Final Research Report of the 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-2204
体系的番号	JPMEERF20221R04
研究課題名	マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明
Project Title	Evaluation of Lung Toxicity of Micro / Nano Plastics by Inhalation Exposure and Investigation of Lung Toxicity Caused by Different Surface Functional Groups
研究代表者	友永　泰介
研究代表機関	産業医科大学
研究分担機関	なし
キーワード	マイクロプラスチック、吸入ばく露試験、肺有害性評価、表面官能基、気管内注入試験

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

環境研究総合推進費 Environment Research and Technology Development Fund

独立行政法人 環境再生保全機構 ERCA Environmental Restoration and Conservation Agency

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 11
１．３．　研究目標 12
１．４．　研究内容・研究結果 13
１．４．１．研究内容 13
１．４．２．研究結果及び考察 18
１．５．　研究成果及び自己評価 52
１．５．１．　研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献 52
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 53
１．６．　研究成果発表状況の概要 53
１．６．１．　研究成果発表の件数 53
１．６．２．　主要な研究成果発表 54
１．６．３．　主要な研究成果普及活動 55
１．７．　国際共同研究等の状況 55
１．８．　研究者略歴 55
２．　研究成果発表の一覧 57
（１）　産業財産権 57
（２）　論文 57
（３）　著書 57
（４）　口頭発表・ポスター発表 57
（５）　「国民との科学・技術対話」の実施 58
（６）　マスメディア等への公表・報道等 58
（７）　研究成果による受賞 58
（８）　その他の成果発表 59
権利表示・義務記載 59

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-2204
体系的番号：	JPMEERF20221R04
研究課題名：	マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明
研究代表者：	友永　泰介
研究代表機関：	産業医科大学
研究分担機関：	
研究協力機関：	

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「マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明」

＜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	産業医科大学	産業生態科学研究所　呼吸病態学	学内講師	友永泰介	
協力者	産業医科大学	産業生態科学研究所　呼吸病態学	教授	森本泰夫	
協力者	産業医科大学	産業生態科学研究所　労働衛生工学	教授	東秀憲	
協力者	産業医科大学	産業生態科学研究所　呼吸病態学	准教授	和泉弘人	

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＞

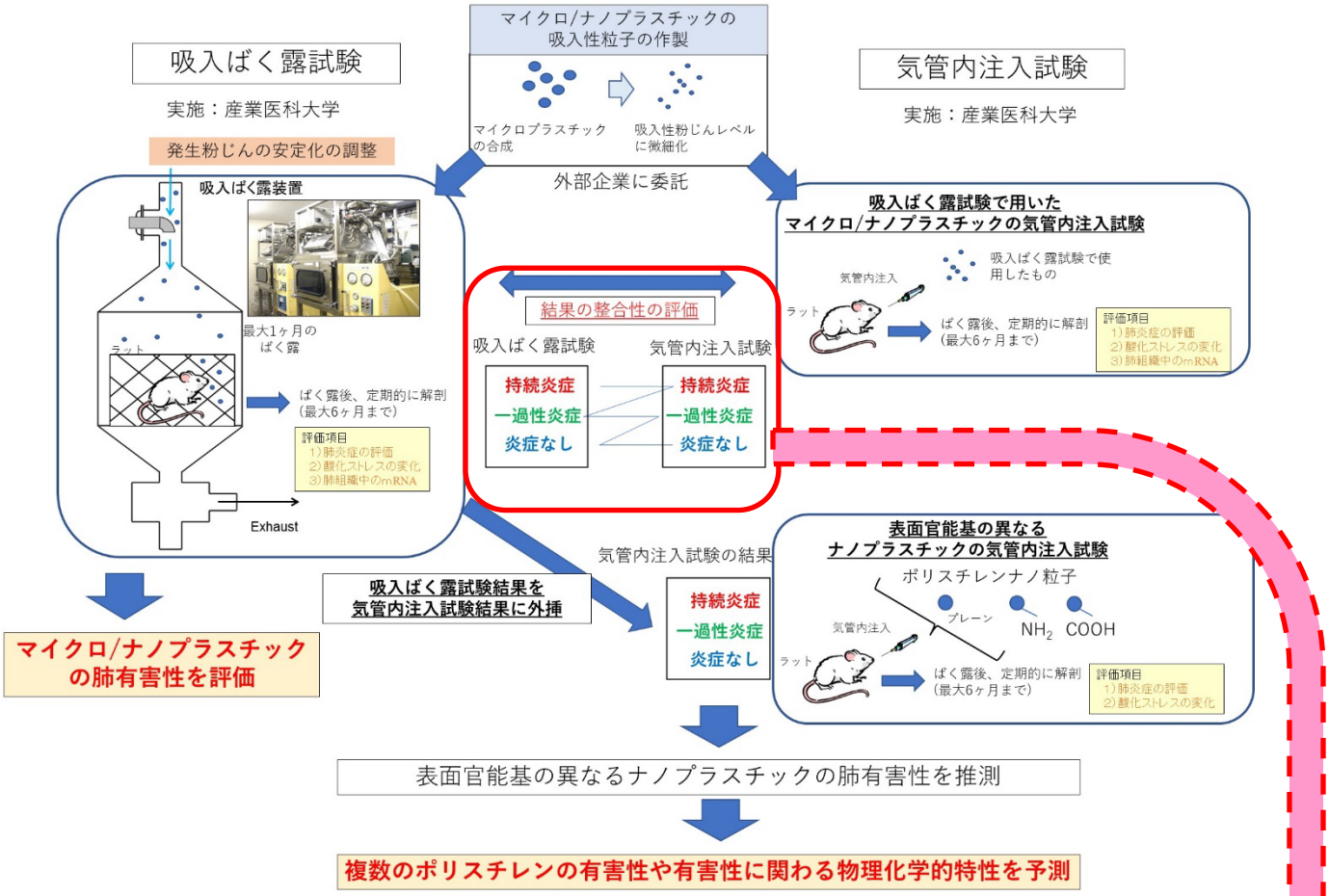
年度	直接経費（円）	間接経費（円）	経費合計（円）	備考（自己充当等）
2022	4,615,197	1,350,787	5,965,984	5983000
2023	4,613,000	1,370,000	5,983,000	5983000
2024	2,748,700	824,610	3,573,310	3575000
全期間	11,976,897	3,545,397	15,522,294	15541000

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。

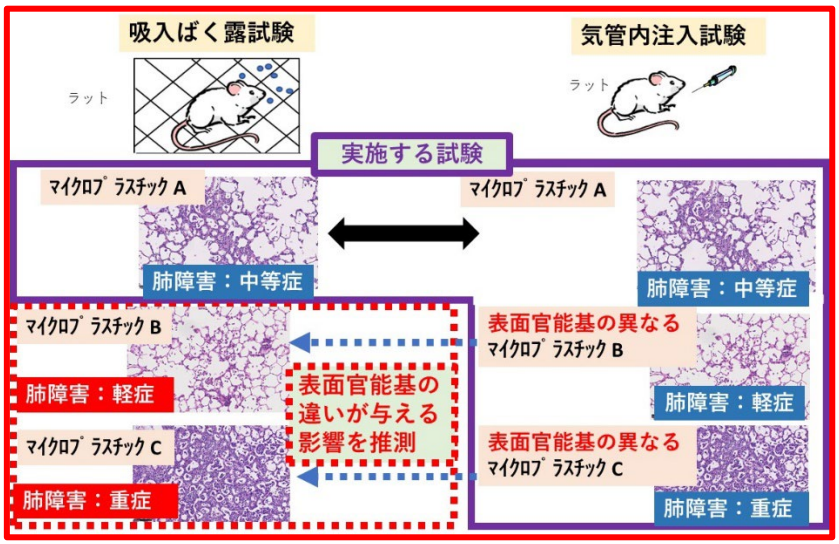
＜研究の全体概要図＞

研究課題名：マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明

研究目的：経気道ばく露によるマイクロ/ナノプラスチックの肺有害性を明らかにする



吸入ばく露試験と気管内注入試験の結果の整合性の評価方法



１．研究成果

１．１．　研究背景

マイクロプラスチックは、直径 5 mm 以下のプラスチックと定義され、微細なプラスチックビーズなどの一次マイクロプラスチックや、プラスチックの破砕や劣化などによって微細化した二次マイクロプラスチックによって生成される。マイクロプラスチックを含むプラスチックの海洋汚染が近年問題となっており、経済協力開発機構(OECD)では、全世界におけるプラスチックの環境中への流出量(2019 年)を約 2,200 万トンと推定しており、そのうち、約 12%がマイクロプラスチックであると推定している。さらに、2060 年までにプラスチック廃棄量は現在の約 3 倍になると推定されており(OECD, 2022)、今後もマイクロプラスチックの環境中の排出量は増えていくことが危惧されている。他方、マイクロプラスチックは、海洋にとどまらず、大気中でも確認されている。また、大気中のマイクロプラスチックは、地表面の影響を受けない高度上空の自由大気圏でも検出されている(大河内博 他, 2022)。このことから、大気中のマイクロプラスチックも海洋プラスチックと同様にグローバルの問題と考えられる。大気中マイクロプラスチックの発生過程については、いまだ未解明の部分も多く、プラスチックの廃棄、廃棄物処理場や道路塵埃、一般家庭など陸からの排出以外にも、海洋からの吹上による発生が考えられている(Yao et al., 2022)。つまり、海洋マイクロプラスチックは大気中マイクロプラスチックとも関連が考えられることから、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）」は、大気中のマイクロプラスチックにも通じる課題であると認識している。

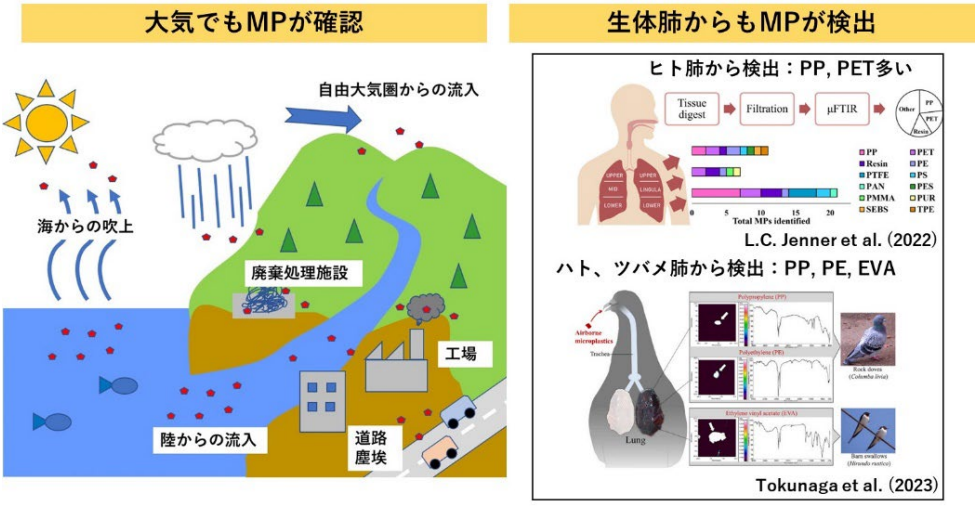


図1. 大気中と生体中(肺内)のマイクロプラスチック

実際に、ヒトや鳥の肺からマイクロプラスチックが検出されており、呼吸を通して体内へ取り込まれている実態がすでに報告されている（Jenner et al., 2022)(Tokunaga et al., 2023)(図１)。これらの報告は、大気中マイクロプラスチックが呼吸を通して肺に蓄積したことを示しており、呼吸を介した生体影響が懸念されている。

大気中マイクロプラスチックの生体影響が懸念される理由として、プラスチックは、安定性の高い物質であり、生体内で分解されずに長期間、肺内にとどまる可能性があることが挙げられる。一般的に微細な粒子を吸い込むことによって生じるじん肺は、分解されにくい物質が肺内にとどまり、肺内で炎症が持続することで、線維化や腫瘍化が起こると考えられている。このような体内滞留性のある無機粒子(石綿など)は、線維化、がん化を引き起こすことが周知の事実である。このため、同様に、長期間体内滞留性のあるマイクロプラスチックが一般大気中あるいは作業環境中に存在することは、人

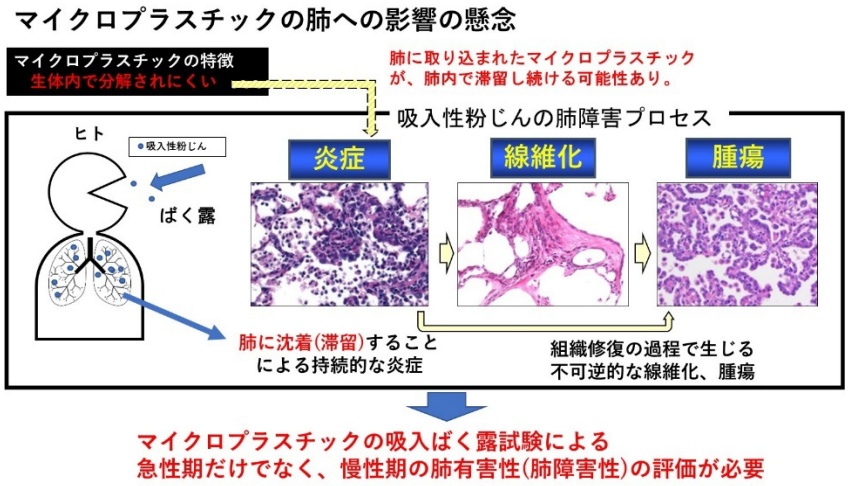


図2. マイクロプラスチックの肺への影響の懸念

への慢性的な生体影響があるか否かは関心が持たれる。マイクロプラスチックは、一度肺内に侵入すると長期間肺内にとどまる可能性があることから、生体への急性期の影響だけでなく長期的な影響も懸念され、大気中マイクロプラスチックによる肺を主とする生体影響を解明することは喫緊の課題である(図２)。

大気中マイクロプラスチックの存在の現状

大気中マイクロプラスチックの生体影響を調べる上で、対象とする大気中に存在するマイクロプラスチックのキャラクタリゼーション(種類、形状、粒子径、表面性状など)や存在量(濃度)が重要であると考えている。一般的に、肺内に侵入できるサイズの粒子が、じん肺などの肺に影響を与えることが知られており、肺に影響を与える可能性のあるマイクロプラスチックを生体影響のターゲットにする必要がある(図３)。

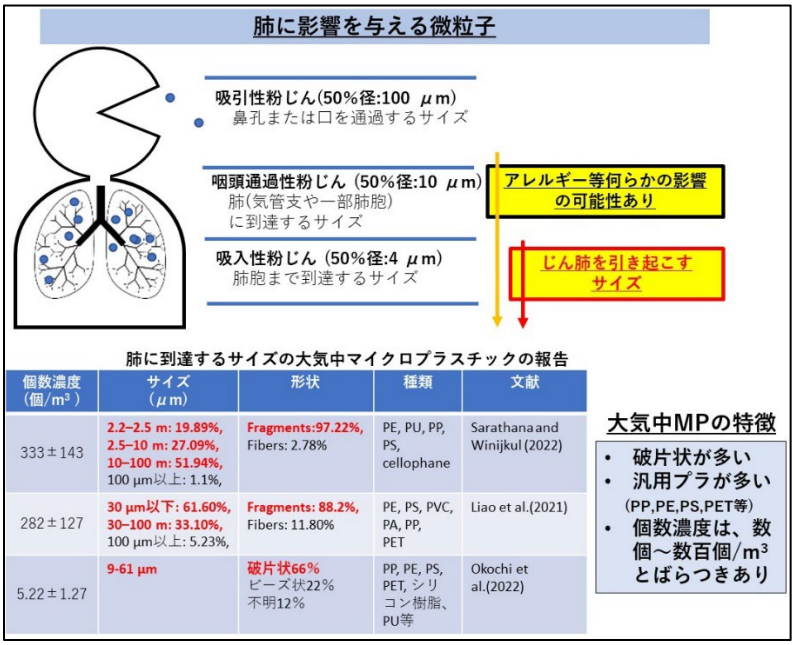


図3.肺に影響を与える微粒子

種類：ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレートなど様々なマイクロプラスチックが大気中で検出されているが、報告によって、マイクロプラスチックの種の存在割合は異なる(Yao et al., 2022) (Zhang et al., 2020)。これらの測定には、赤外分光光度計(FT-IR)やラマン分光光度計を用いて、目視での解析が行われていること、サンプル処理方法が確立されていないことなど、解析条件が異なる等の背景があるため、報告ごとのばらつきが生じうる。

形状：マイクロプラスチックの形状には、繊維状や破片状のものが存在するが、繊維状のものは数百μm程度で、数μmレベルのマイクロプラスチックでは、破砕状のものが多く占めることが報告されている(Sarathana and Winijkul, 2022) (大河内博 他, 2022)。

粒子径：大気中マイクロプラスチックの肺内に影響を与えるサイズは、十分に肺内に到達できるサイズである必要がある。一般的なじん肺の発生には、肺の末端のガス交換を担う肺胞に到達するレベルの粒径数μmのサイズが影響しており、このサイズの粉じんは吸入性粉じんと呼ばれ、4 μm(50%径)以下といわれている(Oberdörster et al., 2005)。大気中マイクロプラスチックの肺への影響を評価するうえでは、数μm程度のマイクロプラスチックをターゲットにする必要がある。実際に、大気中マイクロプラスチックの空気動力学径分布(空気の流れに影響する粒子径)では、3～7 μmの範囲の粒径のマイクロプラスチックが最も多く検出されたことが報告されている(大河内博 他, 2022)。

表面性状：マイクロプラスチックの表面の性状について、紫外線劣化することでカルボキシル末端基が形成されることが報告されている(Gewert, Plassmann and MacLeod, 2015)。表面官能基が変化することで、マイクロプラスチックのもつ表面の電荷が変化すると考えられる。この表面の電荷の違いは、生体内での細胞への接着性が変わることから、生体に影響を与える重要な要素と考える。つまり、実環境中のマイクロプラスチックの肺への影響を調べるうえで、表面の性状、すなわち表面官能基の違いによる評価は調べるべき課題であると認識している。

付加的な影響：マイクロプラスチックに別の大気汚染物質が付着することや、光劣化による変性による、相加作用や相乗作用による健康影響も懸念されている。実験レベルでは、ポリエチレンテレフタレートを光劣化させたとき、テレフタル酸 (TPA) が検出されたことが報告されている(Ishihara et al., 2025)。またポリスチレンとフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)のマウスへの混合ばく露が、アレルギー反応の増強作用が出てくることが報告されている(Han et al., 2023)。しかしながら、物理化学的性質の異なるマイクロプラスチックにその性質に依存して大気汚染物質が付着するのか標準的な見解も得られていない。このため、本研究課題では、他の大気汚染物質との相互作用を調べる前に、まずはマイクロプラスチック単体での生体、特に肺に与える影響を調べることを優先とした。

濃度：実際に報告されている、数μmサイズの大気中のマイクロプラスチックは、数個～数100個/m^{3}と報告されているが、ナノサイズの検出技術は発展途上であり、その存在量は不確定といわれている。これらの誤差は、観測する時期や場所、風向きや気象条件によっても左右される。一方で、海外の報告であるが、ゴ

ミ捨て場付近では、そのほかの地点と比べて、マイクロプラスチックの飛散量が2～3倍高いことが報告されている(Sarathana and Winijkul, 2022)。一般環境中であっても、マイクロプラスチックの発生源に近い住民によっては、比較的高濃度のばく露も想定する必要があると考えられる。これらの大気中マイクロプラスチックの存在の報告から、観測地点や条件により様々な報告がなされており、現状では、標準的な種類やサイズ、形状のマイクロプラスチックについて統一された見解は得られていない。

以上のように、マイクロプラスチックの生体影響を評価するためには、マイクロプラスチックの様々な物理化学的特性を考慮する必要がある。行政ニーズで掲げられた「(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」にもある通り、本研究課題では、生体影響に影響を与えると考えられる物理化学的特性の一つとして、実環境中でも生じると考えられる表面性状の変化、特に表面修飾による影響を調べることとした。

マイクロプラスチックのばく露試験と評価について

一般に、吸入性化学物質の肺障害の機序として、肺内に吸入性化学物質が沈着し、肺内で炎症を引き起こすが、この炎症が持続することで、組織の修復過程で不可逆的な線維化や腫瘍化につながる。じん肺の代表的な物質として、シリカやアスベストが挙げられるが、これらの物質は、肺内で炎症が持続し、線維化や肺がん、中皮腫などの腫瘍発生を引き起こす。このため、吸入性化学物質による持続炎症の存在は、不可逆的な線維化や腫瘍発生の前病変であると考えられる。動物を用いた吸入性化学物質のばく露試験では、不可逆的な線維化や腫瘍発生の前病変と考えられる持続炎症の評価も重要である。

ラットを用いた動物ばく露による肺への影響評価には気管内注入試験と吸入ばく露試験がある(図４)。

気管内注入試験は、試験対象物質を溶媒に分散させ、ラットを十分に麻酔させた後、ラットの気管内に分散液を一度に投与を行うことから、比較的簡便に実施することができるが、非生理学的なばく露であり、試験物質の肺有害性の最終判断には使用できない。一方で、吸入ばく露試験は、ばく露チャンバー内に粉じんを均一に発生させ、ラットをチャンバー内に入れることで、ラットの自発呼吸によりばく露を実施することから、有害性評価のゴールドスタンダードである。しかしながら、これまでマイクロプラスチックの吸入ばく露試験の報告は、ポリスチレンナノ粒子の14日間の吸入ばく露試験(Lim et al., 2021)や、ポリアミドを用いた4時間の超短期の吸入ばく露試験(Cary et al., 2023)の2報告しか見当たらず、世界的にも、マイクロプラスチックの吸入ばく露による影響評価の報告は乏しいのが現状である。

このため、本研究では、吸入ばく露試験によるマイクロプラスチックの肺有害性評価を実施することを重要なテーマの一つとしている。ただし、吸入ばく露試験は大型の設備を要し、粉じん発生濃度の安定化、発生粉じんの分散性の確保などの技術を要し、また細かなモニタリングも必要であることから、設備や人員などコストがかかるためマイクロプラスチックの評価を簡便に実施することができない。つまり、吸入ばく露試験の実施自体が本研究課題の大きな挑戦であると認識している。

一方で、いくつものマイクロプラスチックの吸入ばく露による影響を評価することは前述の通り困難であることから、本研究課題では、気管内注入試験と吸入ばく露試験を併用し、気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果の整合性を確認し、気管内注入試験から有害性を推定する手法を検討している。実際に、我々は、これまでの様々な工業用ナノ材料と主とした吸入性化学物質の動物ばく露試験を実施し、気管内注入試験が吸入性化学物質のスクリーニング試験としての有用性を見出している(Morimoto et al., 2016)。マイクロプラスチックにおいても、吸入ばく露試験を実施することにより、マイクロプラスチックの肺への影響、肺有害性を評価するとともに、気管内注入試験を実施することで、両者のばく露試験を比較し、基準病変の相同性を確認することで、マイクロプラスチックの気管内注入試験の結果から、肺有害性の推定・スクリーニング評価手法の構築することも重要な課題と考えている(図５)。これは、効率的なリスク評価につながる課題であることから【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」に貢献する内容であると考える。

	吸入ばく露試験	気管内注入試験
	ラット	ラット
概要	ばく露チャンバー内に粉じんを発生させ、ラットの呼吸により粉じんをばく露	溶媒に分散させたサンプルをラットの気管内に直接投与
メリット	最も生理的なばく露であり、肺有害性評価のゴールドスタンダード	一度の投与で良く、手技も比較的簡便。有害性のスクリーニングとして有用
デメリット	大きな設備が必要。 ばく露濃度の安定化が難しく、 高い技術が必要	大量の物質を非生理的に注入するため、ヒトでは生じにくい反応を認め、肺障害性を含め有害性の最終判断とはならない

