」そのものの構造・性質に起因する影響を考慮した評価枠組みの必要性

高分子材料やその微粒子は、分子量の大きさや可溶性の低さ、粒子形状などが毒性に大きく影響し、従来の低分子化学物質を前提とした評価法では不十分であることが明らかとなった。これは、化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）における高分子ポリマーの「低懸念」判定や、REACH規則（欧州連合の化学物質登録・評価・認可・制限制度）におけるポリマー評価の再検討といった政策的課題と密接に関係している。今後、本研究の成果は、「高分子に特化した新たな評価指針や懸念物質選定の枠組み」の整備に貢献する可能性が高い。

提言2：分解過程・環境中での挙動を反映した暴露設計の必要性

PCLやカルボジイミドの実験を通じて、分解によって生成される可溶性成分が新たな毒性因子として機能し、その結果生物影響は高分子の分解が進むことで経時的に変化することが示唆された。これにより、材料のライフサイクルを通じたリスク評価や、時系列を考慮した「動的な暴露設計」の必要性が提起された。これは、「サーキュラーエコノミー」や「持続可能なプラスチックに関する国際交渉」（例：UNEA、INCで進行中の国際プラスチック条約）の文脈とも親和性が高く、マテリアル設計段階からの予防的管理（Safer-by-Design）を促進するための科学的基盤として期待される。

提言3：実験条件が生物影響の検出に与える影響の再考

沈降を防止するためのローテーターの使用により、微粒子の暴露均一性が確保され、結果として毒性の再現性や感度が大きく改善した。このことは、OECD試験ガイドライン（TG 202やTG 211など）で定められた現行の暴露設計では、マイクロプラスチックなど不均一な粒子系の実態を十分に反映できない可能性を示唆している。従って本成果は、OECDにおけるマイクロ・ナノプラスチックのための新試験ガイドライン整備や、既存TGの補完的手法の開発といった国際的な動向に対して、具体的かつ実証的な貢献を行いうる。

提言4：新たな毒性評価指標（生理毒性、分子応答など）を含めた包括的な評価法の整備

本研究では、従来の致死率や繁殖指標に加えて、RNA-SeqやMALDI-TOF-MSを用いた分子応答評価を導入し、影響メカニズムの可視化とAOP（Adverse Outcome Pathway）の構築を試みた。これにより、化学物質管理の将来像として注目される「新アプローチ手法（New Approach Methodologies, NAMs）」の一環として、分子レベルの応答を環境リスク評価に活用する道筋が見えた。これは、OECDが推進するAOP開発、ならびに欧州ECHAや米国EPAが進める動物実験代替手法の拡充戦略にも整合的であり、国際的な毒性評価パラダイムの転換を支える科学的知見と位置づけられる。

【今後の環境政策への具体的な波及可能性】

以上の成果は、いずれも本研究課題の関わる重点課題⑥、⑮、および行政ニーズ（1-2）の解決に役立つものであり、以下のような国内外の政策枠組みへの実質的貢献が見込まれる：

国内政策との連携

- ・ 化審法におけるポリマー規制の見直し、及び新たな環境省ガイドライン策定に向けた科学的根拠の提供
- ・ 生分解性プラスチック等の「環境調和型材料」の認証制度設計への寄与
- ・ 環境省・経済産業省が推進するグリーンイノベーション戦略（GI戦略）における研究開発指針との協調

国際的枠組みへの貢献

- ・ OECD試験ガイドラインの改訂・補完手法開発に対するエビデンス提供
- ・ 欧州REACHやTSCA（米国有害物質規制法）における高分子評価基準の科学的再検討への貢献
- ・ UNEA、INCを通じて進行中の「国際プラスチック条約交渉」における、科学的助言とマイクロプラスチック影響評価の根拠提供
- ・ ISO TC61（プラスチック関連の技術委員会）やTC147（環境毒性）など、標準化団体における新評価技術の導入推進