図4. 動物ばく露試験の比較

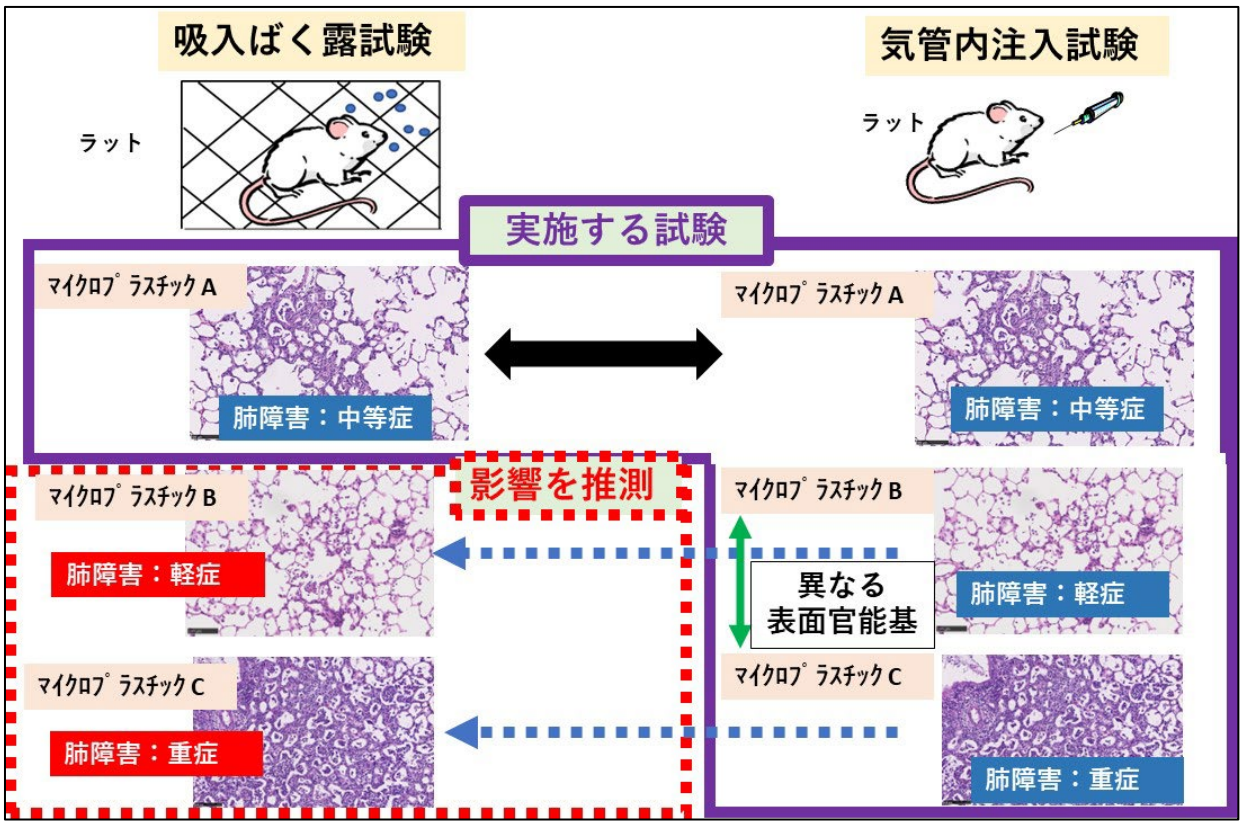


図5. 気管内注入試験結果を用いた肺有害性推定のスキーム

本研究の試験モデルの選定について

本研究では、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験を実施することで、マイクロプラスチックの肺への影響、すなわち肺有害性の評価を主目的とし、本研究の結果が政策決定の寄与する基礎研究となることを主眼としている。マイクロプラスチックの肺有害性を検証するにあたり、上述の通り、実環境では様々な種類のマイクロプラスチックが確認されており、現在までに標準化のコンセンサスは得られていない。吸入性化学物質の有害性を検証するうえで、複数のマイクロプラスチックのばく露を実施した場合、肺への影響が確認されたとしても、有害性に寄与する物質の同定・検証は困難となる。また、マイクロプラスチックの肺への影響として懸念されている有害物質との相互作用、光劣化や風化によるマイクロプラスチックの変性による生体影響が懸念されているが、我々は、マイクロプラスチックの付加的な影響よりもまずは、マイクロプラスチック単体の影響を評価することが重要と考えている。しがたって、本研究では、単一のマイクロプラ

スチックを用いた吸入ばく露試験が必要と考えている。

一般環境でのマイクロプラスチックの生体影響を考える上で、ばく露期間は生涯ばく露であることから、動物を使用した吸入ばく露試験においても、長期間(ラットでは最大2年間)の吸入ばく露試験が必要となる。しかしながら、吸入ばく露試験の長期間の実施は簡単にはできない。このため、本研究では、まず短期間の吸入ばく露試験を実施する。

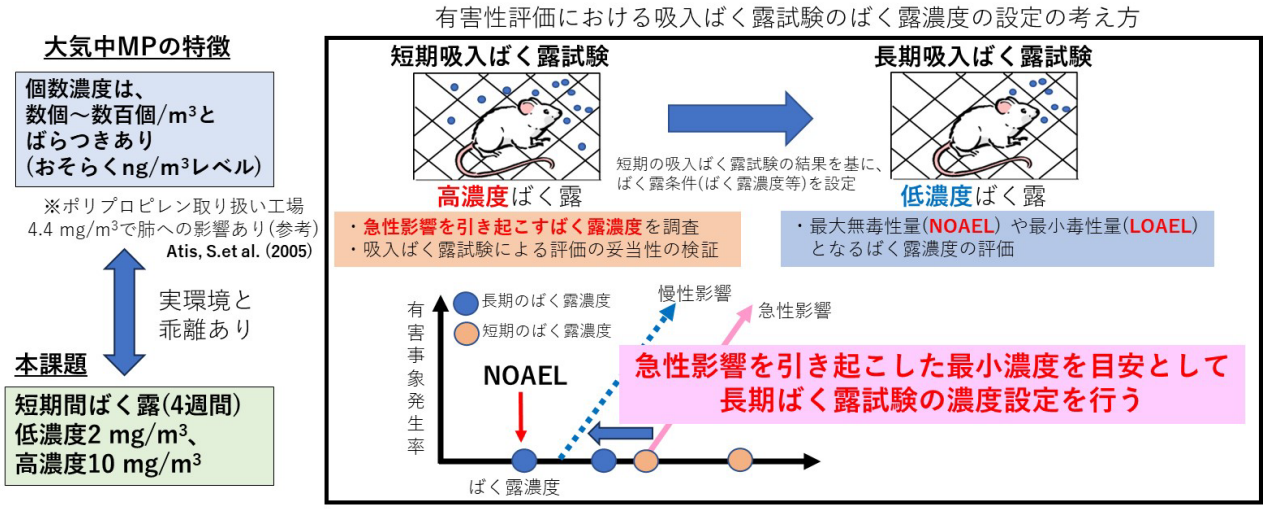


図6. 有害性評価における吸入ばく露試験のばく露濃度の設定の考え方

短期間の吸入ばく露試験では、ヒトの急性影響の評価、急性影響の環境指針値などの設定に有用である。肺に影響を与える閾値付近の濃度を導き出すことで、急性影響の環境基準値等に寄与するデータとなりうる。このため、短期の吸入ばく露試験では、急性影響を引き起こすある程度のばく露濃度の設定が必要となる。上述の通り、これまで報告されている吸入性粉じんレベルのマイクロプラスチックは数個～数100個/m³程度(重量濃度で推定ng/m³レベル)であり、実環境での報告の濃度と実験レベルのばく露濃度の間には乖離がある。一方で、ゴミ処理場やプラスチック製造工場など、マイクロプラスチックの発生源に近い環境では、通常よりも高い濃度でマイクロプラスチックが発生している(Sarathana and Winijkul, 2022) (Atis et al., 2005)。職業ばく露の室内環境において、ポリプロピレンを取り扱う加工工場内では、4.4 mg/m³の環境が発生し、肺への影響が報告されている(Atis et al., 2005)。

我々は、まずはマイクロプラスチックの急性影響を調べるために、短期の吸入ばく露試験のばく露濃度を高濃度に設定することとした。一方、急性影響だけでなく、肺の線維化、がん化などに代表される慢性的な生体影響も評価する必要がある。体内滞留性のある無機粒子(石綿など)は、線維化、がん化を引き起こすことが周知の事実である。同様に滞留性のあるマイクロプラスチックが一般大気中に存在することは、人への慢性的な生体影響があるか否かは関心が持たれる。生涯ばく露影響の評価は、慢性的な影響評価を基盤としていることから、急性期の肺への影響評価と比べ、慢性期の評価では、より低濃度でのばく露濃度の設定が必要となる。長期吸入ばく露試験からの知見は、生涯ばく露評価における重要な情報提供になると思われる。それゆえ、吸入ばく露の粒子径や有効なばく露濃度の設定や安定性を維持し、吸入ばく露試験を実施できること、急性の肺影響を確認することは、長期の吸入ばく露試験を実施するうえでは、重要なステップであり、長期間の吸入ばく露試験の実施に向けて、短期間の吸入ばく露試験でマイクロプラスチックの肺有害性の評価が可能であるか検証することは重要な課題と認識している(図６)。

参考文献

- OECD (2022), Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/aaledf33-en.
- 大河内博 他, 大気中マイクロプラスチックの現状と課題, 大気環境学会誌, 2022, 57 巻, 3 号, p. A66-A72, https://doi.org/10.11298/taiki.57.A66.
- Yao, X. *et al.* (2022) 'Ecological and human health risks of atmospheric microplastics (MPs): a review', *Environmental Science: Atmospheres*, 2(5), pp. 921-942. doi: 10.1039/D2EA00041E.
- Jenner, L. C. *et al.* (2022) 'Detection of microplastics in human lung tissue using μFTIR spectroscopy', *Science of The Total Environment*, 831, p. 154907. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154907.
- Zhang, Y. et al. (2020) 'Atmospheric microplastics: A review on current status and

perspectives', Earth-Science Reviews, 203, p. 103118. doi: 10.1016/j.earscirev.2020.103118.
- Tokunaga, Y. et al. (2023) 'Airborne microplastics detected in the lungs of wild birds in Japan', Chemosphere, 321, p. 138032. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138032.
- Sarathana, D. and Winijkul, E. (2022) 'Concentrations of Airborne Microplastics during the Dry Season at Five Locations in Bangkok Metropolitan Region, Thailand', Atmosphere, 14(1), p. 28. doi: 10.3390/atmos14010028.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005) 'Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.', Environmental health perspectives, 113(7), pp. 823-39. doi: 10.1289/ehp.7339.
- Gewert, B., Plassmann, M. M. and MacLeod, M. (2015) 'Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment', Environmental Science: Processes & Impacts, 17(9), pp. 1513-1521. doi: 10.1039/C5EM00207A.
- Ishihara, Y. et al. (2025) 'Impact of artificial sunlight aging on the respiratory effects of polyethylene terephthalate microplastics through degradation-mediated terephthalic acid release in male mice', Toxicological Sciences, 203(2), pp. 242-252. doi: 10.1093/toxsci/kfae135.
- Han, Q. et al. (2023) 'Co-exposure to polystyrene microplastics and di-(2-ethylhexyl) phthalate aggravates allergic asthma through the TRPA1-p38 MAPK pathway', Toxicology Letters, 384, pp. 73-85. doi: 10.1016/j.toxlet.2023.07.013.
- Lim, D. et al. (2021) 'Inhalation toxicity of polystyrene micro(nano)plastics using modified OECD TG 412', Chemosphere, 262, p. 128330. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128330.
- Cary, C. M. et al. (2023) 'Single inhalation exposure to polyamide micro and nanoplastic particles impairs vascular dilation without generating pulmonary inflammation in virgin female Sprague Dawley rats', Particle and Fibre Toxicology, 20(1), p. 16. doi: 10.1186/s12989-023-00525-x.
- Morimoto, Y. et al. (2016) 'Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles', Nanotoxicology, 10(5), pp. 607-618. doi: 10.3109/17435390.2015.1104740.
- Atis, S. et al. (2005) 'The respiratory effects of occupational polypropylene flock exposure.', The European respiratory journal, 25(1), pp. 110-7. doi: 10.1183/09031936.04.00138403.

１．２．　研究目的

本研究では、大気中に存在するマイクロプラスチックが呼吸を通して、肺内に取り込まれることよる生体影響を調べるために、実験動物を用いたマイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験を実施し、マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性評価を実施する。併せて、有害物質の吸着性に関与すると考えられる表面官能基の異なるポリスチレン微粒子を用いて、実験動物を用いた気管内注入試験を実施する。マイクロプラスチックの気管内注入試験の結果から有害性を予測するためには、有害性評価のゴールドスタンダードである吸入ばく露試験の結果との比較が必要となる。このため、同一のマイクロプラスチックの吸入ばく露試験と気管内注入試験を行い両者の整合性を確認し、吸入ばく露試験の結果を気管内注入試験の結果に外挿することで、表面官能基の異なるマイクロプラスチックの肺有害性を推測し、複数のポリスチレンの有害性や有害性に関わる物理化学的特性を予測する。様々なマイクロプラスチックの気管内注入試験を通して物理化学的特性を評価することにより、どの特性が肺障害に関与するか検討することも可能である。

本研究は、大気中マイクロプラスチックによる生体影響、特に肺への影響について、基礎的検証を行い、肺を中心とした生体影響の評価を行い、環境基準値の設定等の政策決定に寄与するエビデンスを示すことを目的とする。これは、重点課題の海洋プラスチック問題のみならず、大気中マイクロプラスチックによる生体影響を調べる課題であり、また行政要請研究テーマである「（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」を、吸入ばく露という側面からアプローチする研究課題である。

１．３．　研究目標

＜全体の研究目標＞

研究課題名	マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明
全体目標	マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性評価を総合的に行うため、実環境での経気道ばく露を想定した吸入ばく露試験と気管内試験を実施する。 まず、マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験を開始するため、粉体の調整、装置の安定稼働のための予備検討を実施し、ばく露チャンバー内の濃度や粒径を評価する。マイクロ/ナノプラスチックのばく露濃度や粒子径については、一般大気環境や廃棄物処理場のフィールド観測データの濃度の把握、PM2.5などの大気環境基準の設定根拠などを確認し、予備検討の結果を基に、総合的に勘案して設定を行う。その後、吸入ばく露試験を実験動物を用いて実施し、吸入ばく露後に、肺炎症などの病態の評価だけでなく、肺組織中のmRNAの網羅的解析、肺組織中のストレス解析を行うことで、マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性評価を行う。 次に、吸入ばく露試験で用いるマイクロ/ナノプラスチックを、実験動物を用いた気管内注入試験でも実施し、肺炎症の病態や炎症に係るサイトカイン、肺傷害因子の解析を行い、吸入ばく露試験の結果との整合性を確認する。続いて、有害物質の吸着性に関与すると考えられる表面官能基の異なるマイクロ/ナノプラスチックを、実験動物に気管内注入を行い、肺炎症の病態や炎症に係るサイトカイン、肺傷害因子の解析を行い、表面官能基の違いが与える肺への影響を検証し、吸入ばく露試験の結果を外挿することで、マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性や有害性に関わる物理化学的特性の予測や、どの物理化学的特性が肺障害に関与するか明らかにする。

＜サブテーマ１の研究目標＞

サブテーマ１名	マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験による肺有害性評価と表面官能基の違いが与える肺有害性の解明
サブテーマ１実施機関	産業医科大学
サブテーマ１目標	マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性評価を総合的に行うため、実環境での経気道ばく露を想定した吸入ばく露試験と気管内試験を実施する。 まず、マイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験を開始するため、粉体の調整、装置の安定稼働のための予備検討を実施し、ばく露チャンバー内の濃度や粒径を評価する。マイクロ/ナノプラスチックのばく露濃度や粒子径については、一般大気環境や廃棄物処理場のフィールド観測データの濃度の把握、PM2.5などの大気環境基準の設定根拠などを確認し、予備検討の結果を基に、総合的に勘案して設定を行う。その後、吸入ばく露試験を実験動物を用いて実施し、吸入ばく露後に、肺炎症などの病態の評価だけでなく、肺組織中のmRNAの網羅的解析、肺組織中のストレス解析を行うことで、マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性評価を行う。 次に、吸入ばく露試験で用いるマイクロ/ナノプラスチックを、実験動物を用いた気管内注入試験でも実施し、肺炎症の病態や炎症に係るサイトカイン、肺傷害因子の解析を行い、吸入ばく露試験の結果との整合性を確認する。続いて、有害物質の吸着性に関与すると考えられる表面官能基の異なるマイクロ/ナノプラスチックを、実験動物に気管内注入を行い、肺炎症の病態や炎症に係るサイトカイン、肺傷害因子の解析を行い、表面官能基の違いが与える肺への影響を検証し、吸入ばく露試験の結果を外挿することで、マイクロ/ナノプラスチックの肺有害性や有害性に関わる物理化学的特性の予測や、どの物理化学的特性が肺障害に関与するか明らかにする。

１．４．　研究内容・研究結果

１．４．１．研究内容

課題全体の研究内容

本研究課題では実験動物を用いたマイクロ/ナノプラスチックの吸入ばく露試験を主軸とし、気管内注入試験と吸入ばく露試験を併用し、1種のマイクロプラスチックの気管内注入試験と吸入ばく露試験を実施し、両者の結果の整合性(基準病変)を確認し、表面官能基の異なるマイクロプラスチックについては、気管内注入試験のみを実施し、基準病変と比較することで、表面官能基の異なるマイクロプラスチックを吸入することによる影響(有害性)を推定する(図５(再掲))。この研究課題を進めにあたり、吸入ばく露試験の予備検討、吸入ばく露試験の実施、吸入ばく露試験で用いたマイクロプラスチックの気管内注入試験、表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の実施を進めた。次項より、各試験の内容・方法について示す。なお、中間評価を受けて追加の研究として、培養細胞試験を追加し、表面官能基の異なるポリスチレンが細胞に与える影響の解析を実施している。また、本研究課題の実施で得られた解析サンプルや解析結果を最大限に活用し、大気中のマイクロプラスチックの肺への影響評価に応用が見込まれるスクリーニング指標の検討にも取り組んでいる。

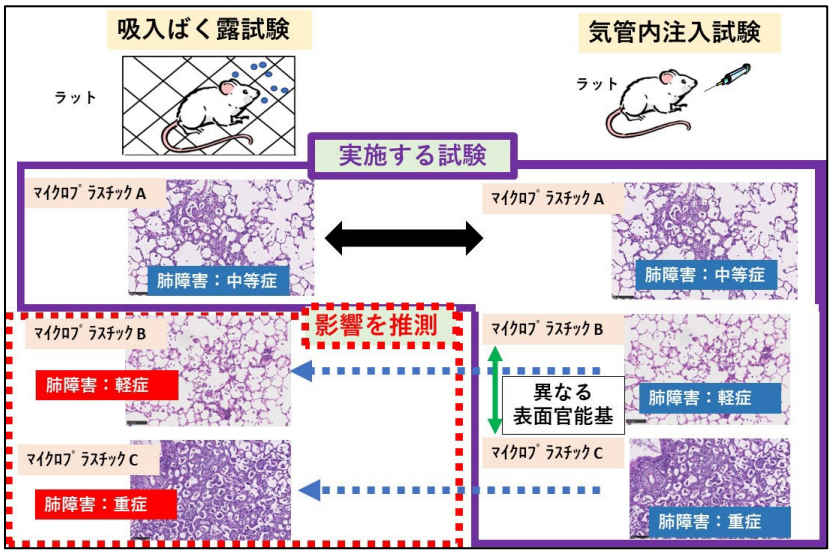


図5(再掲). 気管内注入試験結果を用いた肺有害性推定のスキーム

吸入ばく露試験の予備検討

まず、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験について、実環境中に存在が想定されるマイクロプラスチックを検討し、吸入ばく露試験に用いる試料の選定、調製をおこなった。吸入ばく露試験に用いる試料の選定にあたっては、肺への影響を評価するための適切な粒径、吸入ばく露試験を実施するための必要な量(数kgレベル)が確保できることが必要条件となる。このため、これらの条件を満たすマイクロプラスチックを入手することが一つの課題となる。当初、汎用プラスチックのうち合成の制御が比較的容易なポリスチレンを微細に合成して試料の調製を試みたが、数μmレベルの粒径に合成・調製することが難しく、選定の見直しを行った。同じく汎用プラスチックであるポリプロピレンは、実環境中でも数μmレベルで観測されており、その形状は破砕状であることが報告されている。複数の文献でも同様に、ポリプロピレンは、実環境中に微細な状態で確認されていること、実際のヒトの肺からも検出されていることから、ポリプロピレンにも種類を広げ、検討を行った。その後、微粉砕されたポリプロピレンが入手可能であったことから、微粉砕されたポリプロピレンを採用し、次の検討を進めることとした。次の検討では、実際に吸入ばく露装置を稼働させたときに、粒子同士の凝集を制御し、肺への影響を評価するための適切な粒径にすることや、安定したばく露となるようにマイクロプラスチックのばく露濃度の安定化を目指す必要があった。これらの課題に対して、予備検討を進めた。さらに、ばく露濃度自体の設定も重要である。吸入ばく露試験は、環境目標値等の設定根拠となる最大無毒性量や最小毒性量の濃度を明らかにする点も重要な課題であると考える。このため、目指すばく露濃度で安定したばく露が実施できるかについても予備試験を実施することで評価した。

なお、曝露チャンバー内のエアロゾルの個数濃度に対する粒子径分布は、光学式パーティクルカウンタ（KC-51、リオン、東京）あるいは粒子径分布計測器（Model 1000XP WPS、MSP Corp.、ミネソタ州ショアビュー）を使用して希釈状態で繰り返し測定した。吸入チャンバー内のポリプロピレンの重量濃度分布は、アンダーセンサンプラー（AN-200、東京ダイレック、茨城）で測定を実施した。ポリプロピレン粒子のばく露チャンバー内の分散状態は、分散液を乾燥させ、走査型電子顕微鏡（HITACHI S-4500、日立製作所、東京）を用いて、ポリプロピレンの走査型電子顕微鏡（SEM）画像で確認した。

吸入ばく露試験の実施

吸入ばく露装置の予備検討の結果、本試験の実施が可能と判断した場合に、1日6時間、週5日、4週間のばく露期間で、低濃度2 mg/m^3、高濃度10 mg/m^3 の2濃度を用いて、ばく露試験を実施した（図７）。ばく露期間中は、毎日2回のばく露濃度測定を実施し、ばく露濃度の安定化を行った。実験動物には、F344雄性ラッ

ト(ばく露開始時：8週齢)を用いて吸入ばく露試験を実施した。ばく露終了後は、3日後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後に解剖を実施した。解剖は、十分イソフルラン吸入麻酔が効いたことを確認したのち、心臓脱血による失血死を行った。その後、右肺からは、生理食塩水を用いて、自由落下(20cm・H_2O)により気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収した。BALF回収後の肺組織を回収した（図８）。

BALF中の細胞数はオートセルカウンター（ADAM-MC, AR BROWN CO., LTD.、東京）で計測し、その後、細胞をサイトスピンでスライドガラス上に撒き、簡易迅速染色液（Diff-Quik, Sysmex CO.、兵庫）で固定・染色した。その後、顕微鏡観察により好中球および肺胞マクロファージの数を計測した。BALF上清中に放出されたLDH活性は、製造元の指示に従って、細胞毒性検出キット（Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH), Roche Diagnostics GmbH、マンハイム、ノルトライン＝ヴェストファーレン、ドイツ）で測定した。LDH活性は、ウサギ筋肉由来の既知濃度の組み換えLDH（オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本）から得た標準曲線を使用して推定した。 炎症性サイトカインであるCINC-1 および CINC-2 のBALF 中の濃度は、それぞれ ELISA キット(#RCN100、#RCN200, R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス)で測定した。BALF サンプル中のラット MPO タンパク質の濃度は、ELISA キット(HK105, Hycult Biotech、オランダ）で測定した。肺防御因子であるサーファクタントプロテインD(SP-D))は、EIAキット(ヤマサ醤油株式会社、千葉、日本)を用いて測定を実施した。BALF後の肺組織からは、遺伝子解析や肺組織中の酸化ストレス指標であるヘモオキシゲナーゼ１(HO-1)の測定を実施した。具体的には、右肺第3葉を、タンパク質阻害剤カクテル（P8340、Sigma-Aldrich、米国ミズーリ州セントルイス）およびComplete Mini（Roche Diagnostics GmbH、マンハイム、ドイツ）を含むT-PER組織タンパク質抽出試薬（Thermo Scientific Inc.、イリノイ州ロックフォード、米国）でホモジェナイズし、遠心分離（4℃で10分間、20,400× g）した。抽出されたサンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）に供し、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）のメンブレンに転写した。転写されたメンブレンに、まず抗ヘムオキシゲナーゼ1抗体（1:1000希釈、品番：ab13243、Abcam Limited、マサチューセッツ州ケンブリッジ、米国）で検出した。検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて行った。信号強度は、以前の報告((Koi et al., 2017)で詳述されているように、LAS 4000 MiniおよびMulti Gaugeソフトウェアバージョン3.0（富士フイルム、東京、日本）を使用して定量化された。左肺は、自由落下による10%ホルムアルデヒド溶液を用いて、肺病理組織標本作製に使用する肺固定を実施した。

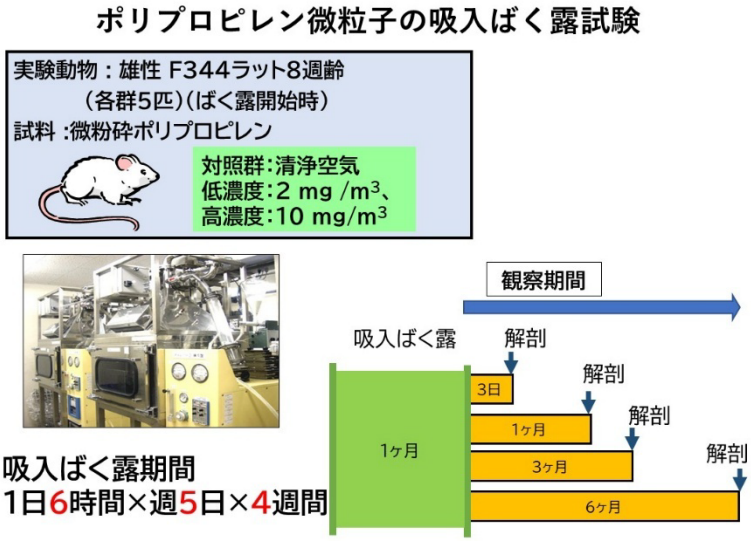


図７．ポリプロピレンの吸入ばく露試験のプロトコール

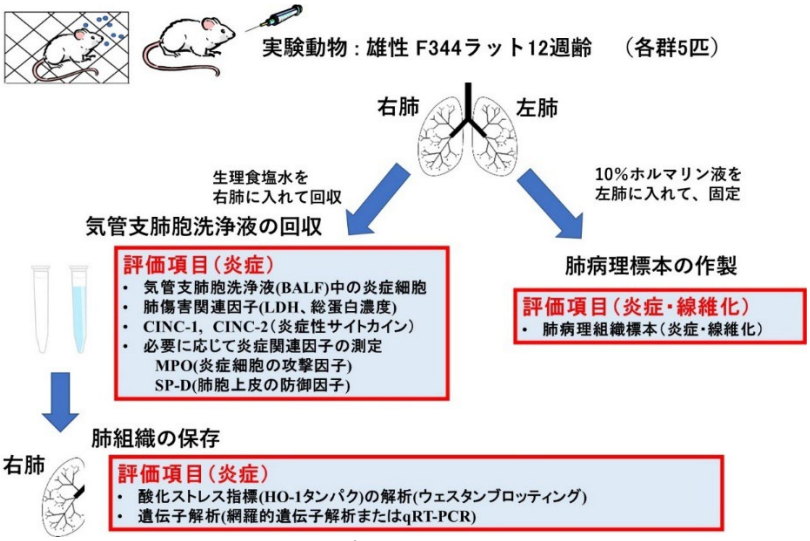


図８．解剖後のサンプル回収とその評価指標の概要

肺組織中の遺伝子解析については、まず、肺組織中のRNAの抽出を行った。全 RNA 抽出は、右肺の第 3

葉（各時点あたり n = 5 グループ）を、QIAzol 溶解試薬と TissueRupotor（Qiagen、ドイツ ヒルデン）を使用してホモジェナイズした。ホモジェナイズされた肺から、全 RNA を製造元の指示に従って miRNeasy Mini Kit（Qiagen、ドイツ ヒルデン）を使用して抽出した。 RNA の純度と完全性は、ND-1000 分光光度計（NanoDrop、米国ウィルミントン）、Agilent 2100 バイオアナライザー（Agilent Technologies、米国パロアルト）によって評価した。

網羅的遺伝子解析は、Affymetrix 全転写産物発現アレイを採用し、製造元のプロトコール（GeneChip 全転写産物プラス試薬キット）に従って実行した。cDNA は、GeneChip WT（全転写産物）増幅キットを使用して合成させた。次に、センス cDNA を断片化し、GeneChip WT ターミナル ラベリング キットを使用して TdT（末端デオキシヌクレオチド トランスフェラーゼ）でビオチン標識した。約 5.5 μg の標識 DNA ターゲットを Affymetrix GeneChip Rat Clariom-Schip に 45 ℃ で 16 時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズされたアレイは、GeneChip Fluidics Station 450 で洗浄および染色され、GCS3000 スキャナー（Affymetrix）で測定した。シグナル値は、Affymetrix® GeneChip™ Command Console ソフトウェアを使用して計算した。また、Transcriptome Analysis Console（TAC）バージョン 4.0（Thermo Fisher Scientific Inc.、米国マサチューセッツ州ウォルサム）を使用してヒートマップを作成した。ポリプロピレンで上昇していることが判明した関連遺伝子を、Kyoto Encyclopedia of Genomes（KEGG）Pathway 解析用の上記のマイクロアレイ データを使用して、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery（DAVID）バージョン 2021（https://david.ncifcrf.gov/home.jsp）を介して解析した。

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）は、まず肺から抽出した全 RNA を cDNA（High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、Thermo Fisher Scientific Inc.、MA、USA）に転写した。qRT-PCR アッセイは、メーカーのプロトコールに従って TaqMan（TaqMan Gene Ex-pression Assays、Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、USA）を使用して実施した。遺伝子発現データは、比較サイクル時間（ΔΔCT）法で分析した。 Assays-on-Demand TaqMan プローブとプライマーペアは、CD177（Assay ID Rn01454812_m1）、インターロイキン（IL)-17a（Assay ID Rn01757168_m1）、リポカイン 2（LCN2）（Assay ID Rn00590612_m1）、IL-4（Assay ID Rn01456866_m1）、IL-13（Assay ID Rn00587615_m1）、CXCL1（Assay ID Rn00578225_m1）、IL-5（Assay ID Rn01459975_m1）、CXCL6（Assay ID Rn00573587_g1）、および IL-1β（Assay ID 00580432_m1）をそれぞれ使用した。すべてのqRT-PCR解析は、aStepOnePlusTMリアルタイムPCRシステム（Thermo Fisher Scientific Inc.、マサチューセッツ州、米国）で実施した。すべての発現データは内因性コントロールβ-アクチン発現（アッセイID Rn00667869_m1）に標準化し、各ネガティブコントロールにおける遺伝子発現と比較して計算した。

参考文献

- Koi, C. et al. (2017) ‘Lovastatin induced Kruppel like factor 2 (KLF2), Kruppel like factor 6 (KLF6) and Ras homolog family member B (RHOB) genes and preferentially led to viability reduction of Cisplatin-resistant cells’, Oncotarget, 8(63), pp. 106429-106442. doi: 10.18632/oncotarget.22472.

吸入ばく露試験で用いるマイクロプラスチックの気管内注入試験

吸入ばく露試験で使用したマイクロプラスチックを0.1%Tween 80水溶液で懸濁し、低用量(0.2 mg/ラット、0.5 mg/mL 0.4 mL)、高用量(1.0 mg/ラット, 2.5 mg/mL 0.4 mL)となるように調製し、気管内注入試験を実施した。陰性対照群への注入液には溶媒のみの0.1%Tween 80水溶液を用いた。気管内注入試験に用いる懸濁液は、動的光散乱（DLS）（ZEN1600、Malvern Panalytical、Ltd.、マルバーン、英国）による粒子径の測定、あるいは走査型電子顕微鏡（HITACHI S-4500、日立製作所、東京）による溶液中の凝集状態を、分散液を乾燥させた後に撮影したSEM画像で確認した。

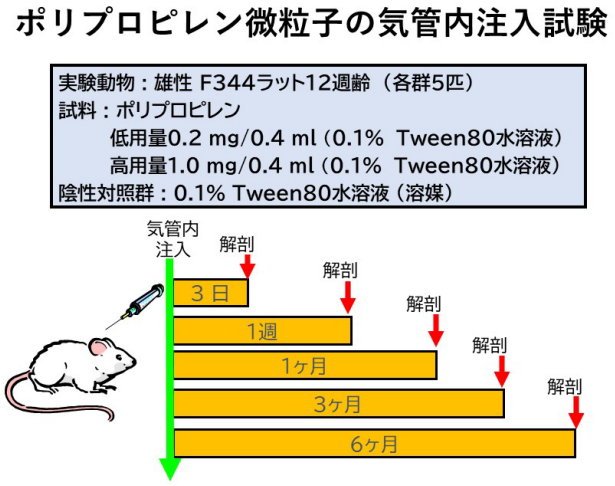


図９．ポリプロピレンの気管内注入試験のプロトコール

実験動物には、F344雄性ラット(12週齢)を用いて気管内注入試験を実施した。気管内注入試験の概要を図９に示す。気管内注入試験から3日後、1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後に解剖

を実施した。前述の解剖後の処理と同様に、右肺からは、生理食塩水を用いて、自由落下(20cm・H_2O)により気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収した。その後、BALF回収後の肺組織を回収した。

BALF中の細胞数はADAM-MC（AR BROWN CO.，LTD.、東京）で計測し、その後、細胞をサイトスピンでスライドガラス上に撒き、Diff-Quik（Sysmex CO.、兵庫、日本）で固定・染色した。その後、顕微鏡観察により好中球および肺胞マクロファージの数を計測した。BALF上清中に放出されたLDH活性は、製造元の指示に従って、Cytotoxicity Detection KitPLUS（LDH）(Roche Diagnostics GmbH、マンハイム、ノルトライン＝ヴェストファーレン、ドイツ）で測定した。LDH活性は、ウサギ筋肉由来の既知濃度の組み換えLDH（オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本）から得た標準曲線を使用して推定した。 炎症性サイトカインであるCINC-1 および CINC-2 のBALF 中の濃度は、それぞれ ELISA キット、#RCN100、#RCN200（R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス)、ELISA キットで測定した。BALF サンプル中のラット MPO タンパク質の濃度は、ELISA キット(HK105、Hycult Biotech、オランダ）で測定した。

肺防御因子であるサーファクタントプロテインD(SP-D))は、EIAキット(ヤマサ醤油株式会社、千葉、日本)を用いて測定を前述の通り実施した。BALF後の肺組織からは、遺伝子解析や肺組織中の酸化ストレス指標であるヘモオキシゲナーゼ１(HO-1)の測定を前述の通り実施した。左肺は、自由落下による10%ホルムアルデヒド溶液を用いて、肺病理組織標本作製に使用する肺固定を実施した。

肺組織中の遺伝子解析については前述と同様に肺組織からRNAを抽出し、網羅的遺伝子解析およびRT-qPCR解析を実施した。

表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験

実環境中のマイクロプラスチックは表面の劣化あるいは表面修飾による変化を受けることで、表面が化学的に改質されることが想定される。本研究では、この表面状態の改質（変化）による生体影響を評価するために、1 μm径のポリスチレン標準ラテックス粒子を採用し、表面が未修飾、アミノ基修飾、カルボキシ基修飾の3種のポリスチレンを選定し、これらの分散液(100 mg/mL)を用いて気管内注入試験を実施した。まず、注入液を調製するために、それぞれのポリスチレン分散液から、メンブレンフィルターおよび限外濾過法を用いて粒子を取り除き、陰性対照群の注入液の原液とした。陰性対照群のサンプルは、このようにして作成した原液を、注入液に含まれるのと同じ量の分散剤濃度となるように希釈調製した。一方、ばく露群は低用量(0.2 mg/ラット、0.5 mg/mL 0.4 mL)、高用量(1.0 mg/ラット，2.5 mg/mL 0.4 mL)となるように、分散液と溶媒のみを蒸留水で希釈することで調製を行った。ここで、ポリスチレンを除去した溶媒は、220 nm孔フィルター（PES013022、Membrane Solutions Limited.、テキサス州、米国）を使用した精密ろ過法や遠心分離(400 g、4° C で 1 時間)による限外濾過法（VIVASPIN 6、Sartorius Japan K.K.、東京、日本）によって調製した。気管内注入試験に用いる懸濁液は、DLSによる粒径の測定、走査型電子顕微鏡による溶液中の凝集状態の確認を実施した。分散液中のポリプロピレン粒子のサイズ分布は、動的光散乱（DLS）（ZEN1600、Malvern Panalytical、Ltd.、マルバーン、英国）を用いて測定し、注入液のポリスチレン粒子の分散状態は、分散液を乾燥させ、ポリスチレンの走査型電子顕微鏡（SEM）（HITACHI S-4500，株式会社日立製作所、東京、日本）で撮影した画像で確認した。分散液中のゼータ電位は、0.1% Tween 80 水溶液に懸濁したポリスチレンの Zetasizer Nano-ZS（Malvern Instruments、Malvern Panalytical Ltd、Malvern、英国）を使用して測定した。ζ電位は分散液のpHに依存するために、 pH METER（HORIBA、京都、日本）を使用して各分散液のpHを測定した。さらに、粒子表面の修飾状態を確認するためにフーリエ変換赤外（FT-IR）吸収スペクトルをFT-IR分光光度計（JASCO Engineering CO.，LTD. 東京、日本）で測定した。測定法には、KBr プレート法（TabletMaster、JASCO Engineering CO.，LTD. 東京、日本）を採用し、表面特性を調べた。この方法では、バックグラウンド測定用に KBr プレートのみをサンプルプレートに取り付け、次に PS 粒子をサンプルプレートに挟みこんで IR スペクトルを測定した。得られたバックグラウンドのスペクトルは、次式のようにポリスチレンサンプルのスペクトルから差し引くことで赤外吸収スペクトルを定義した。

（サンプルのスペクトル）/（バックグラウンド スペクトル）x 100 = 赤外吸収スペクトル

実験動物には、F344雄性ラット(12週齢)を用いて気管内注入試験を実施した。気管内注入試験は、各群5匹とし、気管内注入試験から3日後、1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後に解剖を実施した（図１０）。右肺からは、生理食塩水を用いて、自由落下(20cm・H_2O)により気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収した。BALF回収後の肺組織を回収し、BALF中に存在する炎症細胞(総細胞数、好中球数、好中球割合)の計測と、炎症関連指標(肺損傷因子であるLDH活性、総蛋白濃度、ケモカインであるCINC-1やCINC-2の測定を実施した。BALF後の肺組織からは、遺伝子解析や肺組織中の酸化ストレス指標であるヘモオキシゲナーゼ１(HO-1)の測定を実施した。左肺は、自由落下による10%ホルムアルデヒド溶液を用いて、肺病理組織標本作製に使用する肺固定を実施した。肺組織中の遺伝子解析については前述と同様に肺組織からRNAを抽出し、RT-qPCR解析を実施した。

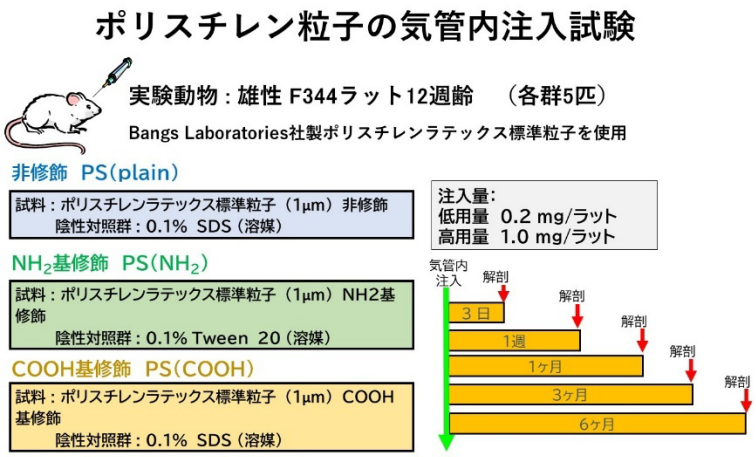


図１０．ポリプロピレンの気管内注入試験のプロトコール

表面官能基の異なるポリスチレンの培養細胞試験

中間評価にて、「急性期において表面官能基の修飾でアミノ基とカルボン酸で影響に差が出ていることのメカニズムの解明が求められる」との指摘から、表面官能基の異なるポリスチレンの肺傷害性に関して、培養細胞ばく露試験を追加で実施することとした。

RAW 264.7 細胞（TIB-71）は ATCC から購入し、10% の熱不活化ウシ胎児血清（FBS）と 1%（v/v）ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で培養した。細胞培養の環境は5% CO_2、37° C を維持した。細胞の酸化ストレスを調べる目的に、ARE-ナノルシフェラーゼ（ARE-Nluc）を細胞に導入するために、ARE（JQ858521、Promega）とナノルシフェラーゼ（JQ437370、Promega）を pCDH-CMV7-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro（CD513B-1、SBI）バックボーンにリンクしてプラスミド pCDH ARE-Nluc GFP-T2A-Puro を構築し、非複製レンチウイルスを生成した。レンチウイルスを生成するために、293TN 細胞（LV900A-1、SBI）にプラスミド pCDH ARE-Nluc GFP-T2A-Puro をパッケージングプラスミド pPACKH1（LV500A-1、SBI）とともにトランスフェクトしました。このレンチウイルスを使用して RAW 264.7 細胞に感染させ、ARE-Nluc を導入した。形質導入細胞は 10 μg/mL ピューロマイシンで選択され、1 週間後にすべての細胞で GFP 発現が確認された（RAW-ARE）。

細胞生存率とレポーターアッセイのために、RAW-ARE 細胞を 1 ウェルあたり 1 × 10^4 細胞で透明底の 96 ウェル白色プレートに播種した。0.1% Tween 80 水溶液に懸濁した 10 mg/mLの濃度のポリスチレン分散液 を DMEM 培地を使用して 2 mg/mL に希釈し、さらにDMEM 培地を使用して連続 5 倍希釈液を調製した。12 時間後、最大濃度 2 mg/mL から連続 5 倍希釈液を、ウェル内の培地量と同量（ATP と Nluc の両方の測定で 3 ウェル）で 96 ウェル白色プレートに添加した。 24時間後、ATP活性を測定するために各ウェルにCellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay試薬（Promega）50 μLを加え、各ウェルにNano-Glo® Luciferase Assay System試薬（Promega）50 μLを加えた。これらの活性は、ルミノメーター（Luminescencer JNII RAB-2300、ATTO、東京、日本）を使用して測定した。

ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の比較

本研究課題では、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験と気管内注入試験の実施において、同一のポリプロピレンを用いた。これは、背景に詳細を示したように、様々な種類や劣化条件など多くのマイクロプラスチックの肺への影響を検討するにあたり、すべてのマイクロプラスチックに対して、吸入ばく露試験を実施することは難しいためである。つまり、気管内注入試験の結果から吸入ばく露試験の結果を推定できれば、肺有害性の推定に気管内注入試験の結果の有用性を示すことができる。このため、気管内注入試験と吸入ばく露試験を併用し、気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果の整合性・相同性を確認し、気管内注入試験から有害性を推定することは、我々の重要なテーマと考えている。

本研究のポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の結果を比較するにあたり、吸入ばく露濃度と気管内注入の用量比較するレベルを検討する必要がある。吸入ばく露試験と気管内注入試験のばく露量に関して、本研究課題では、気管内注入試験で、低用量 0.2 mg/ラット、高用量 1.0 mg/ラットとし、吸入ば

く露試験(1ヶ月間)では、低濃度2 mg/m^3、高濃度10 mg/m^{3}としている。この吸入ばく露試験による肺内沈着量を以下の式から計算すると、低濃度 2 mg/m^{3}は、0.31 mg、高濃度 10 mg/m^{3}は、1.54 mgと推定される。この推定から低濃度 2 mg/m^{3}は、低用量0.2 mg/ラットと比較し、高濃度 10 mg/m^{3}は、高用量 1.0 mg/ラットの結果と比較した。

肺内沈着量の推定式

肺内沈着量＝1回換気量(L)×ばく露濃度(mg/m^3)×呼吸数(回/分)×ばく露時間×沈着率)

(ラット：1回換気量：2.1 mL、呼吸数：102 回/分、ばく露時間：6時間/日、週5日、4週間、沈着率：0.1)

表面官能基の異なるポリスチレンの吸入性病変の予測

ポリプロピレンの気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果から、マイクロプラスチックの気管内注入試験と吸入ばく露試験には、一定の相同性があることが見出したうえで、ポリプロピレンの気管内注入試験の肺障害を基準となる病変(基準病変)とし、表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の肺障害との比較を行う。

マイクロプラスチックの肺障害性に関与する物理化学的特性の関係性

前述の通り、ポリプロピレン1種の気管内注入試験、表面官能基の異なるポリスチレン3種について、解析した物理化学的特性と、これらの気管内注入試験から、物理化学的特性と肺障害性の関係性の評価を行う。

マイクロプラスチックの肺障害に関連する遺伝子のスクリーニング指標の解析

本研究課題で実施するポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験において、ばく露肺組織を用いた網羅的遺伝子解析遺伝子解析の結果から、マイクロプラスチックばく露によって、影響を受ける遺伝子を見いだし、これらの遺伝子発現の発現量を、ポリプロピレン1種と表面官能基の異なるポリスチレン3種の気管内注入試験のばく露3日後の肺組織を用いてRT-qPCRによって測定する。これらの測定した発現量と気管内注入試験で得られた肺障害を比較し、肺障害の有無の2つに分け、肺障害性を判別する指標としての有用性を解析するために、SPSSを用いた判別分析を実施する。判別分析は曲線下面積を求め、指標の正確性を評価する。これらの解析を通して、マイクロプラスチックの肺障害をスクリーニング指標の有用性を検討する。

１．４．２．研究結果及び考察

課題全体の研究結果と考察

本課題では、ポリプロピレンの吸入ばく露試験、気管内注入試験を実施し、また表面官能基の異なる3種のポリスチレンを用いた気管内注入試験を実施し、以下の通りの成果が得られた。

① ポリプロピレンの吸入ばく露試験：
マイクロプラスチックのうち、ポリプロピレンの１ヶ月間の吸入ばく露試験を実施し、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験の実施基盤を構築することに成功し、ポリプロピレンの吸入ばく露による急性影響の最小毒性量は、2 mg/m^3 であった(成果１、６、８、１４、１５)。

② ポリプロピレンの気管内注入試験：
吸入ばく露試験で実施したポリプロピレンを用いた気管内注入試験を実施し、どの程度の肺障害性を有するのか検討を行った。ポリプロピレンの気管内注入試験では、1ヶ月程度の肺炎症の持続性が認められ、これまでの我々の知見から、慢性影響を引き起こす可能性がある吸入性化学物質のボーダーラインの物質である可能性が考えられた(成果１、４，５、１３、１５)。

③ 表面官能基の異なるポリスチレンの肺障害性の評価：
表面官能基の異なるポリスチレン(非修飾、カルボキシ基修飾、アミノ基修飾)のラットへの気管内注入試験を通して、いずれのポリスチレンの肺障害も一過性の肺炎症のみであり、表面官能基の違いによる肺への影響（慢性影響）は少ないことを明らかにした。一方で、急性影響に関しては、アミノ基修飾による急性炎症は、酸化ストレスを介した細胞傷害の関与が示唆された(成果２、３、７)。

④ ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の相同性の評価：
マイクロプラスチックの吸入ばく露による影響を、気管内注入試験から推測(スクリーニング)できるか検討するために、吸入ばく露試験で実施したポリプロピレンを用いた気管内注入試験を実施した。ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の両者の肺障害の相同性を確認したとこ

ろ、肺炎症の誘発・持続性に同様の傾向が認められ、両試験において比較基準となる病態を見いだしたことで、マイクロプラスチックの吸入による有害性評価に資する気管内注入スクリーニング試験の基盤を構築した(成果９)。

⑤ 表面官能基の異なるポリスチレンの吸入性病変の予測：
ポリプロピレンの気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果から、マイクロプラスチックの気管内注入試験と吸入ばく露試験には、一定の相同性があることが確認されたことから、ポリプロピレンの気管内注入試験の肺障害を基準となる病変(基準病変)とし、表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の肺障害との比較をおこなった。ポリプロピレンの気管内注入試験結果と表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の肺障害性（慢性影響）のランキングは、肺炎症の持続性から考えて、ポリプロピレン＞NH_2基修飾、非修飾、COOH基修飾ポリスチレンであった。ポリスチレンの気管内注入試験の結果をポリプロピレンの結果との相互性から考えると、ポリスチレンの吸入ばく露試験による肺病変の推測は、ポリスチレンの表面修飾の有無にかかわらず、ポリプロピレンよる肺病変と類似しているが、そのレベルは低いことが示唆された(成果１０)。

⑥ マイクロプラスチックの肺障害性に関与する物理化学的特性の関係性
本研究では、ポリプロピレンの気管内注入試験、3種の表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の計4種の気管内注入試験を実施した。これらの気管内注入試験の結果を急性期の炎症反応で比較すると、ポリプロピレン＞NH_2基修飾ポリスチレン＞COOH基修飾のポリスチレンと未修飾ポリスチレンの順で肺障害性が認められた。マイクロプラスチックの物理化学的特性と肺障害性の関係性について、本研究課題の結果や既往の報告から検討を実施したところ、形状やサイズが障害性に影響を与える可能性が示唆された(成果１１、１６)。

⑦ マイクロプラスチックの肺障害に関連する遺伝子のスクリーニング指標への応用
本研究課題では、ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験において、ばく露肺組織を用いた網羅的遺伝子解析遺伝子解析を実施した。これらの結果から、吸入によるばく露で発現が上昇する遺伝子がいくつか検出された。表面官能基の異なるポリスチレンのばく露した肺組織を含めて、これらの遺伝子の発現量を調べたところ、肺障害性のランキングと同様の発現上昇の傾向が認められ、判別分析の結果から、CXCL1、CXCL5/6、CD177、Lcn2が肺障害性を示す信頼性の高い指標であった。これらの遺伝子は、マイクロプラスチックの肺障害性を反映する指標と考えられ、将来的な評価指標としての有用性も期待できると考えられる(未発表：2025年度に発表予定)。