本研究は、単に高分子材料の影響評価にとどまらず、材料設計・環境暴露・生物応答という複数階層を統合した「評価エコシステムの再構築」を志向している。今後は、行政機関・業界・国際機関との連携を通じて、得られた知見を政策的意思決定や規制設計に実装することで、持続可能な社会の実現と化学物質による環境リスクの低減に貢献できると期待される。

1. 5. 2. 研究成果に基づく研究目標の達成状況及び自己評価

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| <全体達成状況の自己評価> | <u>2. 目標を上回る成果をあげた</u> |
| <サブテーマ1 達成状況の自己評価> | <u>1. 目標を大きく上回る成果をあげた</u> |
| <サブテーマ2 達成状況の自己評価> | <u>3. 目標どおりの成果をあげた</u> |

1. 6. 研究成果発表状況の概要

1. 6. 1. 研究成果発表の件数

成果発表の種別	件数
産業財産権	0
査読付き論文	5
査読無し論文	0
著書	0
「国民との科学・技術対話」の実施	8
口頭発表・ポスター発表	7
マスコミ等への公表・報道等	2
成果による受賞	1
その他の成果発表	0

1. 6. 2. 主要な研究成果発表

成果 番号	主要な研究成果発表 (「研究成果発表の一覧」から10件まで抜粋)
1	Yoshinaga N, Tateishi A, Kobayashi Y, Kubo T, Miyakawa H, Satoh K, Numata K (2023) Effect of Oligomers Derived from Biodegradable Polyesters on Eco- and Neurotoxicity. <i>Biomacromolecules</i> , 24(6):2721-2729.
2	Matsumoto M, Ito H, Tateishi A, Kobayashi Y, Satoh K, Numata K, Miyakawa H (2023) Effects of polycaprolactone degradation products on the water flea, <i>Daphnia magna</i> : Carbodiimide additives have acute and chronic toxicity. <i>Journal of Applied Toxicology</i> , 43:1840-1848.
3	Miyakawa H, Iguchi T (2023) Establishment of a testing system for juvenoids that disturbs the sex determination system of <i>Daphnia</i> , based on a molecular interaction of ligands and the JH receptor. <i>Current Opinion in Toxicology</i> , 36:100425.
4	Ito H, Matsumoto M, Mitsukuni K, Suzuki T, Miyakawa H (2025) Transcriptome analysis suggests chronic toxic effects of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in <i>Daphnia magna</i> via induction of endoplasmic reticulum stress. <i>Journal of Applied Toxicology</i> , 45:1900-1907.
5	【Web公開済】 Ito H, Miyakawa H (2025) Developmental-stage-dependent gape limitation in the toxic effect of polystyrene microbeads on the water flea, <i>Daphnia magna</i> . <i>Journal of Applied Toxicology</i> , in press.
6	○宮川一志「ミジンコを用いた化学物質の生物影響の作用機序の解明」 第12回 CSJ化学フェスタ 特別企画：高分子の分解を多方面・他分野から考える（シンポジウム発表） 2022年10月18日

7	○宮川一志「オオミジンコを用いたPCL分解産物の生物影響の解析」 海洋プラスチックごみ学術シンポジウム（研究セッション） セッションC：生物・生態系影響 2023年3月5日
9	伊東 春佳、松本 恵、○宮川 一志「オオミジンコを用いた網羅的遺伝子発現解析によるカルボジミドの生殖毒性発揮機構の解明」 日本動物学会 第95回長崎大会 2024年9月14日
10	○宮川一志「環境指標生物オオミジンコを用いた高分子分解産物の生物毒性の解析」 第73回高分子討論会 S17. 水、土壌、大気環境をまもる高分子（シンポジウム発表） 2024年9月25日
11	○宮川一志「ミジンコでエコデボを実践する：表現型可塑性の分子機構の解明とその環境科学への応用」 第72回日本生態学会大会 宮地賞受賞講演 2025年3月16日