マイクロプラスチックの吸入ばく露試験に関する成果（成果１、６、８、１４、１５）

マイクロプラスチックの吸入ばく露試験の実施基盤の構築

吸入ばく露試験に用いるマイクロプラスチックは、数μmレベルに粉砕されたポリプロピレンを選定した。ポリプロピレンは、数μmレベルで実環境中に観察されており、その多くは破砕状であることが報告されている(大河内ら，2022)。まず、使用したポリプロピレンの表面性状をFT-IRで評価した結果を示す。その結果、既往の報告((Prabowo, Nur Pratama and Chalid, 2017)のポリプロピレンのスペクトルと比較しても、異なるピークは認められず、ポリプロピレン以外には添加剤や不純物は検出できないレベルであると判断した(図１１)。次に、ポリプロピレンの原粉の電子顕微鏡像を示す。走査型電子顕微鏡像では、粒状であるが、一部凹凸を確認でき、破片状となっており、粒径については、大小さまざまであるが、数μmレベルであることを確認した(図１２)。ポリプロピレンを用いた吸入ばく露試験を実施するにあたり、安定した吸入ばく露試験が実施可能であるか評価するために、予備検討を実施した。吸入ばく露試験は、図１３のような装置で実施した。マイクロプラスチックの吸入ばく露試験が実施可能か検討するために、マイクロプラスチックの粉じんが発生するか、発生したならば安定したばく露(粒径や濃度)が達成できるかを調べた。ばく露前の予備試験の結果の一部を示す(表１，表２)。ポリプロピレンは凝集しやすく、取り扱いが難しかったため、ガラスビーズを用いた分粒を行うことしし、設定したばく露濃度で安定的に粉じんを発生させることができるか、ガラスビーズの濃度を変えながら最適な条件を求めた。このときの吸入ばく露チャンバー内のポリプロピレンの分散状態を確認するために走査型電子顕微鏡の観察を行った。数μmレベルで粒子が凝集することなく存在することが確認できた(図１４)。ばく露チャンバー内の発生したポリプロピレン粉じんの空気動力学径を測定したところ、低濃度は、2.8 μm(幾何標準純偏差 1.6)、高濃度は、3.0 μm(幾何標準純偏差 1.7)であった(図１５)。また粒径分布をみると、低濃度ばく露条件ではあるが、図１６に示す結果が得られ、ＷＰＳの個数濃度でみるとナノサイズのポリプロピレンが含まれることが確認された(0.1 μm未満全個数の4.4%、>1 μm以下　全個数の18%)。設定したばく露濃度を安定的に発生させることができたため、本試験に進むこととした。これらの結果から、マイクロプラスチックとしてポリプロピレンを用いて、吸入

ばく露試験の実施が可能であることが本研究課題で示された。

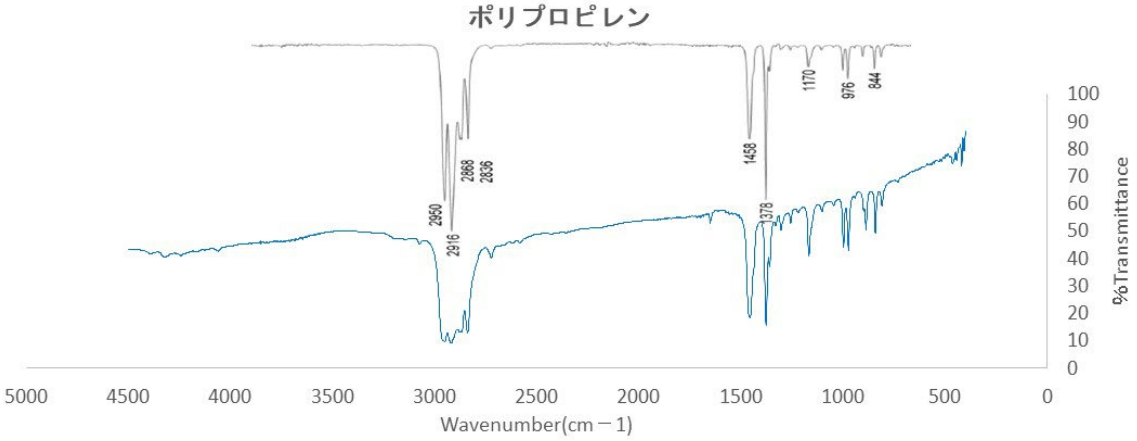


図１１.ポリプロピレンのFT-IR解析結果と既往の報告のスペクトルとの比較
参考ポリプロピレンのスペクトル既往の報告(Prabowo, Nur Pratama and Chalid, 2017)

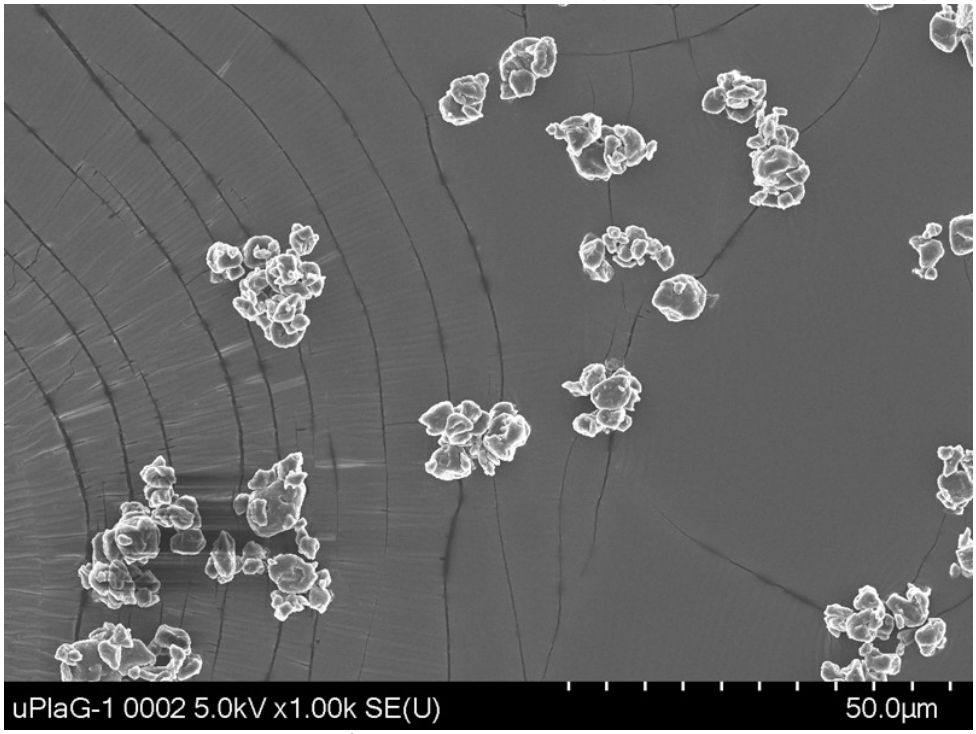


図１２．ポリプロピレンの走査型電子顕微鏡像(原粉)

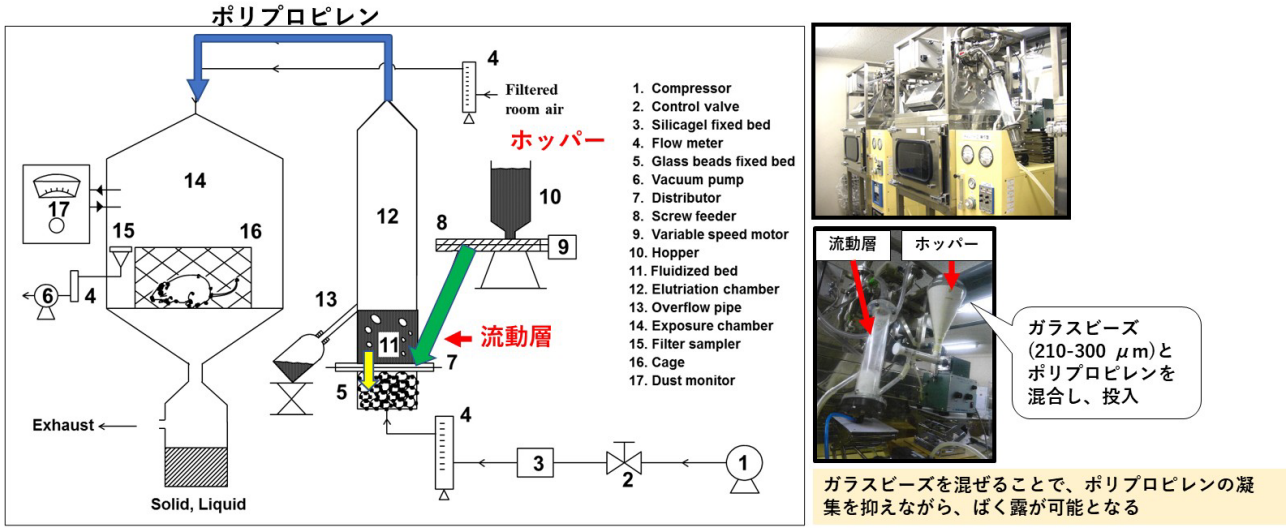


図１３．吸入ばく露装置の概要

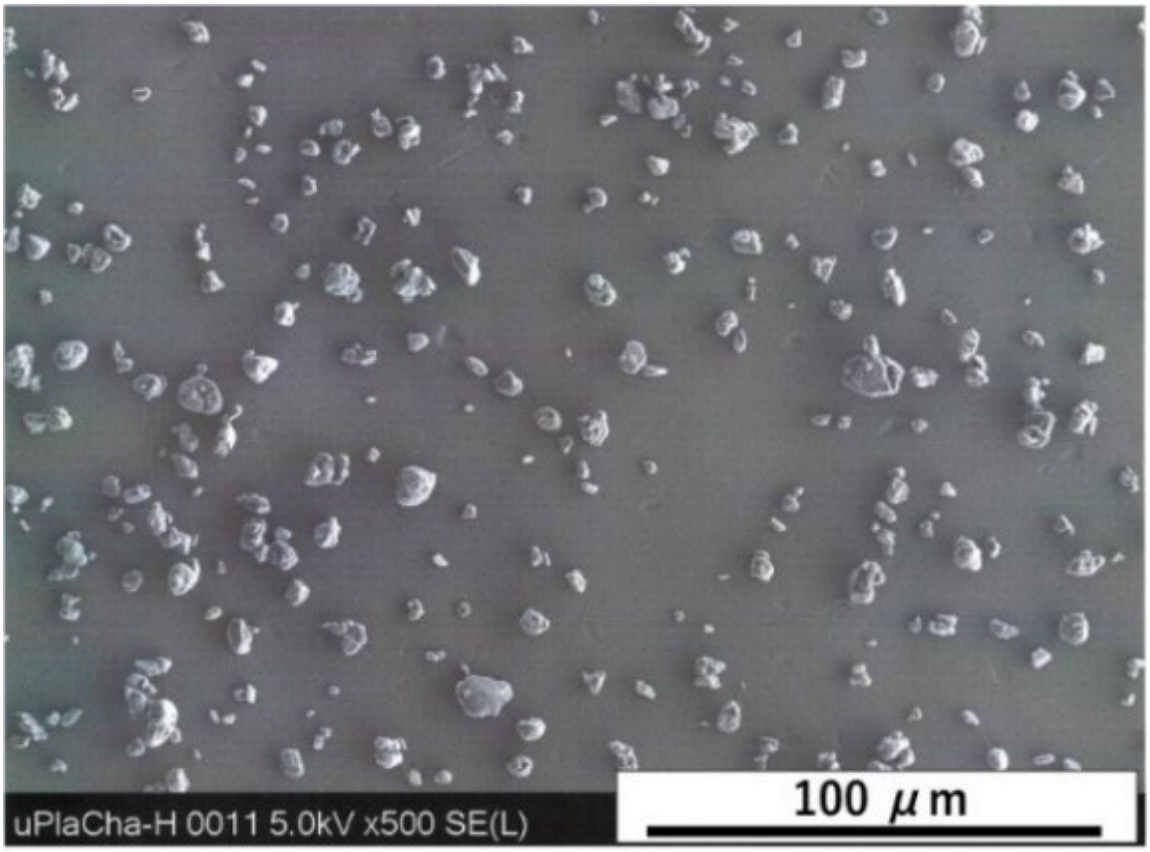


図１４．ばく露チャンバー中のポリプロピレン(Tomonaga et al., 2024)

表１．　吸入ばく露試験　低濃度の予備検討結果の概要

予備実験結果(曝露濃度調整結果)　　低濃度群

実験	曝露日	粉体濃度	スクリューフィーダースピード	混合試料使用量	ろ紙	ろ紙	粉体捕集量	測定時間	吸引流量	曝露濃度
				(ガラスビーズ+曝露粉体)	測定後(mg)	測定前(mg)	(mg)	(min)	(ℓ/min)	(mg/m^3)
1	2022/10/5	0.1%	2	2722 g	20.774	20.624	0.150	59	2.5	1.0
2	2022/10/6	0.3%	1	1011g	22.380	21.021	1.359	65	2.5	8.4
3	2022/10/7	0.3%	0.5	989g	21.784	20.199	1.585	94	2.5	6.74
4	2022/10/7	0.3%	0.5	970g	21.422	20.006	1.416	92	2.5	6.16
5	2022/10/12	0.15%	0.5	1119g	22.493	20.340	2.153	112	2.5	7.69
6	2022/10/13	0.15%	0.5	802g	20.890	19.746	1.144	60	2.5	7.63
7	2022/10/14	0.15%	0.5	1011g	22.488	19.934	2.554	96	2.5	10.64
8	2022/11/8	0.075%	0.5	1019g	20.354	19.803	0.551	100	2.5	2.20
9	2022/11/10	0.075%	0.5	1200g	20.551	19.876	0.675	136	2.5	1.99
10	2022/11/11	0.075%	0.5	1201g	20.001	19.333	0.668	135	2.5	1.98
11	2022/11/11	0.075%	0.5	802g	19.834	19.333	0.501	95	2.5	2.11
12	2022/11/14	0.08%	0.5	2225g	20.778	19.324	1.454	240	2.5	2.42
13	2022/11/17	0.08%	0.5	1729g	20.840	19.881	0.959	180	2.5	2.13
14	2022/11/24	0.08%	0.5	3645g	22.305	19.745	2.560	360	2.5	2.84
15	2022/11/29	0.08%	0.5	3549g	22.118	19.779	2.339	360	2.5	2.60

※　実験12～実験15　ガラスビーズとマイクロプラスチックの混合状態が安定し、曝露濃度も安定した濃度が得られた

2.5±0.3 mg/m^3

表２．　吸入ばく露試験　高濃度の予備検討結果の概要

予備実験結果(曝露濃度調整結果)　　高濃度用

実験	曝露日	粉体濃度	スクリューフィーダースピード	混合試料使用量	ろ紙	ろ紙	粉体捕集量	測定時間	吸引流量	曝露濃度
				(ガラスビーズ+曝露粉体)	測定後(mg)	測定前(mg)	(mg)	(min)	(ℓ/min)	(mg/m^3)
1	2022/10/5	0.5%	2	2369 g	22.568	20.871	1.697	54	2.5	12.6
2	2022/10/6	0.6%	1	1022g	22.407	20.648	1.759	72	2.5	9.8
3	2022/10/7	0.6%	1	1380g	24.252	21.042	3.210	97	2.5	13.24
4	2022/10/7	0.6%	1	1375g	23.647	20.294	3.353	99	2.5	13.55
5	2022/10/12	0.6%	0.5	1500g	23.901	19.684	4.217	164	2.5	10.29
6	2022/10/12	0.5%	1	1049g	22.319	20.051	2.268	75	2.5	12.10
7	2022/10/13	0.5%	1	1958g	24.360	19.929	4.431	137	2.5	12.94
8	2022/10/14	0.5%	1	1660g	24.911	19.724	5.187	168	2.5	12.35
9	2022/11/8	0.5%	1	1719g	24.321	20.200	4.121	118	2.5	13.97
10	2022/11/9	0.3%	1	1909g	23.899	20.182	3.717	136	2.5	10.93
11	2022/11/11	0.25%	0.8	1629g	23.629	20.206	3.423	135	2.5	10.14
12	2022/11/14	0.25%	0.8	2002g	24.523	20.009	4.514	180	2.5	10.03
13	2022/11/17	0.25%	0.8	1991g	24.477	19.798	4.679	180	2.5	10.40
14	2022/11/24	0.25%	0.8	3981g	29.326	20.201	9.125	360	2.5	10.14
15	2022/11/29	0.25%	0.8	4059g	30.719	21.059	9.660	360	2.5	10.73

※　実験11～実験15　ガラスビーズとマイクロプラスチックの混合状態が安定し、曝露濃度も安定した濃度が得られた

10.3±0.3 mg/m^3

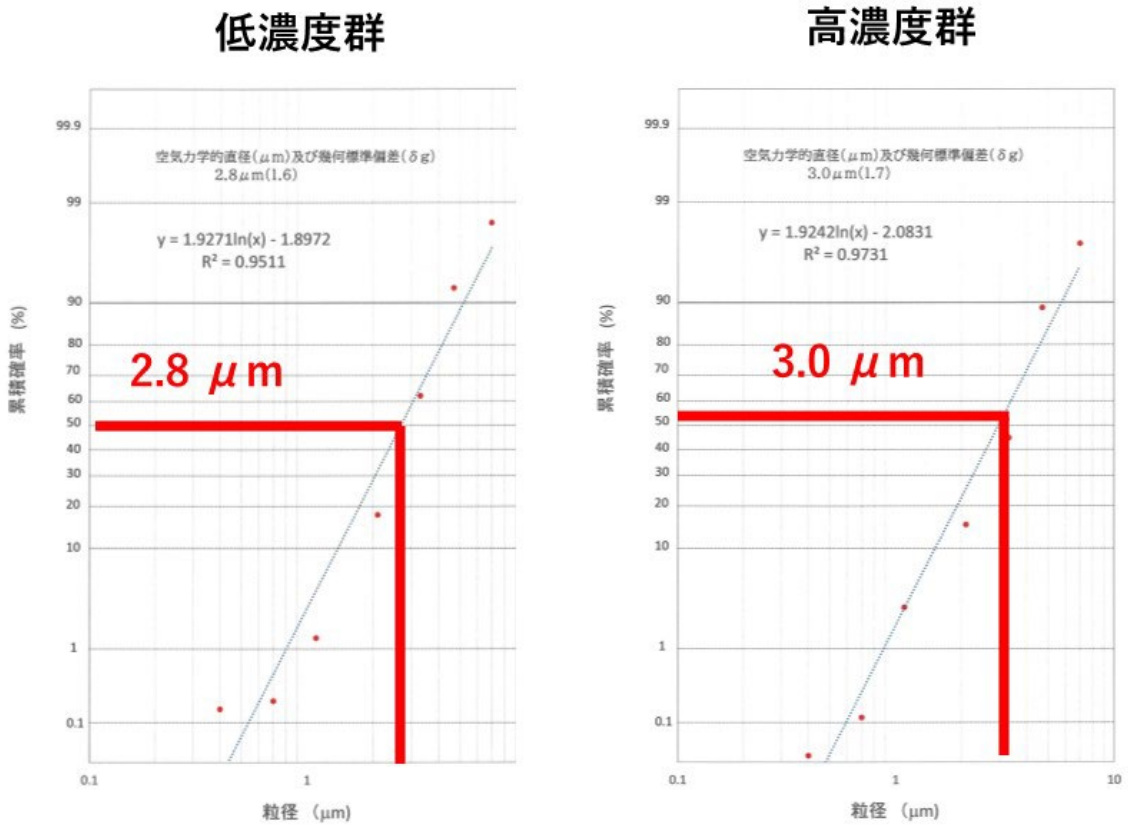


図１５．ばく露チャンバー内の空気動力学径

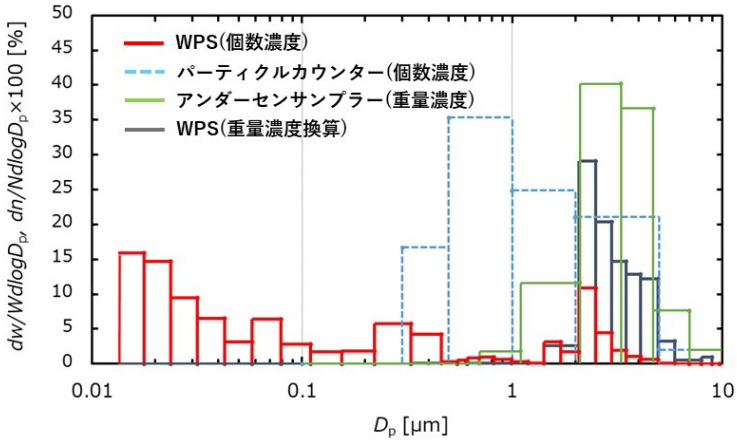


図１６．ばく露チャンバー中の重量濃度と個数濃度（Tomonaga et al., 2024）

参考文献

- 大河内博 他，大気中マイクロプラスチックの現状と課題，大気環境学会誌，2022，57 巻，3 号，p. A66-A72，https://doi.org/10.11298/taiki.57.A66.
- Prabowo, I., Nur Pratama, J. and Chalid, M. (2017) 'The effect of modified ijuk fibers to crystallinity of polypropylene composite', *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 223, p. 012020. doi: 10.1088/1757-899X/223/1/012020.
- Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2024) Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Part Fibre Toxicol. 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.

ポリプロピレンの吸入ばく露試験の結果

１日６時間、週５日、４週間のばく露期間で、低濃度2 mg/m^3、高濃度10 mg/m^3 の2濃度を用いて、吸入ばく露試験を実施した。吸入ばく露期間中の発生濃度が安定していることを毎日モニタリングし確認した(図１７)。

吸入ばく露試験後のラット肺に関する解析では、低濃度群(2 mg/m^3)では、ばく露終了から3日後において、気管支肺胞洗浄液中の好中球数、好中球割合の上昇が認められた(図１８)。高濃度群では、ばく露終了から1ヶ月程度まで、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、好中球割合の上昇が認められた(図１８)。気管支肺胞洗浄液中の肺傷害(損傷)指標であるLDH活性は、ばく露終了から3日後～1ヶ月後にかけて、用量依存性の上昇が認められた。これらの得られた結果では、用量依存性の変化が確認されたことから、安定したばく露濃度を反映した信頼性のある吸入ばく露試験であると考える。次に、総蛋白濃度については、用量依存性の変化は観察されなかったが、LDH活性は、3日後、1ヶ月後と高濃度群で有意な上昇が認められた(図１９)。炎症性サイトカインであるCINC-1やCINC-2は、ばく露1ヶ月にかけて用量依存性の変化が観察された(図２０)。好中球の異物に対する攻撃因子であるミエロペルオキシダーゼ(MPO)も、ばく露1ヶ月にかけて用量依存性の変化が観察された(図２１)。一方で、肺胞上皮の防御因子であるサーファクタントプロテインD(SP-D)は、ポリプロピレンのばく露では、有意な上昇は認められなかった(図２１)。肺組織中の酸化ストレス指標であるHO-1は、吸入ばく露終了から3日後のみ陰性対照群と比較し有意な上昇が、低濃度群および高濃度群で認められた(図２２)。これらの肺炎症や肺傷害、酸化ストレスに係る指標の解析から、ポリプロピレンの吸入ばく露によって、好中球を主体とした肺炎症が生じたことが明らかとなった。肺病理組織標本の観察でも、ばく露終了から3日後では、低濃度群、高濃度群ともに、肺胞腔に炎症細胞の流入を認め、軽度の肺炎症が観察された。高濃度群においては、ばく露終了3ヶ月後まで、炎症細胞の存在が確認された(図２３～２６)。また、3ヶ月後の炎症細胞の集簇部には、偏光観察により細胞内の沈着物が観察され、主に肺胞マクロファージに貪食されたポリプロピレンと推察された(図２７)。これらの炎症性変化は、無機物質である工業用ナノ材料の吸入ばく露試験においても、同様の炎症性変化が認められている。つまり、マイクロプラスチックにおいても好中球、CINC、MPOの上昇傾向が同じであることから、マイクロプラスチックの肺への影響として、無機物質と同様に、CINC放出が好中球の遊走を促し、肺障害に進展する一連のプロセスが存在すると考えられる(図２８)。

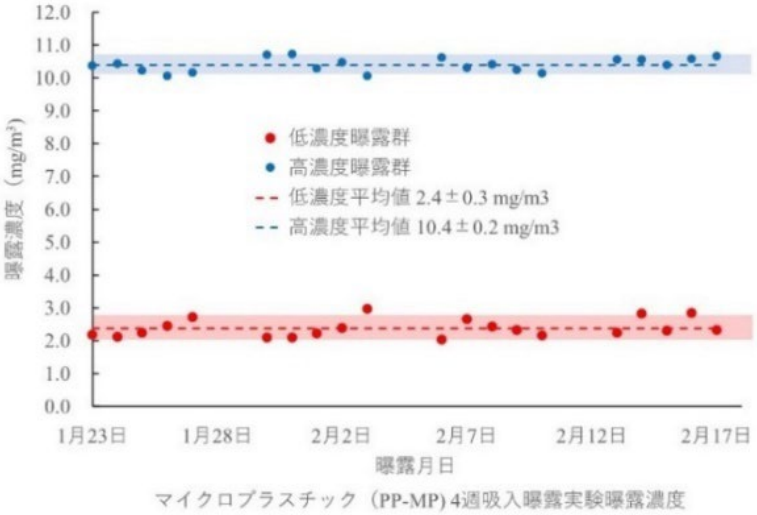


図１７．吸入ばく期間中のばく露濃度の推移（Tomonaga et al., 2024）

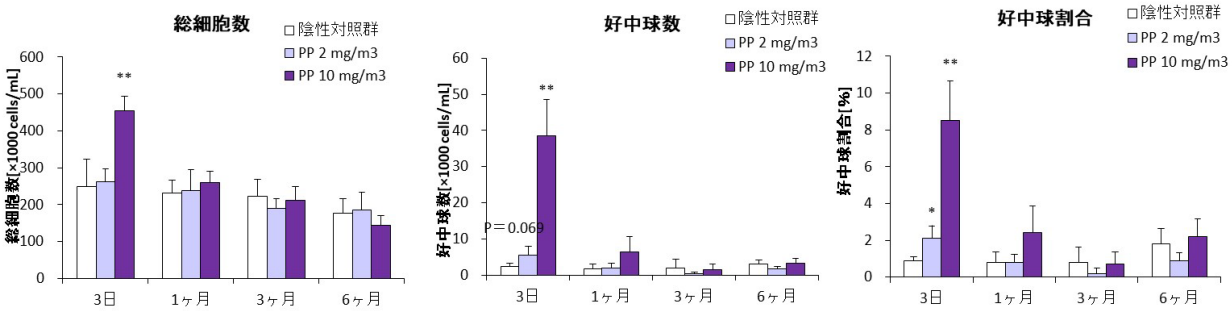


図１８．気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞(総細胞数、好中球数、好中球割合)（Tomonaga et al., 2024）

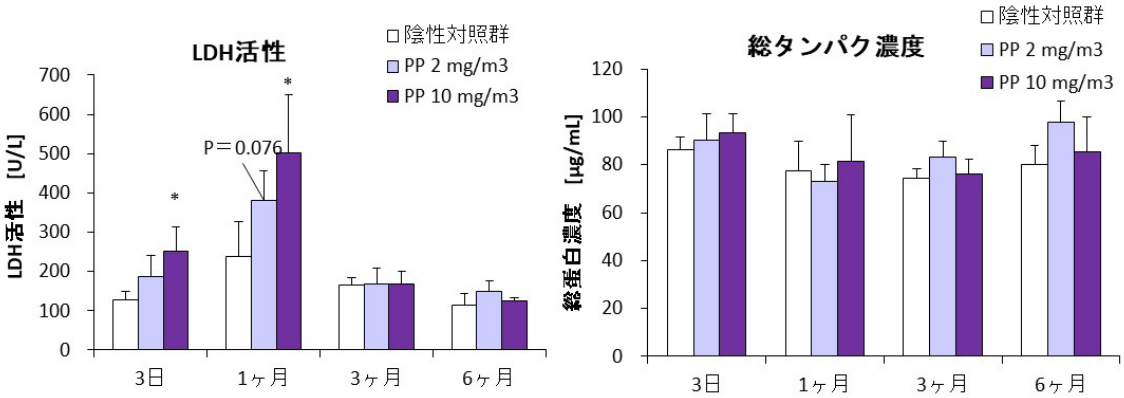


図１９．気管支肺胞洗浄液中の肺傷害指標（Tomonaga et al., 2024）

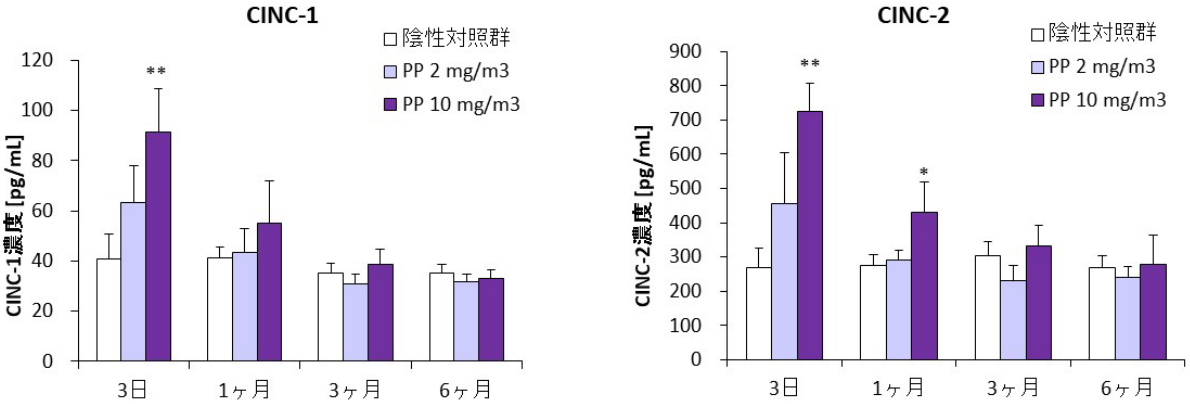


図２０．気管支肺胞洗浄液中の炎症性指標(炎症性サイトカイン：炎症細胞を誘導するタンパク)
(Tomonaga et al., 2024)

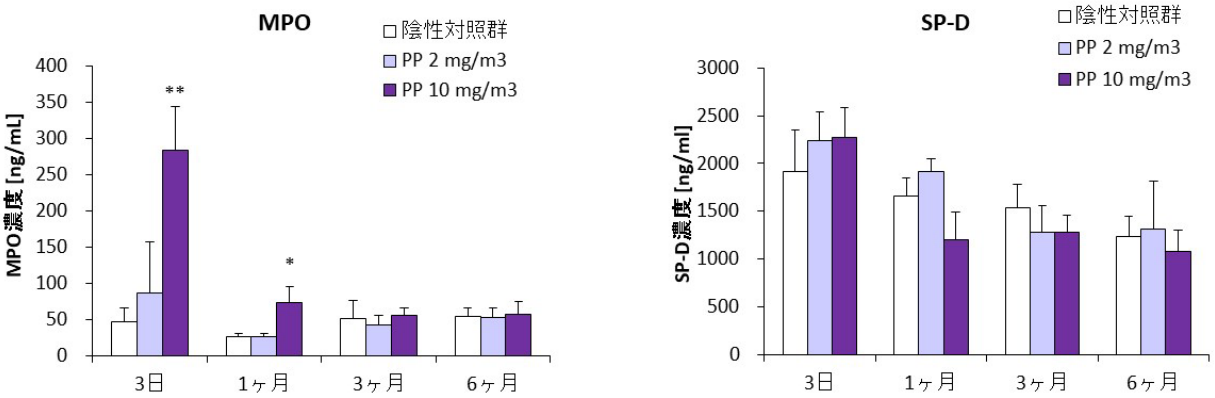


図２１．気管支肺胞洗浄液中の炎症性指標(MPOとSP-D)

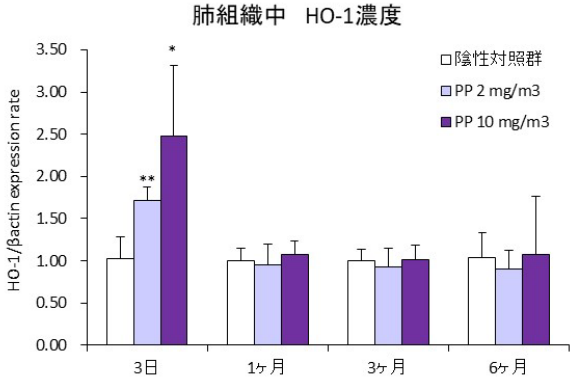


図２２．気管支肺胞洗浄液中の炎症性指標(酸化ストレス指標)

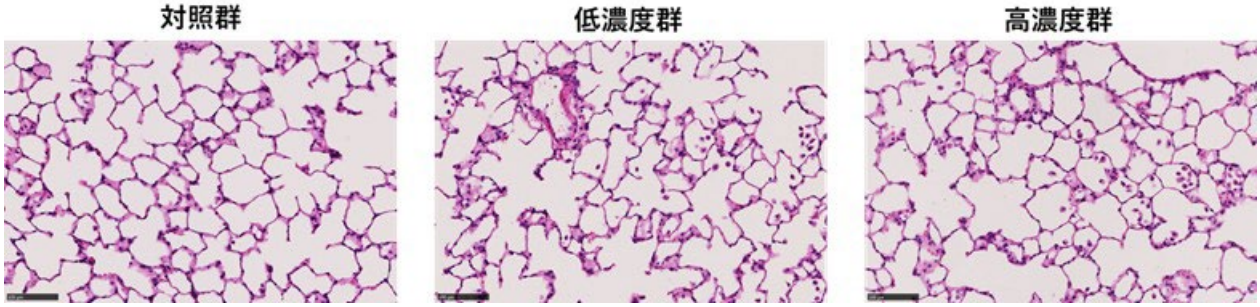


図２３．肺病理組織標本　吸入終了3日後（Tomonaga et al., 2024）

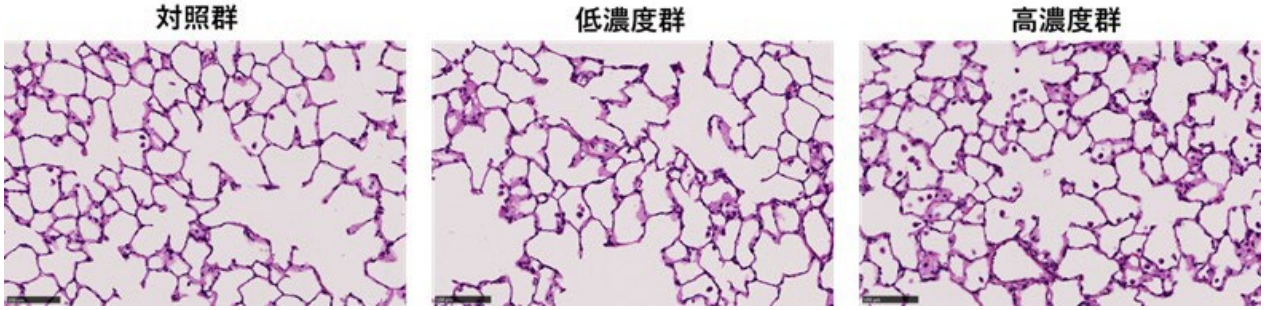


図２４．肺病理組織標本　吸入終了1ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

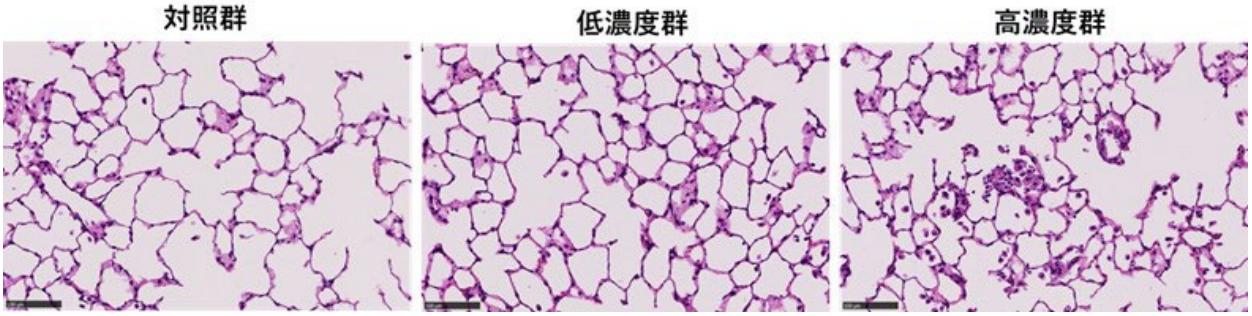


図２５．肺病理組織標本　吸入終了3ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

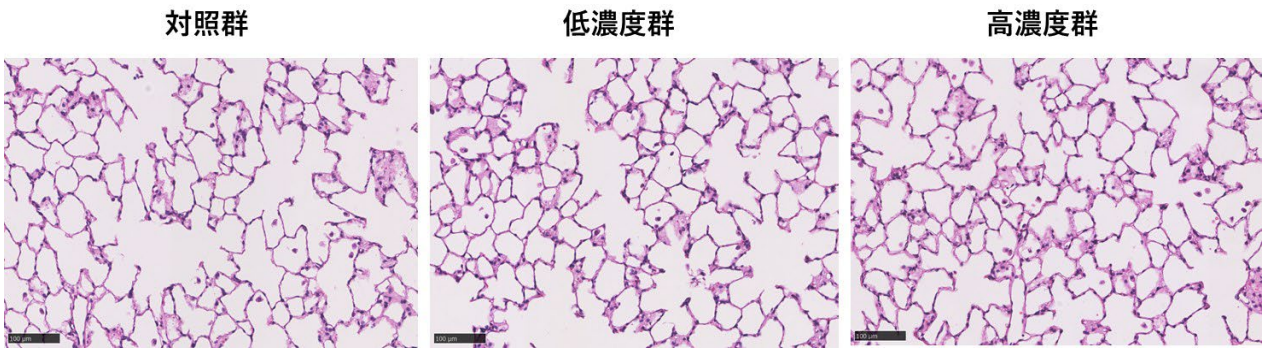


図２６．肺病理組織標本　吸入終了6ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

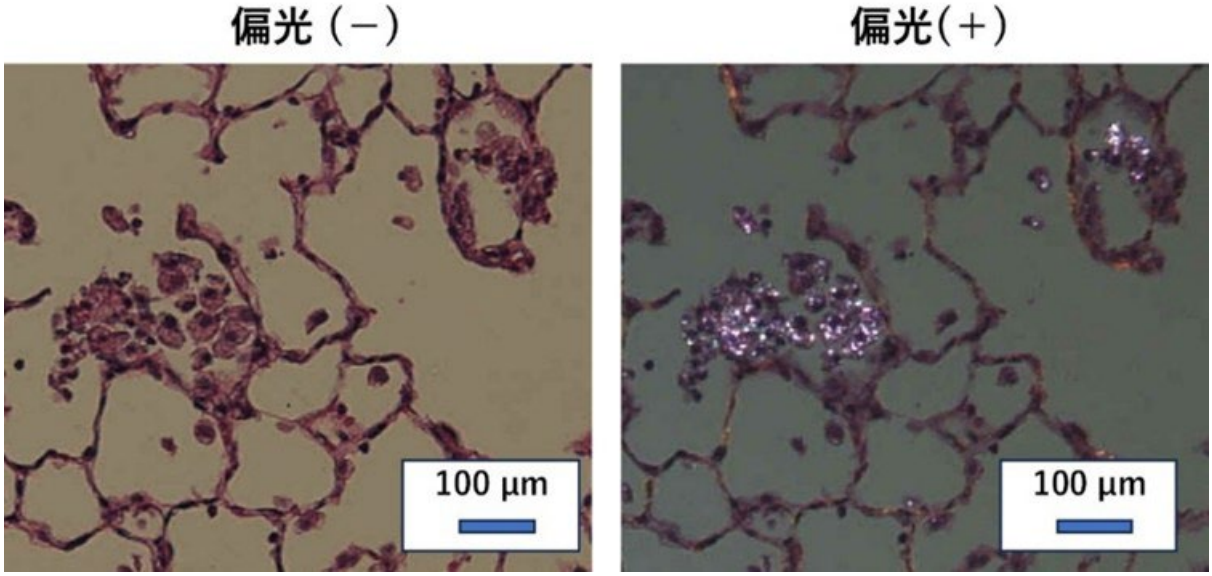


図２７．肺病理組織標本　吸入終了3ヶ月後の偏光観察（Tomonaga et al., 2024）

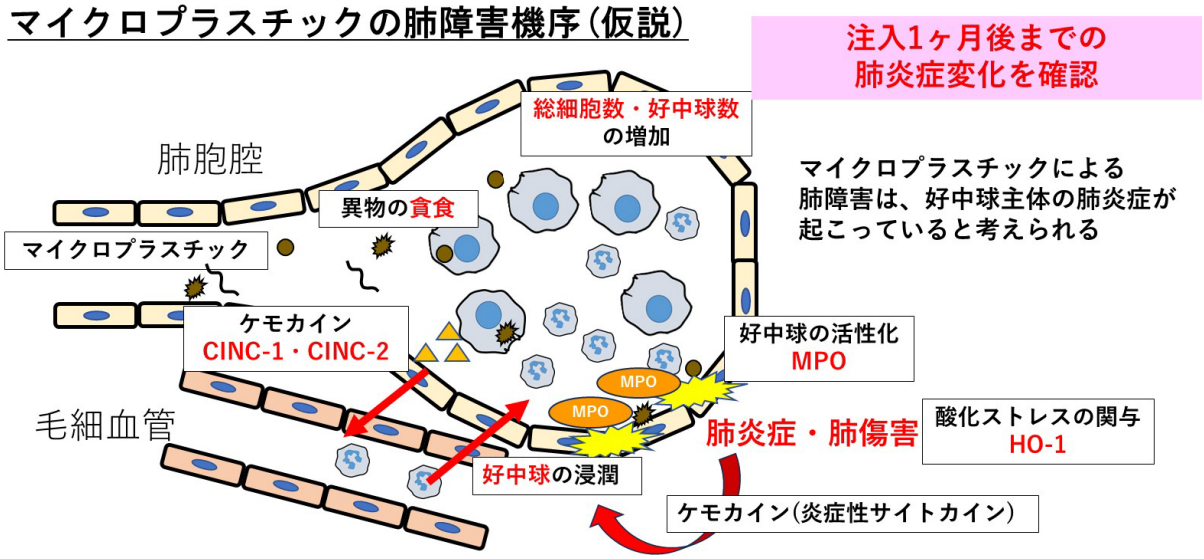


図２８．ポリプロピレン吸入ばく露による肺障害機序の概要(仮説)

次に、マイクロプラスチックばく露による肺への影響をさらに調べる目的で、肺組織中の網羅的遺伝子解析を実施した。吸入ばく露試験の1ヶ月後の肺組織サンプルにおいて、発現の認める11,594個の遺伝子のうち、高濃度ばく露群の発現量が中央値以上かつ対照群と比較し発現が2倍以上の遺伝子は64個検出され、ケモカインや肺炎症に関連する遺伝子の発現上昇が認められた(図２９)。これらの上昇した遺伝子がどのような働きを持つグループに分類されるのか確認する目的で、パスウェイ解析を実施した。気管支肺胞洗浄液中

の解析の結果と同様に、炎症やサイトカインに係るパスウェイが観察され(表３)、遺伝子レベルにおいても、肺炎症を引き起こす病態が確認された。また、網羅的遺伝子解析で陰性対照群と比較し、発現比の特に大きかった遺伝子について、ばく露後の経時的な発現量の変化の解析を実施した(図３０)。具体的な遺伝子として、主に好中球の表面に発現されるタンパクであり、好中球の遊走と活性化を調節することが報告されているCD177、好中球の動員などの自然免疫を調節しているリポカイン2(Lcn2)、好中球の走化性を持つケモカインであるCXCL1やCXCL5/6の４種の遺伝子では有意な上昇が3～6ヶ月まで認められた。低濃度ばく露においてもばく露終了から1ヶ月にかけて、これらの遺伝子の発現上昇が認められ、遺伝子レベルでみると、低濃度ばく露群も、持続的な影響が出ていることが明らかとなった。また、これらの遺伝子発現解析の結果から、本研究のポリプロピレンの肺障害は好中球性炎症が主体であり、ケモカインであるCINCの放出に続いて、好中球が遊走・活性化することによる肺炎症を引き起こす病態を示す結果と考えられた。一方で、アレルギー性の炎症に関連するIL-4,IL-5,IL-13の有意な上昇は認められなかった(図３０)。

また、ポリプロピレンの吸入ばく露試験においては、体重や肺重量だけでなく、肺以外の臓器(脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、膵臓、心臓、胸骨、大網)の重量測定や病理組織標本の観察も実施し、吸入ばく露することによる全身への影響の評価を実施した。その結果、ばく露による陰性対照群と比較した明らかな変化は認められなかった(図３１、図３２)。

これらの結果から、ポリプロピレンの吸入ばく露試験で高濃度群、低濃度群ともにばく露終了から3日後において、肺炎症が観察されたことから、本研究課題で用いたポリプロピレンの急性(1ヶ月間の短期間)の吸入ばく露の最小毒性量は、2 mg/m^{3}と考えられた。この低濃度2 mg/m^{3}は、肺病理組織標本の観察では、ごく軽度の炎症細胞の肺胞腔への流入をばく露終了から3日後でのみ認められることから、最大無毒性量(NOAEL)に近いばく露濃度の可能性も考えられる。なお、実環境中からみれば、本研究課題のばく露濃度は、非常に高い濃度である。しかしながら、前述(背景)の通り、吸入ばく露試験の重要なゴールの一つとして、環境目標値等に寄与するエビデンスを示すこと、すなわち最大無毒性量や最小毒性量を導き出すことである。このためには、生体反応が確実に現れるだろう濃度設定を行う必要がある。特に本研究課題では、短期間のばく露試験を実施しており、急性影響を評価するため、より高濃度のばく露濃度の設定が必要であった。他方、最大無毒性量や最小毒性量を導き出すためには、より長期のばく露期間を設定することが推奨されている(OECDテストガイドライン(TG413))。このため、将来的には、より長期の吸入ばく露試験の実施が求められる。そして、本研究課題で明らかになった、急性ばく露の最小毒性量2 mg/m^{3}は、今後、評価が必要な長期の吸入ばく露試験の濃度設定に重要な知見をもたらすと考える。

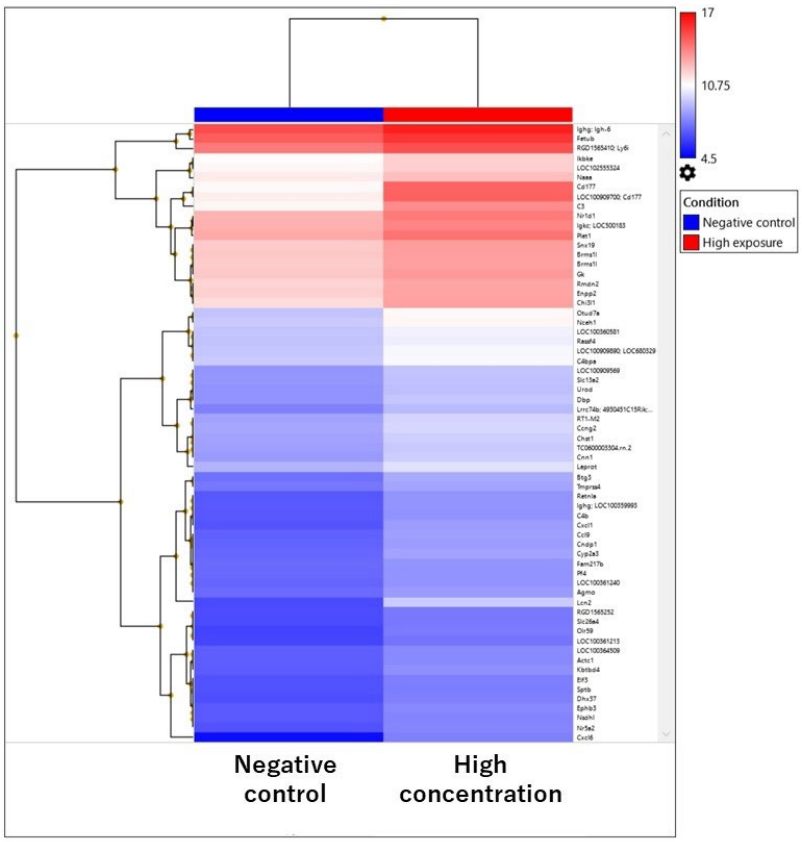
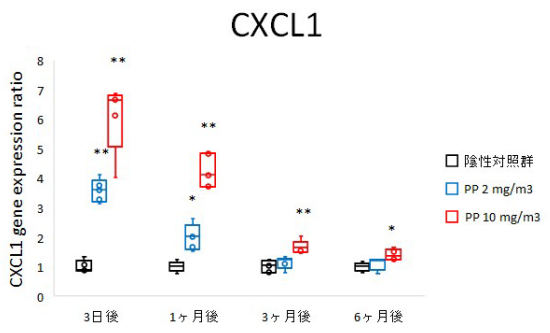
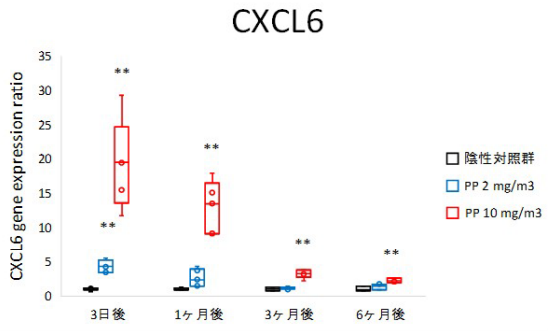
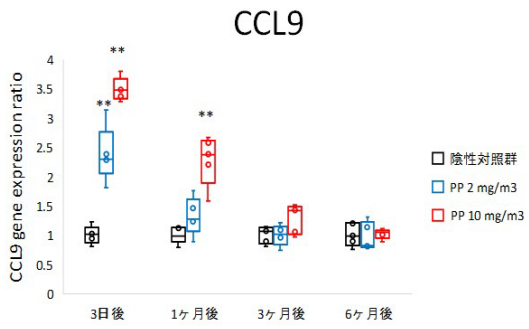
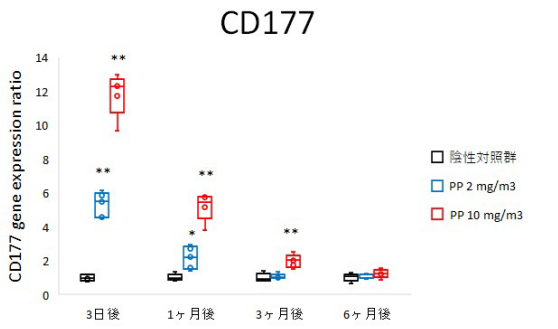