注：この欄の成果番号は「研究成果発表の一覧」と共通です。

1. 6. 3. 主要な研究成果普及活動

本研究課題での成果普及活動は、合計で8件行った。そのうち、特に重要なものとしては、高校生を対象とした「バイオテクノロジー体験講座」における研究内容や成果の紹介である（成果13、17、18、20）。バイオテクノロジー体験講座では、講義で研究を紹介するだけでなく、実際に一人一台の顕微鏡を用いてミジンコを観察し、また最新の分子生物学実験を行うことで、基礎生物学や環境科学研究の現場でどのような形でミジンコが活用されているかを体験しながら学ぶことができる。講座の開催には科研費ひらめきときめきサイエンス等も活用することで、高額な試薬代がかかるこのような講座であっても高校生の講座参加費用は無料としている。代表者はこのような講座をこの3年間で延べ200人以上の高校生に対して行っており、いずれの回においても事後アンケートで非常に高い評価を得ている。

1. 7. 国際共同研究等の状況

<国際共同研究の概要>

国際共同研究を実施していない。

1. 8. 研究者略歴

<研究者（研究代表者及びサブテーマリーダー）略歴>

研究者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
宮川一志	研究代表者、サブテーマ1リーダー、およびサブテーマ2リーダー 北海道大学大学院環境科学院博士後期課程修了 博士（環境科学） 基礎生物学研究所博士研究員を経て、 現在、宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター准教授 専門は発生生物学、環境科学、進化生物学 研究テーマは生物の環境応答の分子機構の解明とその環境科学への応用 日本動物学会奨励賞、日本生態学会宮地賞を受賞 詳細は https://researchmap.jp/h-miya

2. 研究成果発表の一覧

注：この項目の成果番号は通し番号です。

(1) 産業財産権

成果番号	出願年月日	発明者	出願者	名称	出願以降の番号
	特に記載する事項はない。				

(2) 論文

<論文>

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ	査読の有無
1	2023	Yoshinaga N, Tateishi A, Kobayashi Y, Kubo T, Miyakawa H, Satoh K, Numata K (2023) Effect of Oligomers Derived from Biodegradable Polyesters on Eco- and Neurotoxicity. Biomacromolecules, 24(6):2721-2729. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00160	1	有
2	2023	Matsumoto M, Ito H, Tateishi A, Kobayashi Y, Satoh K, Numata K, Miyakawa H (2023) Effects of polycaprolactone degradation products on the water flea, <i>Daphnia magna</i> : Carbodiimide additives have acute and chronic toxicity. Journal of Applied Toxicology, 43:1840-1848. https://doi.org/10.1002/jat.4516	1	有
3	2023	Miyakawa H, Iguchi T (2023) Establishment of a testing system for juvenoids that disturbs the sex determination system of <i>Daphnia</i> , based on a molecular interaction of ligands and the JH receptor. Current Opinion in Toxicology, 36:100425. https://doi.org/10.1016/j.cotox.2023.100425	1	有
4	2025	Ito H, Matsumoto M, Mitsukuni K, Suzuki T, Miyakawa H (2025) Transcriptome analysis suggests chronic toxic effects of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in <i>Daphnia magna</i> via induction of endoplasmic reticulum stress. Journal of Applied Toxicology, 45:1900-1907. https://doi.org/10.1002/jat.4816	1	有
5	2025	【Web公開済】 Ito H, Miyakawa H (2025) Developmental-stage-dependent gape limitation in the toxic effect of polystyrene microbeads on the water flea, <i>Daphnia magna</i> . Journal of Applied Toxicology, in press. https://doi.org/10.1002/jat.4875	2	有