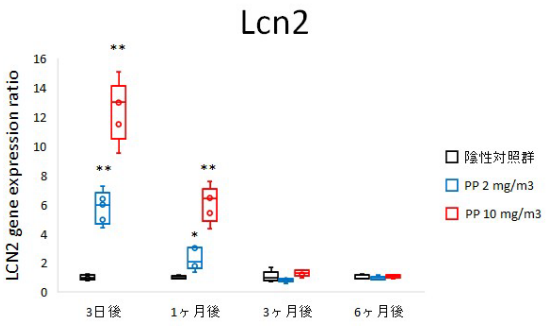
図２９．ポリプロピレン吸入ばく露試験　網羅的遺伝子解析のヒートマップ（Tomonaga et al., 2024）

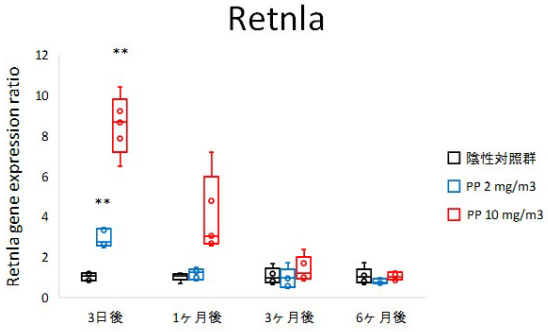

CXCL1
CXCL1 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3

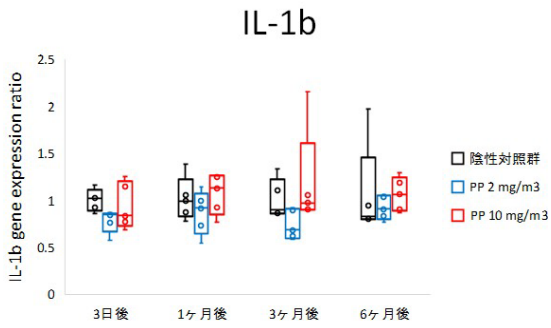

CXCL6
CXCL6 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3

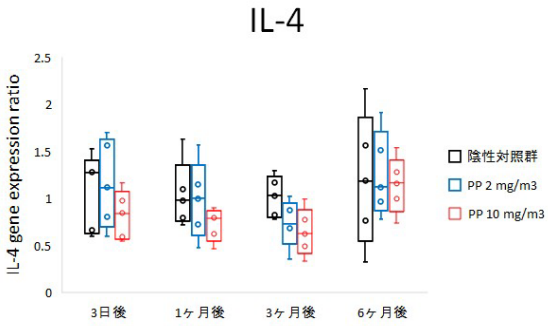

CCL9
CCL9 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3

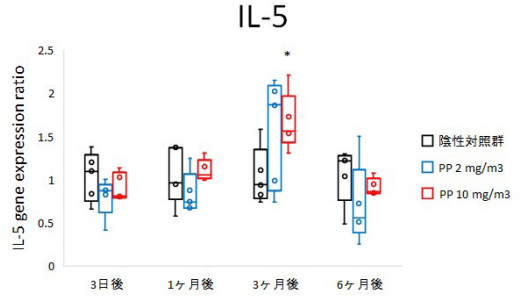

CD177
CD177 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3

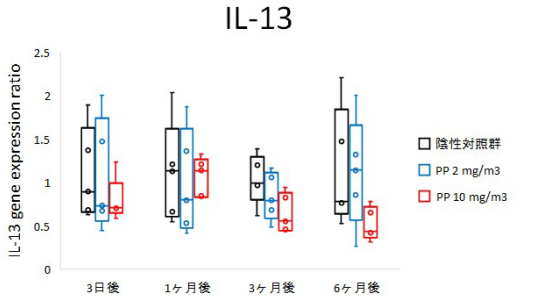

Lcn2
LCN2 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3


Retnla
Retnla gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3


IL-1b
IL-1b gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3


IL-4
IL-4 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3


IL-5
IL-5 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3


IL-13
IL-13 gene expression ratio
3日後
1ヶ月後
3ヶ月後
6ヶ月後
陰性対照群
PP 2 mg/m3
PP 10 mg/m3

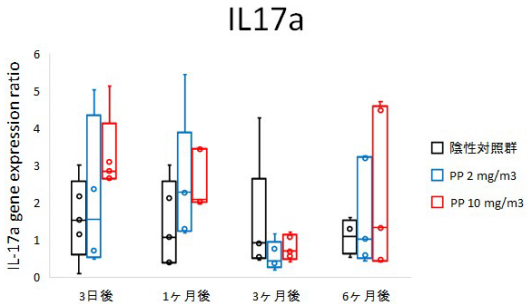
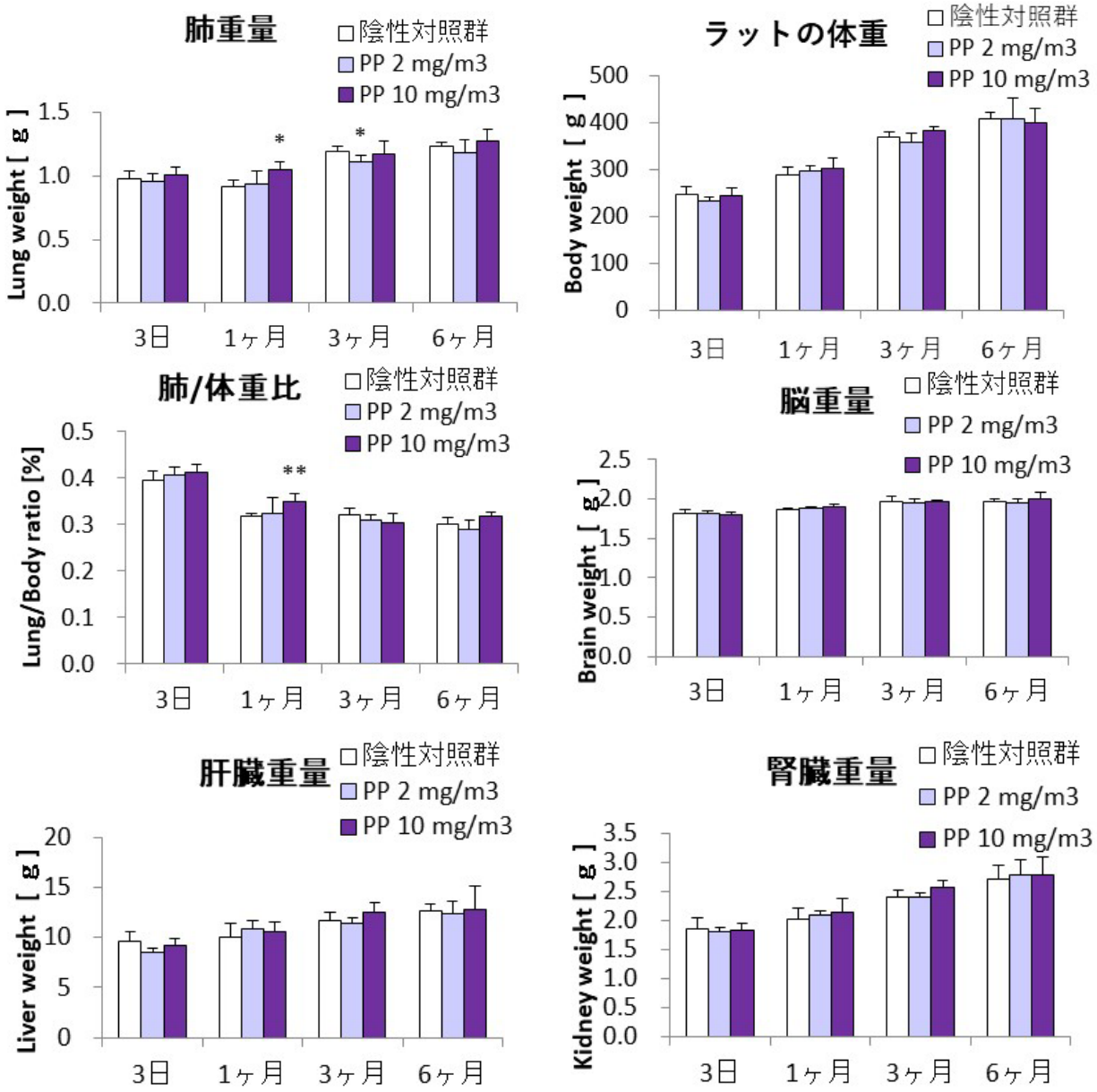


図３０．ポリプロピレン吸入ばく露による肺組織中の遺伝子発現変化（Tomonaga et al., 2024）



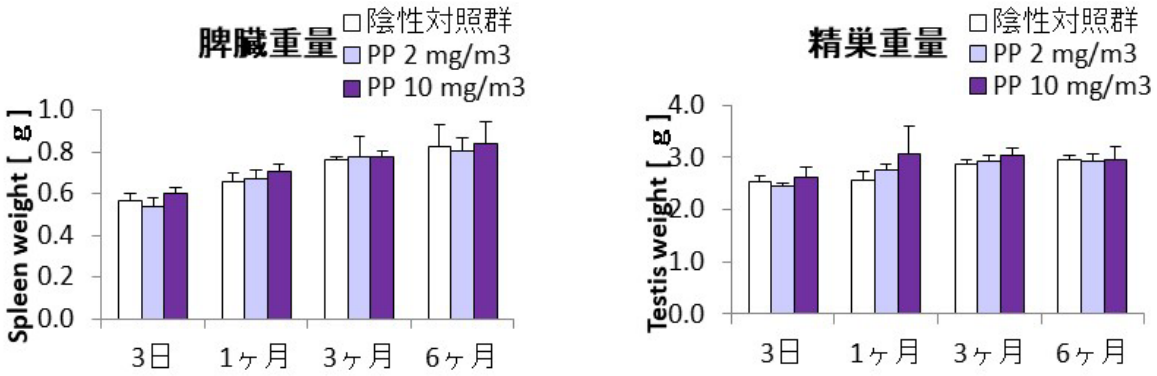
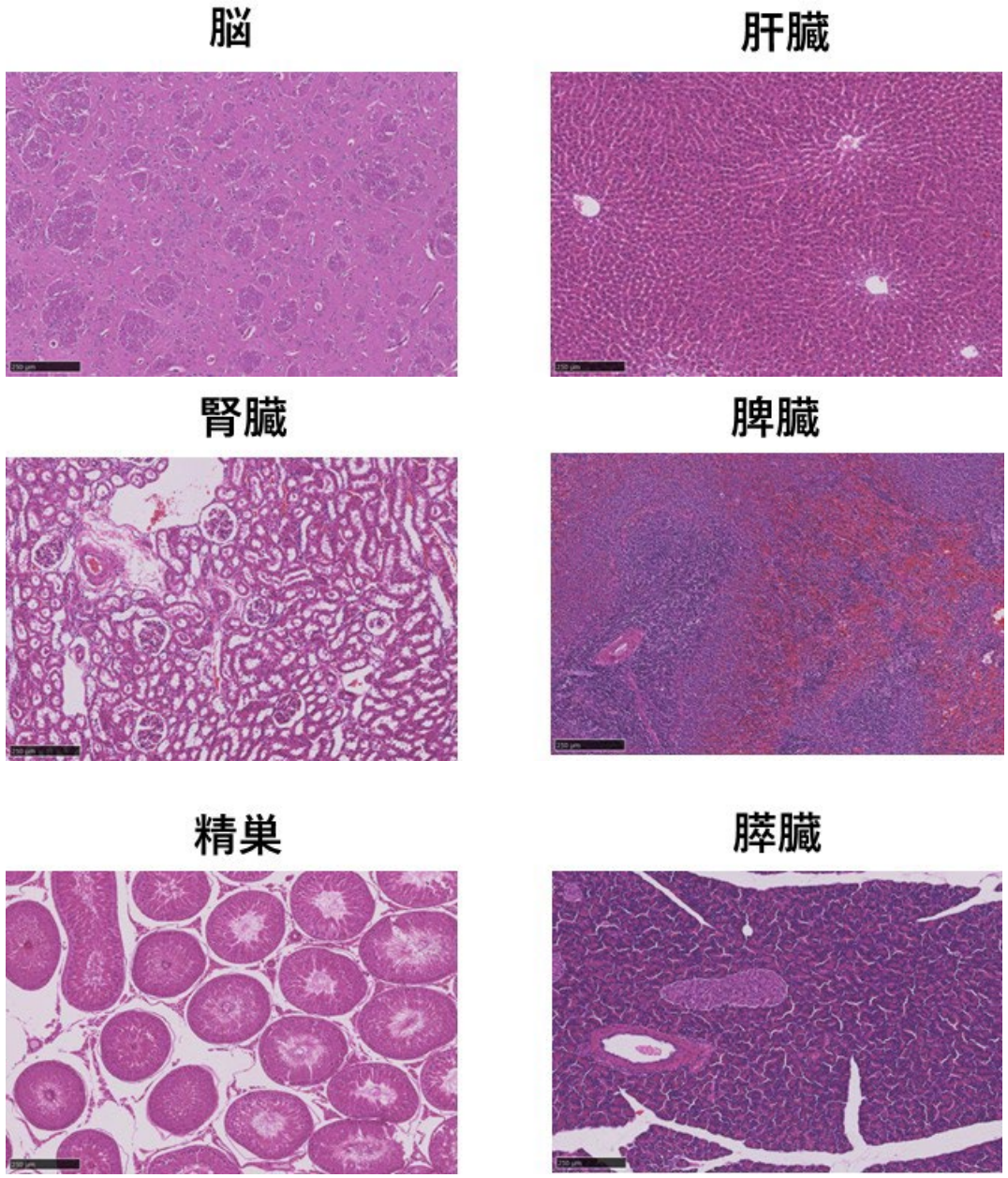


図３１．ポリプロピレン吸入ばく露による各種臓器の重量の結果（Tomonaga et al., 2024）



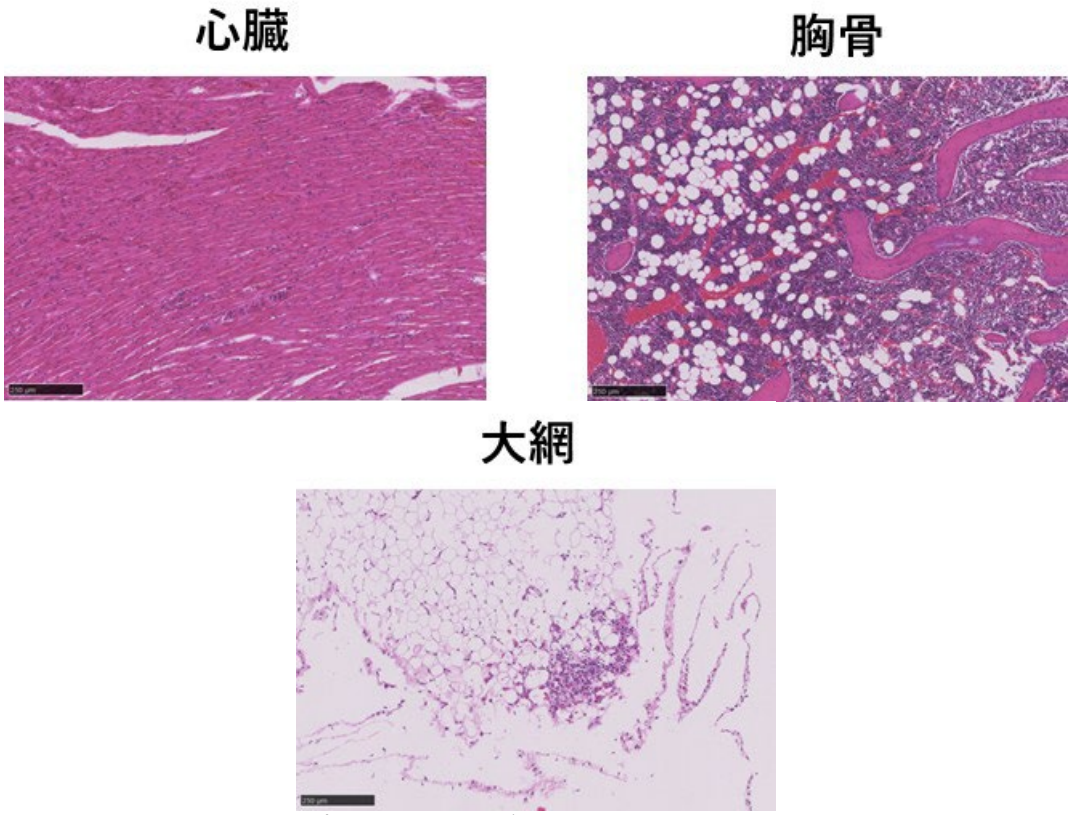


図３２.ポリプロピレン吸入ばく露後の各種臓器の病理組織標本

表３　網羅的遺伝子解析から抽出された遺伝子によるパスウェイ解析結果（Tomonaga et al., 2024）

Terms of KEGG pathway	Gene Counts	%	P Value
Pertussis	4	8.33	0.0014
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	4	8.33	0.0021
IL-17 signaling pathway	4	8.33	0.0027
Alcoholic liver disease	4	8.33	0.0078
Chemokine signaling pathway	4	8.33	0.0175
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	4	8.33	0.0273
Complement and coagulation cascades	3	6.25	0.0286
Cytokine-cytokine receptor interaction	4	8.33	0.0485

参考文献

- Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2024) Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Part Fibre Toxicol. 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.

ポリプロピレンの気管内注入試験に関する成果（成果１、４、５、１３、１５）

吸入ばく露試験で使用するポリプロピレンを使用しラットへの気管内注入試験を実施した。気管内注入試験は、前述の背景の通り、非生理的なばく露方法であることから、吸入による肺有害性評価のゴールドスタンダード評価ではない。しかしながら、肺炎症の持続性から、どの程度の肺障害のポテンシャルがあるのか評価することが可能である。まず気管内注入試験を通して得られた解析結果から示す。

気管内注入試験においては、まず分散液(注入液)中でマイクロプラスチックが凝集していないことの確認が必要である。実環境中のマイクロプラスチックの観測の報告においても、数μmレベルのマイクロプラスチックが検出されている。これは、肺の末端の肺胞まで到達するサイズであることから、このサイズのマイ

クロプラスチックの影響を評価することが必要である。本研究課題では、分散液中のポリプロピレン粒子の走査型電子顕微鏡での観察を実施したところ、大きな凝集は認められず(図３３)、DLSによる粒径分布においても、数μmレベルの粒子となっていることが確認された(図３４)。この分散液をラットに気管内注入した。その結果、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数や好中球割合は、1.0 mg注入(高用量群)では、3日～1ヶ月後にかけて陰性対照群と比較し有意な上昇を認め、0.2 mg注入群(低用量群)においても、3日後のみの一過性の上昇を認め、用量依存性の変化が観察された(図３５)。肺傷害指標である気管支肺胞洗浄液中のLDH活性は、注入1週間後の高用量群で陰性対照群と比較し、有意な上昇を認めた一方で、総蛋白濃度は、高用量群で上昇傾向を認めるも、有意な上昇ではなかった(図３６)。好中球の走化・活性因子である炎症性サイトカインのCINC-1,CINC-2は、いずれも高用量群で注入3日から1ヶ月後にかけて、陰性対照群と比較し有意な上昇が認められた(図３７)。好中球の異物の攻撃因子であるミエロペルオキシダーゼ(MPO)は、3日～1週間にかけて高用量群で陰性対照群と比較し有意な上昇が認められた。肺組織中の酸化ストレス指標であるHO-1は、注入3日後のみ高用量群で上昇が認められた(図３８)。肺病理組織標本の観察(図３９～４３)では、炎症細胞の肺胞腔への流入が高用量群で注入1ヶ月まで認められ、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞や炎症指標と同様の結果が得られた。また、ポリプロピレンの吸入ばく露試験と同様に、注入1ヶ月後の肺組織を用いて、網羅的遺伝子解析を実施したところ、高用量群で、発現量が中央値以上かつ対照群と比較し発現が2倍以上の遺伝子は38個検出され、炎症性サイトカインや肺炎症に関連する遺伝子の発現上昇が認められた(図４４)。

これらの結果から、ポリプロピレンの肺障害のポテンシャルの評価を実施した。我々は、これまで様々な無機物質の気管内注入試験の結果から、肺障害性の有無のボーダーラインは注入1ヶ月以上の持続炎症であることを見いだしている((Tomonaga et al., 2018)(図４５)。本研究の結果は、注入1ヶ月後程度の持続炎症を認めたことから、肺障害性があるかどうかのボーダーラインと考えられた。つまり、気管内注入試験だけでは、吸入ばく露による影響を十分に評価できないレベルであり、有害性評価のゴールドスタンダードである吸入ばく露試験の実施を検討するレベルのマイクロプラスチックと考えられた。

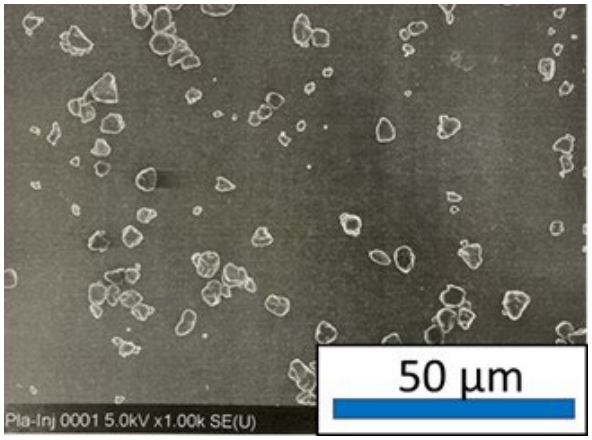


図３３．分散液中のポリプロピレン
(高用量群、走査型電子顕微鏡)
(Tomonaga et al., 2024)

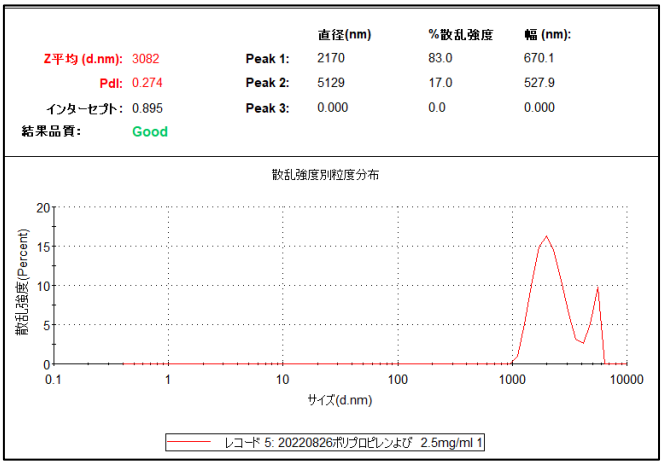


図３４．分散液中のポリプロピレン(高用量群)
粒度分布(動的光散乱法)(Tomonaga et al., 2024)

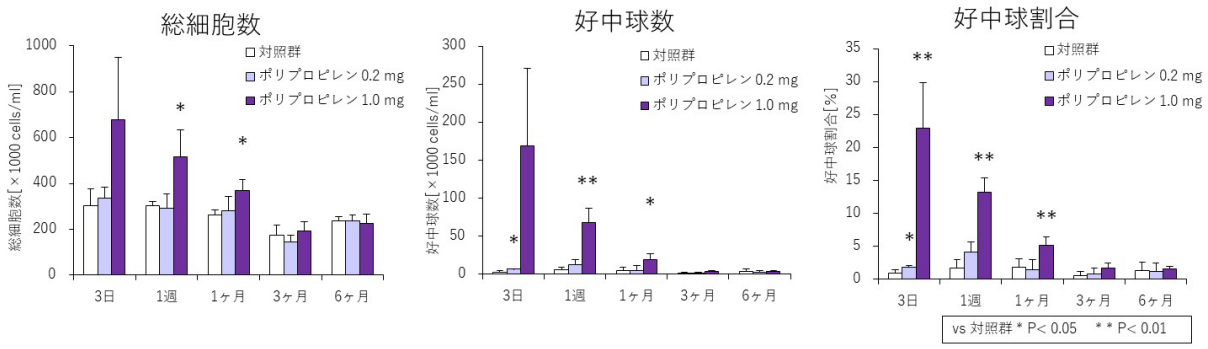


図３５．気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞(総細胞数、好中球数、好中球割合)
(Tomonaga et al., 2024)

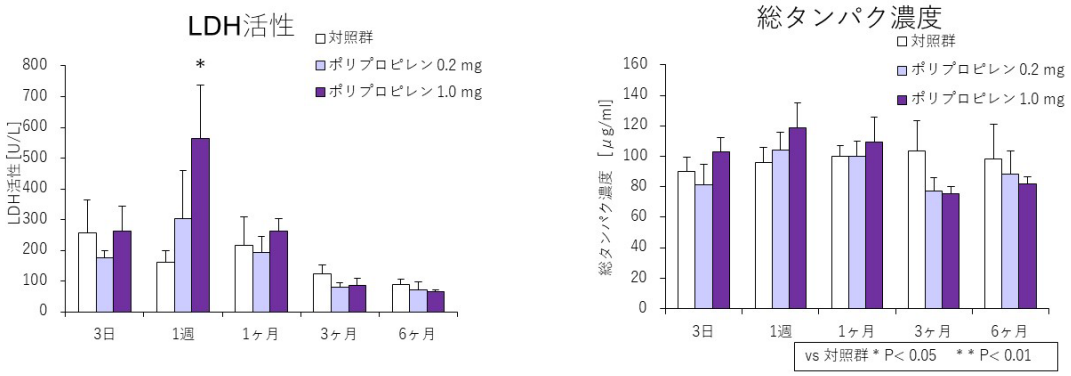


図３６．気管支肺胞洗浄液中の肺傷害指標（Tomonaga et al., 2024）

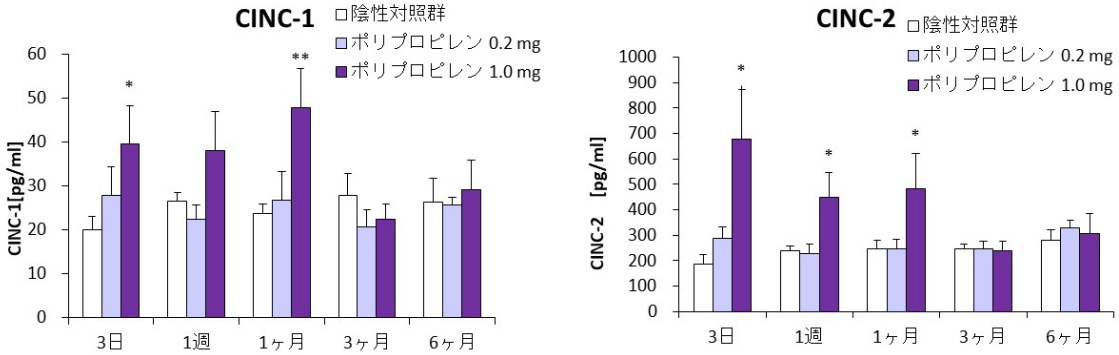


図３７．気管支肺胞洗浄液中の炎症指標(炎症性サイトカイン)（Tomonaga et al., 2024）

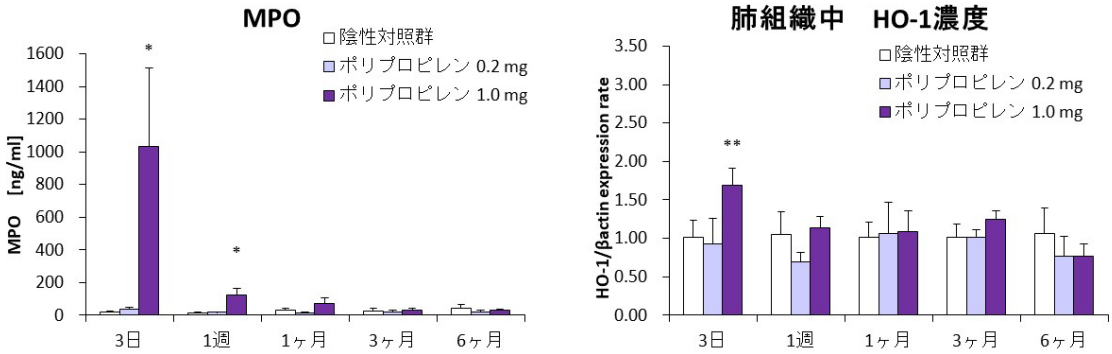


図３８.気管支肺胞洗浄液中の炎症指標と肺組織中の酸化ストレス指標

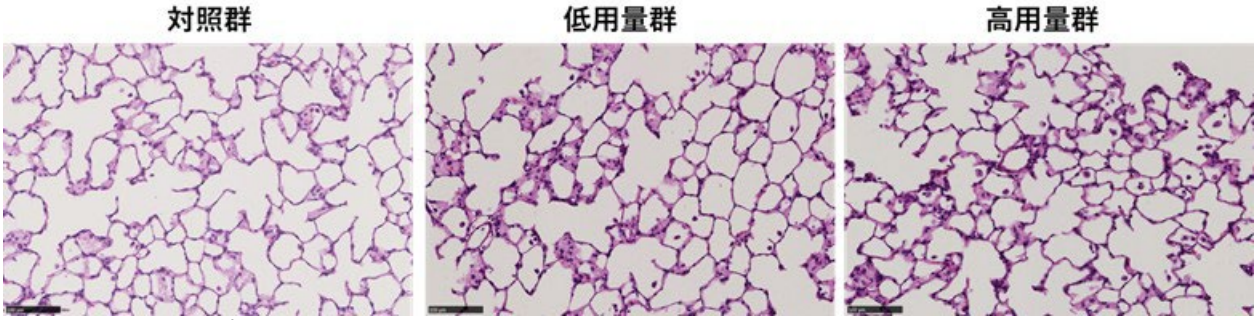


図３９．ポリプロピレン気管内注入試験　肺病理組織標本　注入3日後（Tomonaga et al., 2024）

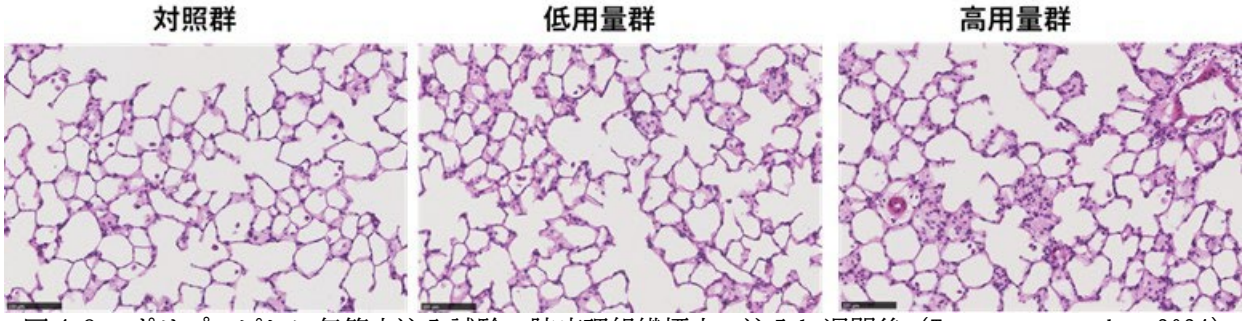


図４０．ポリプロピレン気管内注入試験　肺病理組織標本　注入1 週間後（Tomonaga et al., 2024）

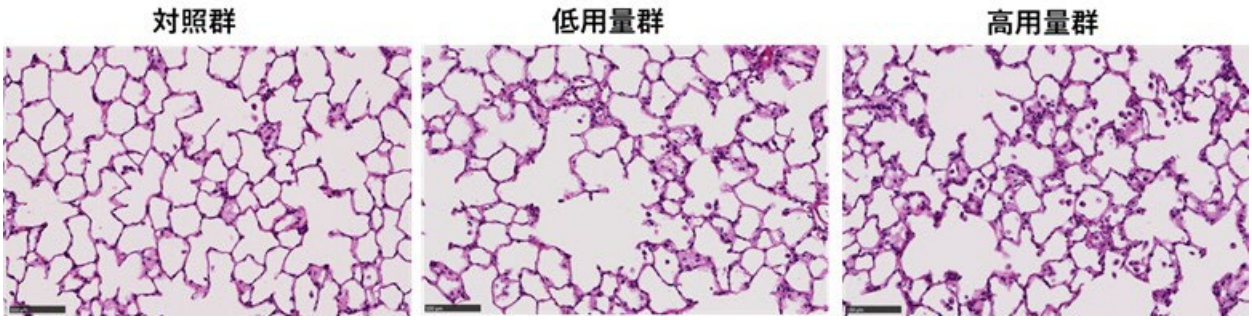


図４１．ポリプロピレン気管内注入試験　肺病理組織標本　注入1ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

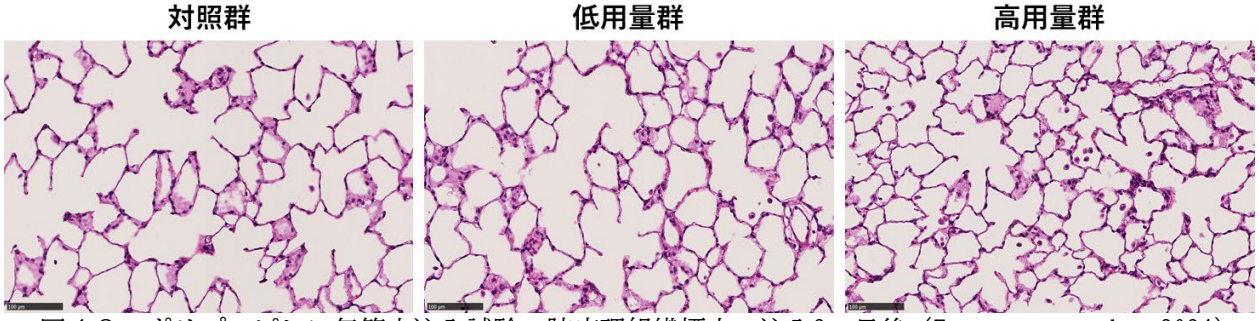


図４２．ポリプロピレン気管内注入試験　肺病理組織標本　注入3ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

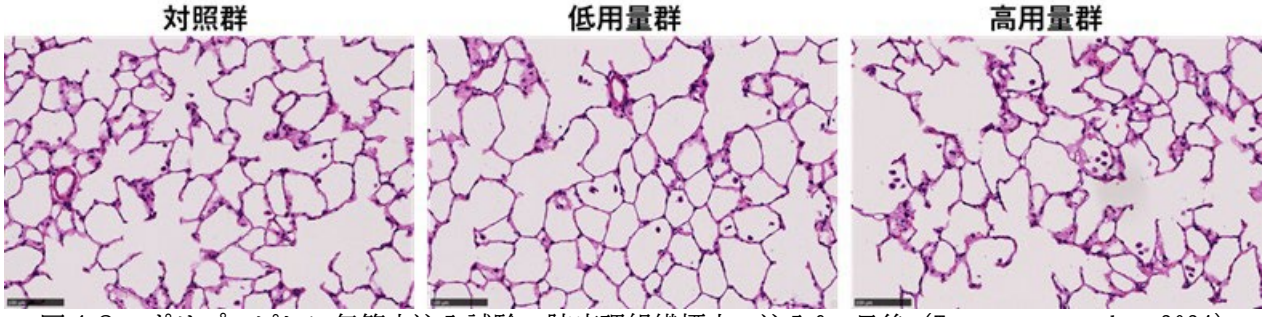


図４３．ポリプロピレン気管内注入試験　肺病理組織標本　注入6ヶ月後（Tomonaga et al., 2024）

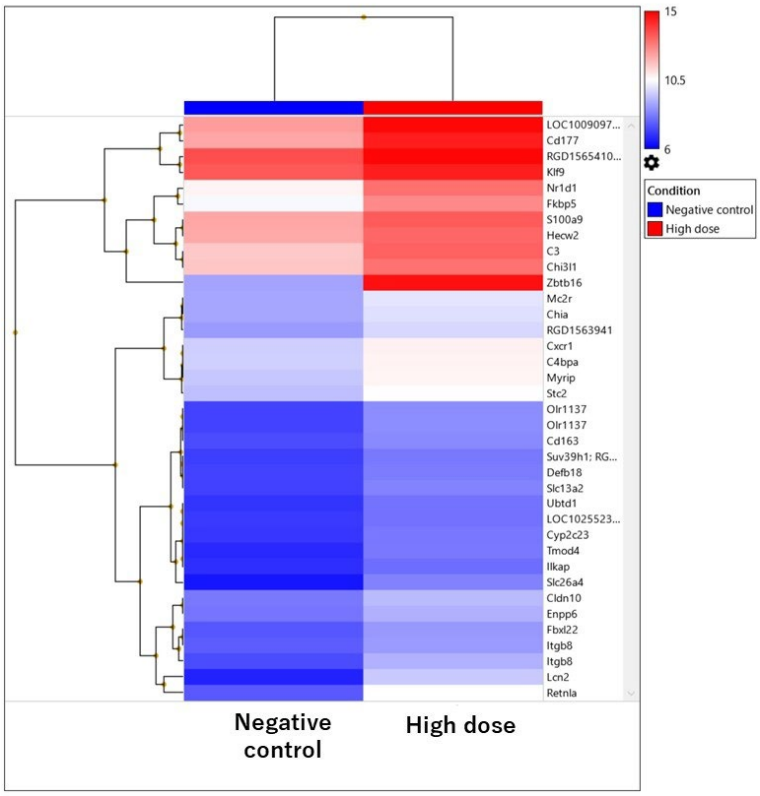


図４４．ポリプロピレン気管内注入試験　網羅的遺伝子解析のヒートマップ（Tomonaga et al., 2024）

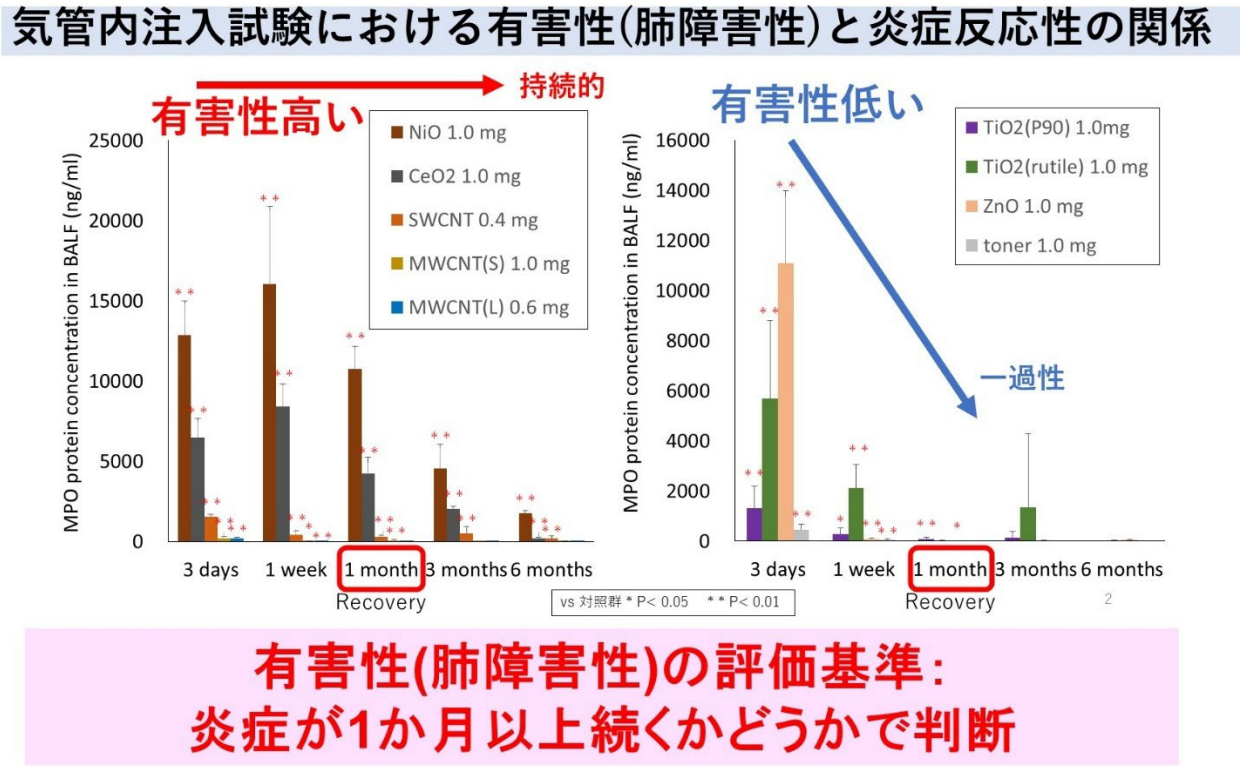


図４５．　吸入性化学物質の気管内注入試験における有害性の判断基準について

参考文献

- Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2024) Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Part Fibre Toxicol. 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.

表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の実施（成果２、３，７）

表面官能基の異なるポリスチレン(非修飾、COOH基修飾、NH_2基修飾)の3種の気管内注入試験を実施し、気管内注入試験から、3日後、1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後に解剖を実施した。以下の結果を示す。まず、表面官能基の異なるポリスチレンの分散液中の走査型電子顕微鏡像の結果を示す。いずれのポリスチレンも球状であるが、NH_2基修飾のポリスチレンの表面性状は、凹凸が認められた(図４６)。いずれのポリスチレンの分散液のDLSは、1 μmレベルであり、大きな凝集は認められなかった(図４７)。ポリスチレンの表面官能基が異なることで、表面電荷が変化することが知られているが、本研究課題においては、表面官能基の違いによるζ電位の明確な差異は得られなかった(表４)。この原因としては、ζ電位は粒子の表面電荷を間接的に表現しており、界面活性剤や乖離した対イオンの再凝集による影響などが考えられる。一方で、表面の状態をFT-IRで解析したところ、COOH基修飾やNH_2基修飾のポリスチレンは、非修飾のポリスチレンと比較し、C=O 伸縮バンドの 1600 cm^{-1} と N-H 結合の 1695 cm^{-1} の 2 つの波長における吸収率が明らかに増加していた。これらの変化は、COOH基修飾やNH_2基修飾それぞれのポリスチレンの粒子表面で定性的なカルボキシル化とアミノ化が促進されていることを示している(図４８)。

気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の観察では、NH_2基修飾のポリスチレン注入の3日後の高用量群で、対照群と比較し、総細胞数、好中球数、好中球割合の有意な上昇を認め、注入1週間後まで、好中球数の有意な上昇が認められた。COOH基修飾では、3日後の高用量群で総細胞数のみの有意な上昇を認めた。非修飾のポリスチレンでは、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の有意な上昇は認められなかった(図４９、５０、５１)。気管支肺胞洗浄液中の肺傷害の指標として、乳酸脱水素酵素(LDH)活性と総蛋白濃度は、NH_2基の高用量群で、対照群と比較し3日後でのみ有意な上昇の持続を認め、非修飾のポリスチレンとCOOH基修飾のポリスチレンでは、現在の観察期間中において、対照群と比較し有意な上昇は認められなかった(図５２、図５３)。また炎症指標である炎症性サイトカインのCINC-1、CINC-2について、CINC-1は、非修飾のポリスチレンの注入1週間後に陰性対照群と比較し有意な上昇が認められた(図５４)。CINC-2については、NH_2基修飾のポリスチレン注入の3日後の高用量群で、陰性対照群と比較し有意な上昇が認めた(図５５)。酸化ストレスに関する

解析でも、ウェスタンブロットにおける酸化ストレス指標であるHO-1タンパク発現も、気管内注入3日後のラット肺組織ではNH_2基修飾のポリスチレンのみ上昇していた(図５６)。RT-qPCRを用いた肺組織中の酸化ストレスに関する遺伝子(HO-1、Gclm、Srxn1)の結果でも、NH_2基修飾のポリスチレンでは対照群と比較してHO-1遺伝子(Hmox1)が有意に増加していた(図５７)。肺病理組織標本での観察では、肺炎症は軽微であり、気管支肺胞洗浄液や肺組織中の炎症指標の結果と同様に、炎症の持続性は乏しく、肺炎症能は低いと考えられた(図５８-６２)。これらの結果から、表面官能基の異なる3種のポリスチレンの比較において、NH_2基修飾のポリスチレンで、急性期の肺炎症・肺傷害、酸化ストレスの上昇を認めた(表５)。

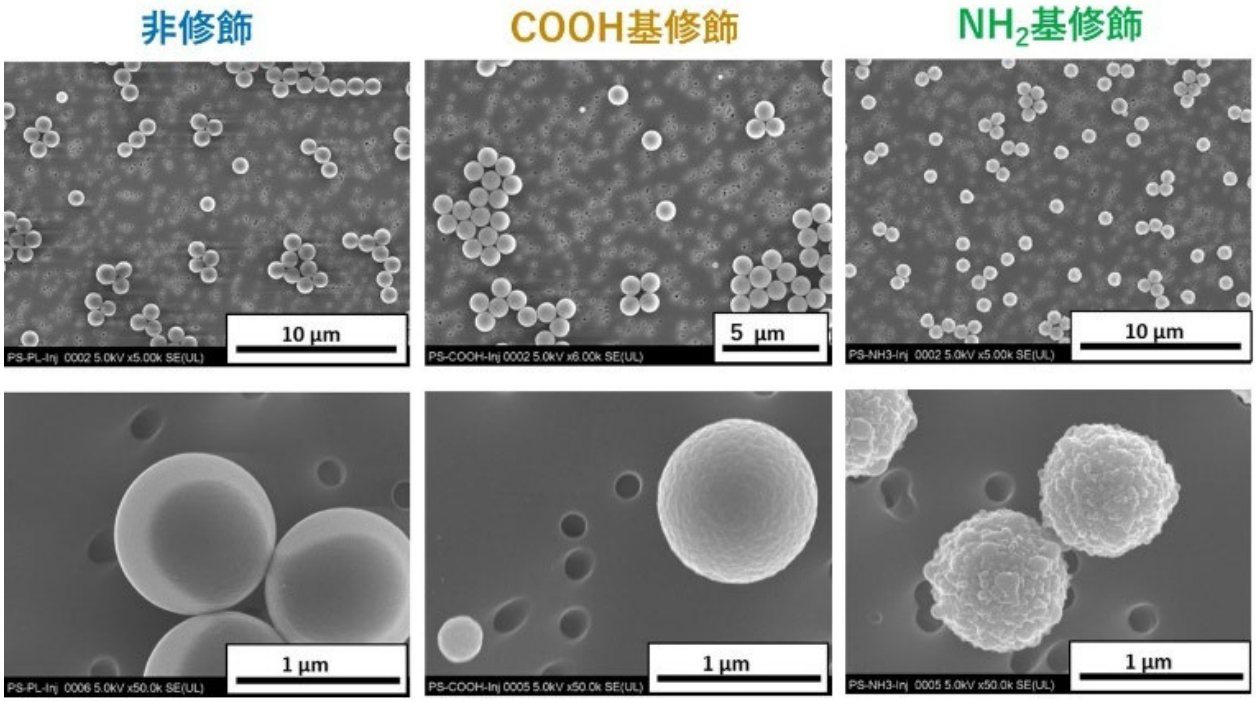


図４６．分散液中のポリプロピレン(高用量群、走査型電子顕微鏡)　(Tomonaga et al., 2025)

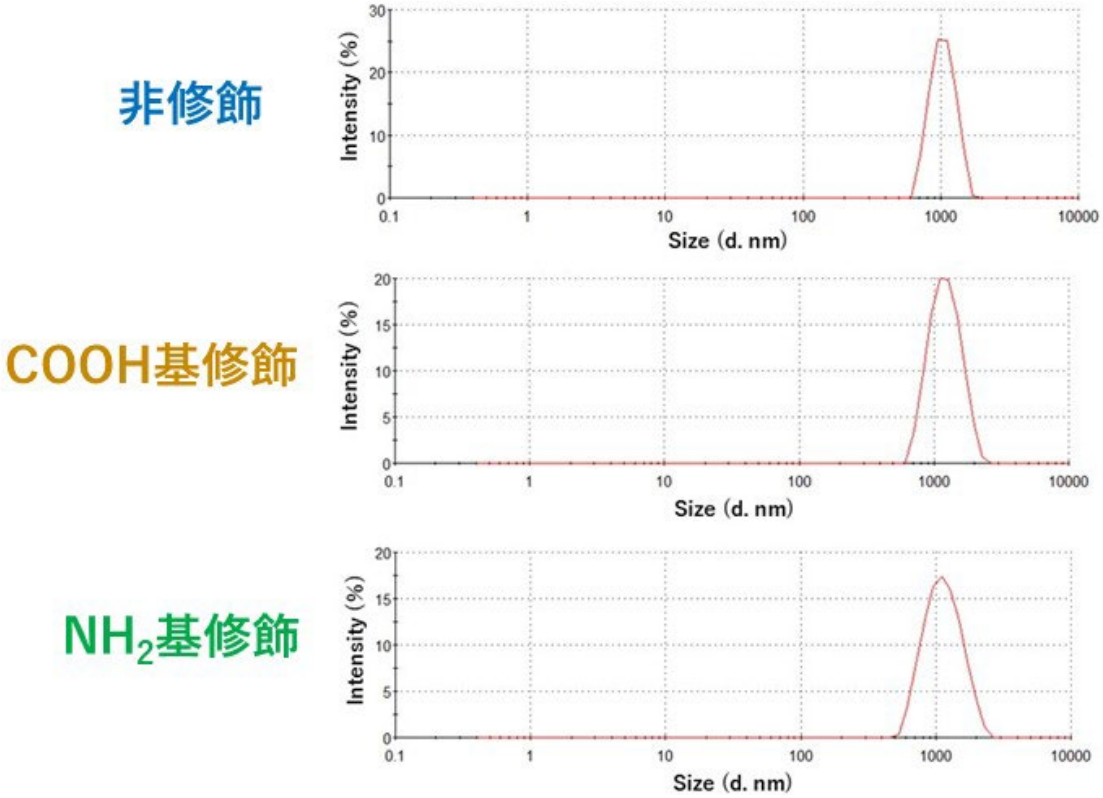


図４７．分散液中のポリスチレン(高用量群)　粒度分布(動的光散乱法)(Tomonaga et al., 2025)