(3) 著書

<著書>

成果	発表	成果	主たる
----	----	----	-----

番号	年度	情報	サブテーマ
	特に記載する事項はない。		

(4) 口頭発表・ポスター発表

<口頭発表・ポスター発表>

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ	査読の有無
6	2022	○宮川一志「ミジンコを用いた化学物質の生物影響の作用機序の解明」 第12回 CSJ化学フェスタ 特別企画：高分子の分解を多方面・他分野から考える（シンポジウム発表） 2022年10月18日	1	無
7	2023	○宮川一志「オオミジンコを用いたPCL分解産物の生物影響の解析」 海洋プラスチックごみ学術シンポジウム（研究セッション） セッションC：生物・生態系影響 2023年3月5日	1	無
8	2023	○伊東 春佳、松本 恵、立石 綾香、小林 祥彰、佐藤 浩太郎、沼田 圭司、宮川 一志「オオミジンコを用いたポリカプロラクトン分解産物の毒性評価」 日本動物学会 第94回山形大会 2023年9月9日	1	無
9	2024	伊東 春佳、松本 恵、○宮川 一志「オオミジンコを用いた網羅的遺伝子発現解析によるカルボジイミドの生殖毒性発揮機構の解明」 日本動物学会 第95回長崎大会 2024年9月14日	1	無
10	2024	○宮川一志「環境指標生物オオミジンコを用いた高分子分解産物の生物毒性の解析」 第73回高分子討論会 S17. 水、土壌、大気の環境をまもる高分子（シンポジウム発表） 2024年9月25日	1	無
11	2025	○宮川一志「ミジンコでエコデボを実践する：表現型可塑性の分子機構の解明とその環境科学への応用」 第72回日本生態学会大会 宮地賞受賞講演 2025年3月16日	2	無
12	2025	○宮川一志「ミジンコを用いた内分泌攪乱作用の評価試験法」 第52回日本毒性学会学術年会 内分泌攪乱作用の評価試験法の多様性と共通性（シンポジウム発表） 2025年7月2日	2	無

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
13	2022	高校生のための「バイオテクノロジー体験講座」（ひらめき☆ときめきサイエンスプログラム、本研究代表者がプログラム代表）にて研究内容及び成果を紹介（2022年8月1-2日、8-9日、参加者約100名）	1
14	2022	オープンキャンパスにて研究設備、研究内容及び成果を紹介（2022年8月6日、参加者約50名）	2
15	2022	栃木県立宇都宮高等学校における特別授業（滝の原教養講座）にて研究内容及び成果紹介（2022年9月20日、参加者約300名）	1
16	2023	オープンキャンパスにて研究設備、研究内容及び成果を紹介（2023年7月17日、参加者約80名）	2
17	2023	高校生のための「バイオテクノロジー体験講座」（コスモバイオ公	1

		開講座応援団を本研究代表者が受給)にて研究内容及び成果を紹介(2023年8月7-8日、参加者約30名)	
18	2023	栃木県立宇都宮高等学校・宇都宮女子高等学校を対象とした「バイオテクノロジー体験講座」にて研究内容及び成果を紹介(2023年11月18-19日、参加者約30名)	1
19	2024	オープンキャンパスにて研究設備、研究内容及び成果を紹介(2024年7月20日、参加者約100名)	2
20	2024	高校生のための「バイオテクノロジー体験講座」(ひらめき☆ときめきサイエンスプログラム、本研究代表者がプログラム代表)にて研究内容及び成果を紹介(2024年7月30-31日、8月1-2日、参加者約50名)	1

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
21	2023	成果のプレスリリース(令和5年7月19日「プラスチックなどに添加されるカルボジイミド化合物がミジンコに毒性を示すことを発見」)	1
22	2023	成果がWebメディアで紹介(令和5年7月20日「生分解性プラスチックはゼロリスクではない、添加剤の毒性に留意を!」環境展望台)	1

(7) 研究成果による受賞

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
23	2025	日本生態学会 第29回宮地賞受賞 2025年3月16日	2

(8) その他の成果発表

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
	特に記載する事項はない。		

権利表示・義務記載

本研究課題の成果の一部は科研費・学術変革領域(B)「高分子材料と高分子鎖の精密分解科学」から提供された試料を使用して得られたものである。

本研究課題の成果の一部は、宇都宮大学機器分析センターの共用設備を使用して得られたものである。

この研究成果報告書の文責は、研究課題に代表者又は分担者として参画した研究者にあります。
この研究成果報告書の著作権は、引用部分及び独立行政法人環境再生保全機構(ERCA)のロゴマークを除いて、原則的に著作者に属します。
ERCAは、この文書の複製及び公衆送信について許諾されています。

Abstract**[Project Information]**

Project Title : Analysis of Biological Effect of Polymer Molecules and Their Degradation Products for Designing Biosafety Materials

Project Number : JPMEERF20221R02

Project Period (FY) : 2022-2024

Principal Investigator : Miyakawa Hitoshi

(PI ORCID) : 0000-0002-3361-8443

Principal Institution : Utsunomiya University
Utsunomiya City, Tochigi, JAPAN
Tel: +81-28-649-5189
E-mail: h-miya@cc.utsunomiya-u.ac.jp

Cooperated by :

Keywords : Marine plastics issue, Biological effects, Polymer degradation products, *Daphnia magna*, Adverse outcome pathway.

[Abstract]

Polymeric materials are utilized in various fields such as packaging, textiles, agricultural materials, and medical applications, making them indispensable in modern society. However, due to post-use and environmental aging, they break down or undergo physical fragmentation, becoming micro-particles (microplastics) that are widely present in the natural environment. These particles are exposed to ecosystems, particularly aquatic ones, and may have various biological impacts on flora and fauna.

This study aims to deepen the understanding of the biological toxicity of polymers and to establish reliable toxicity testing methods and material design guidelines. Experiments were conducted to elucidate the effects and mechanisms of chemical substances generated from the degradation of polymers, such as polycaprolactone (PCL), on *Daphnia magna*, an environmental indicator species. Furthermore, reliable toxicity testing methods for insoluble molecules were established, and an integrated model of toxicity mechanisms considering physical degradation, chemical degradation, and additive leaching was constructed based on the experimental results.

In toxicity tests using polystyrene microbeads of different sizes, simulating physical degradation, it was found that the particle size that is easily taken up by organisms changes depending on their developmental stage. Additionally, the shape of the particles was suggested to influence toxicity. In comparisons of the properties and toxicity of PCL polymers, oligomers, and monomers, simulating chemical degradation, it was found that polymers, being insoluble, accumulated in the digestive tract and exhibited toxicity, whereas soluble oligomers and monomers did not accumulate in the body and had lower toxicity. Furthermore, in the toxicity evaluation of the additive carbodiimide, gene

expression analysis indicated the induction of endoplasmic reticulum stress, suggesting that the high reactivity of carbodiimide cross-links proteins and imposes stress on cells.

These findings suggest the necessity of evaluating microplastic risks from multiple perspectives, including particle size, specific gravity, dispersion state, and the life history of organisms, rather than just the type of substance. Additionally, it was revealed that conventional standard toxicity tests do not capture all effects, and the results of this study are expected to contribute to the design of environmentally friendly polymer materials through the establishment of new toxicity indicators and testing methods.

[References]

- Matsumoto M, Ito H, Tateishi A, Kobayashi Y, Satoh K, Numata K, Miyakawa H (2023) Effects of polycaprolactone degradation products on the water flea, *Daphnia magna*: Carbodiimide additives have acute and chronic toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 43:1840-1848.
<https://doi.org/10.1002/jat.4516>
- Ito H, Matsumoto M, Mitsukuni K, Suzuki T, Miyakawa H (2025) Transcriptome analysis suggests chronic toxic effects of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in *Daphnia magna* via induction of endoplasmic reticulum stress. *Journal of Applied Toxicology*, 45:1900-1907.
<https://doi.org/10.1002/jat.4816>
- Ito H, Miyakawa H (2025) Developmental-stage-dependent gape limitation in the toxic effect of polystyrene microbeads on the water flea, *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, in press.
<https://doi.org/10.1002/jat.4875>

This study was supported by the Environment Research and Technology Development Fund of the ERCA (JPMEERF20221R02) funded by the Ministry of the Environment.