表４．表面官能基の異なるポリスチレンのζ電位と分散液中のｐH

	非修飾	COOH修飾	NH_2修飾
ζ電位（mV）	-0.36～-0.55	-5.56～3.09	-0.88～2.61
pH	6.74	6.64	7.44

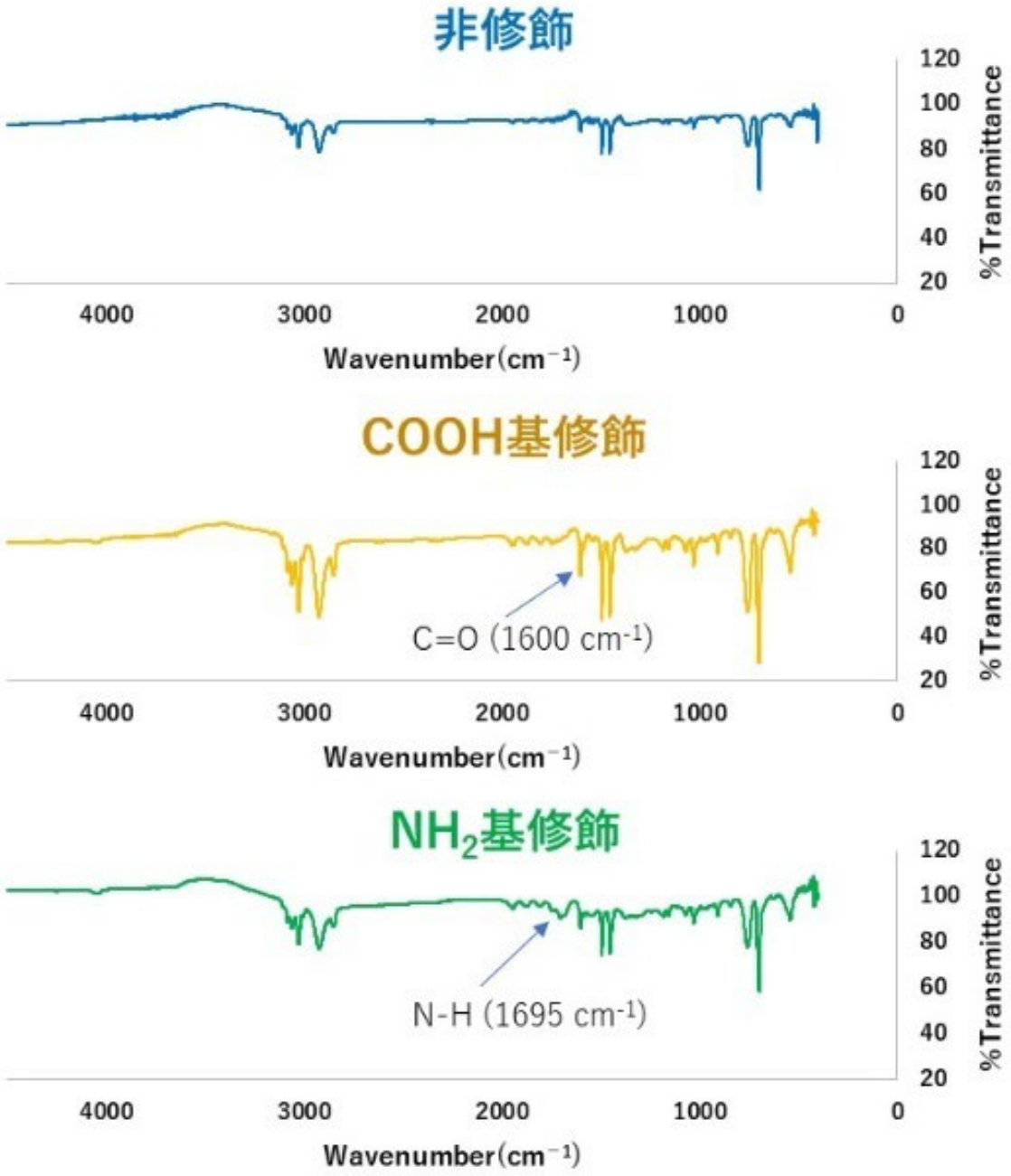


図４８.表面官能基の異なるポリスチレンのFT-IR結果　(Tomonaga et al., 2025)

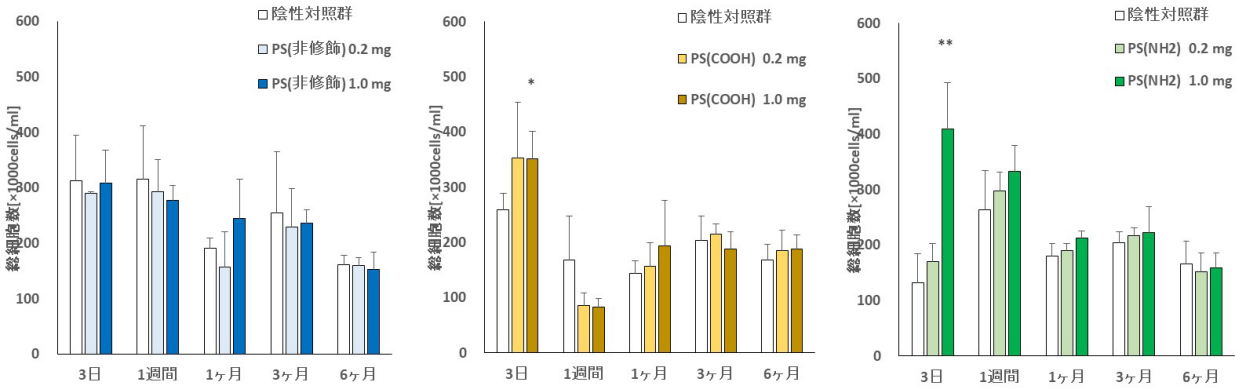


図４９．気管支肺胞洗浄液中の総細胞数(官能基の異なるポリスチレン)（Tomonaga et al., 2025）

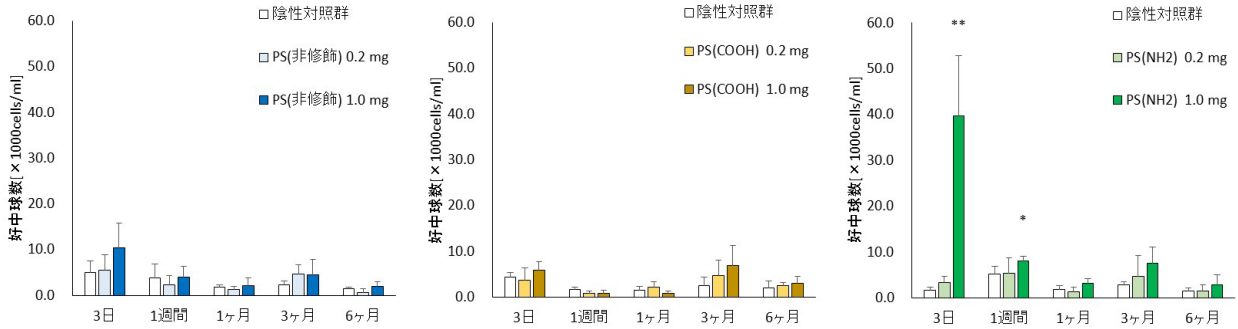


図５０．気管支肺胞洗浄液中の好中球数(官能基の異なるポリスチレン)（Tomonaga et al., 2025）

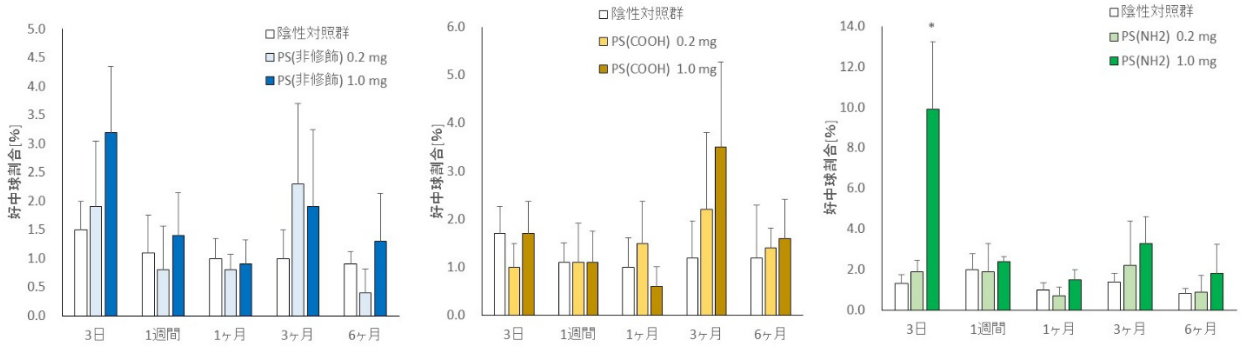


図５１．気管支肺胞洗浄液中の好中球割合(官能基の異なるポリスチレン)（Tomonaga et al., 2025）

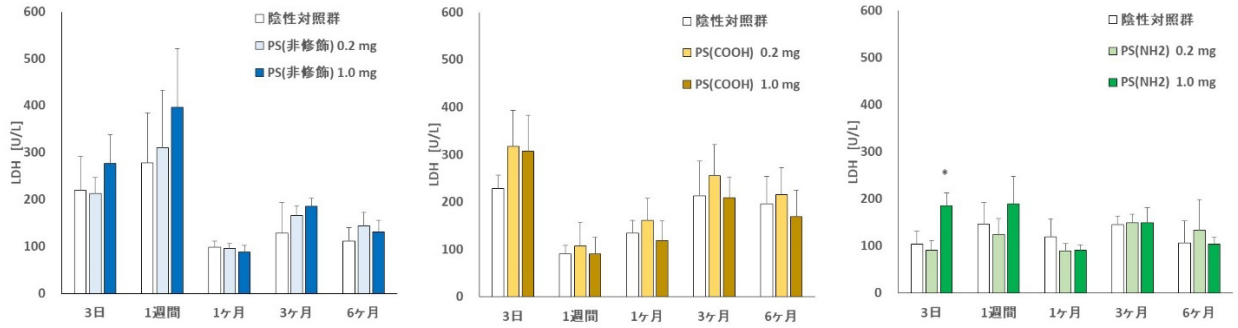


図５２．気管支肺胞洗浄液中のLDH活性(官能基の異なるポリスチレン)（Tomonaga et al., 2025）

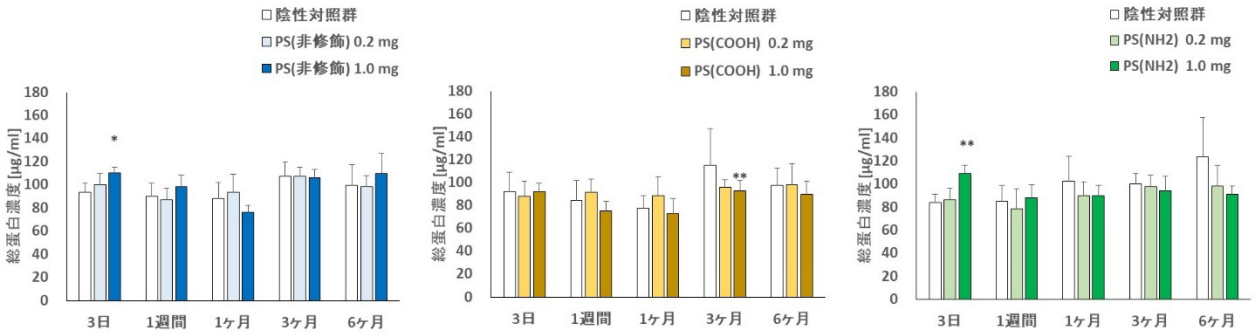


図５３．気管支肺胞洗浄液中の総蛋白濃度(官能基の異なるポリスチレン)（Tomonaga et al., 2025）

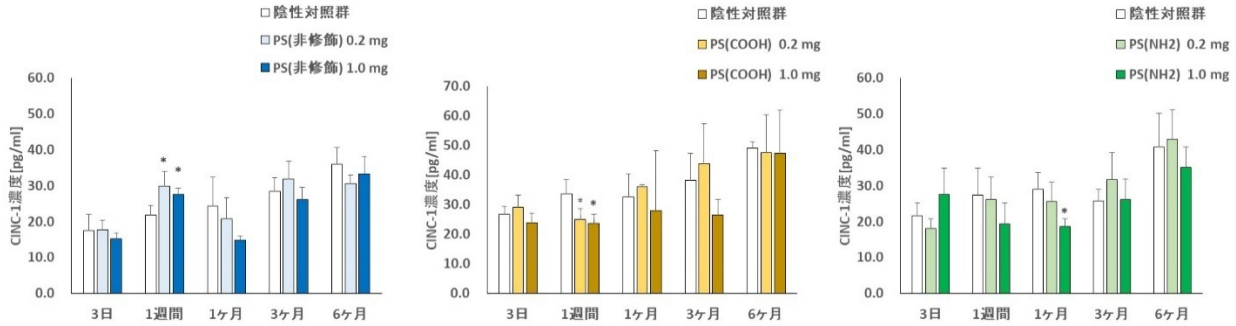


図５４．気管支肺胞洗浄液中のCINC-1濃度(炎症の指標)(官能基の異なるポリスチレン)
(Tomonaga et al., 2025)

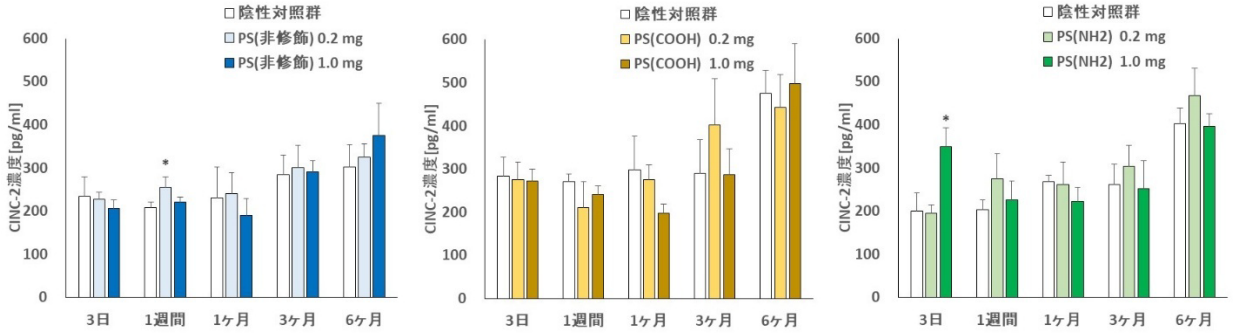


図５５．気管支肺胞洗浄液中のCINC-2濃度(炎症の指標)(官能基の異なるポリスチレン)
(Tomonaga et al., 2025)

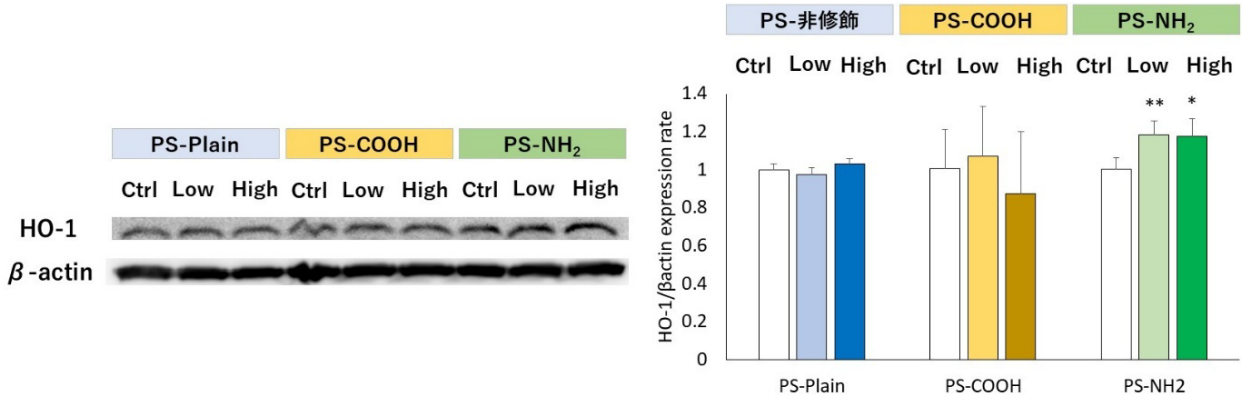


図５６．肺組織中のHO-1タンパクの発現(酸化ストレスの指標)(官能基の異なるポリスチレン)
(Tomonaga et al., 2025)

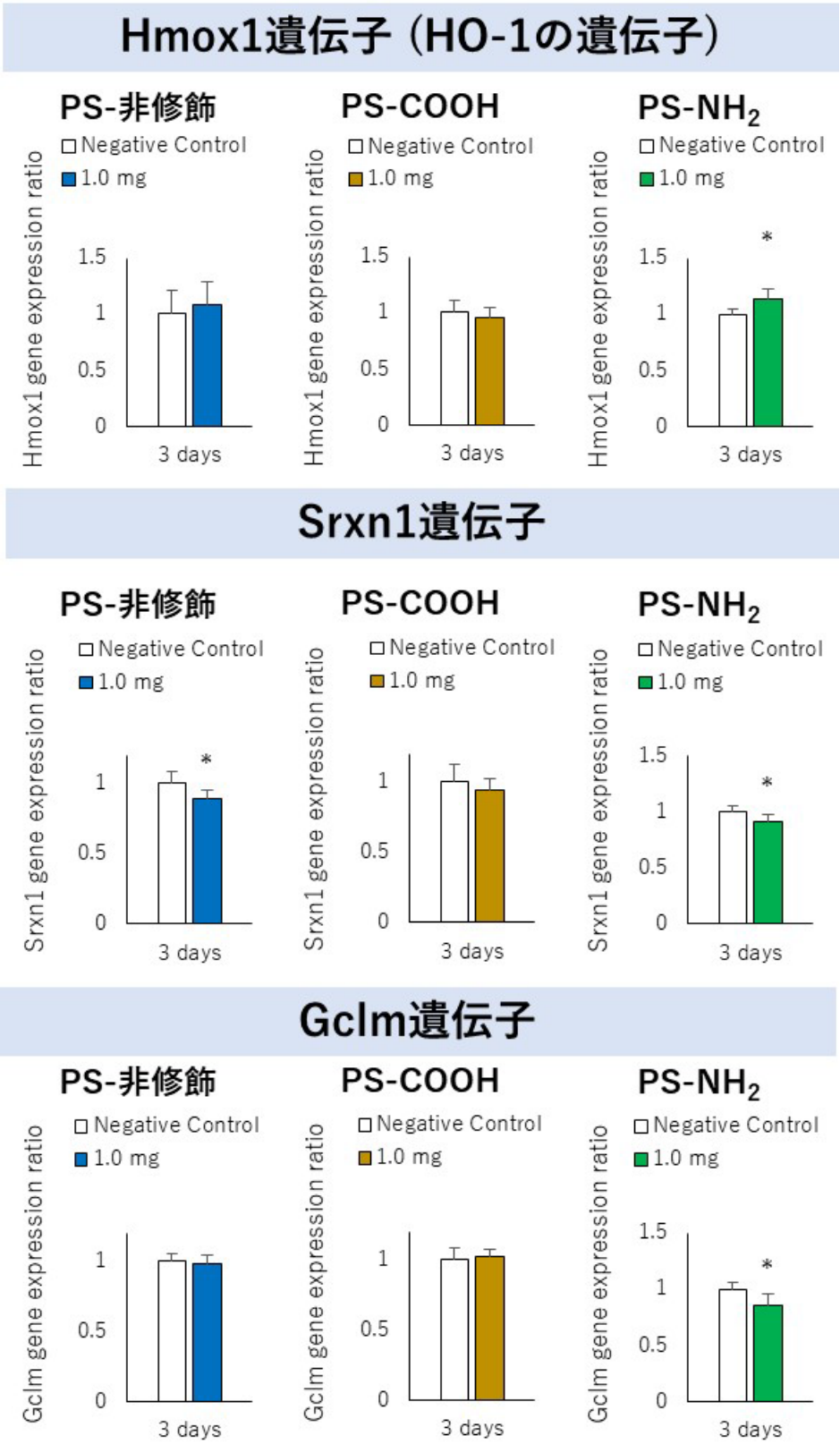


図５７．肺組織中の遺伝子発現(酸化ストレスに関連する遺伝子)(官能基の異なるポリスチレン)
(Tomonaga et al., 2025)

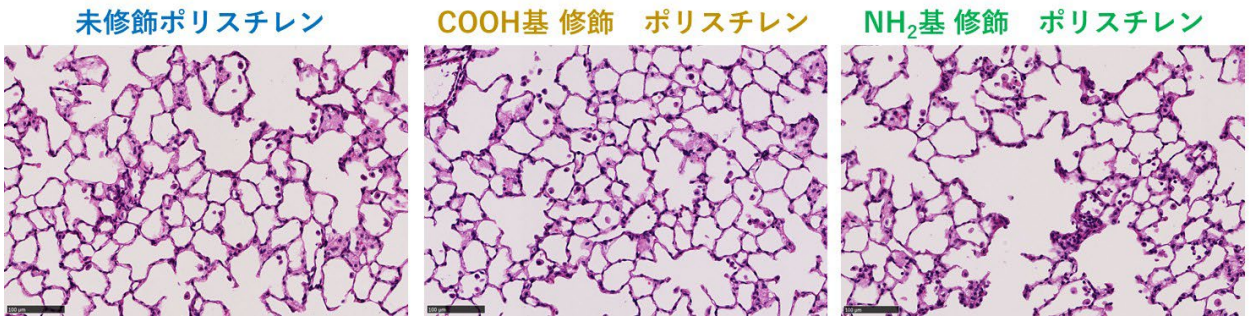


図５８．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験　肺病理組織標本　（各高用量群の比較）　3日後
（Tomonaga et al., 2025）

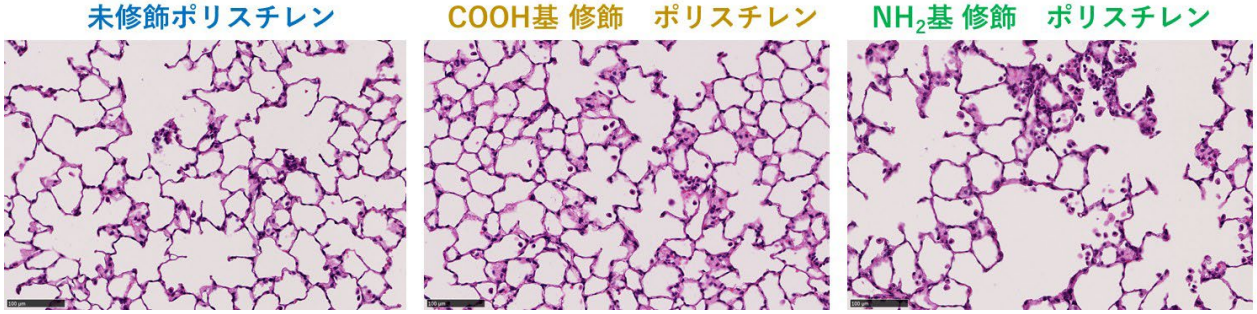


図５９．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験　肺病理組織標本　（各高用量群の比較）　1週間後　（Tomonaga et al., 2025）

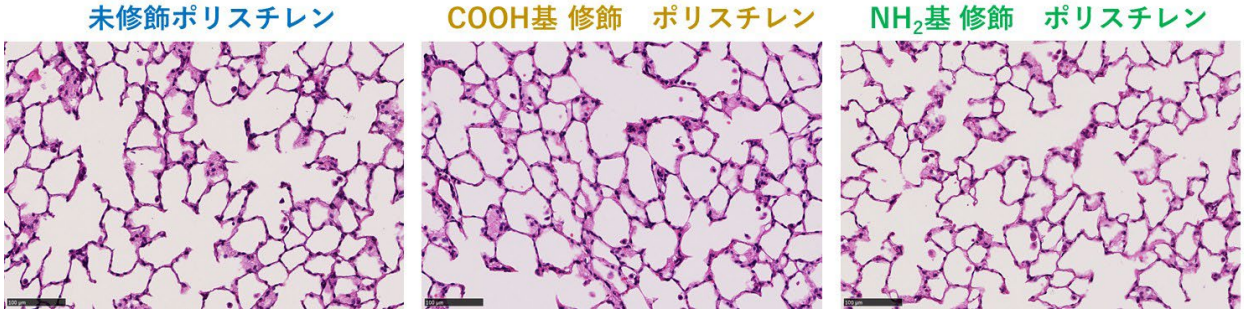


図６０．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験　肺病理組織標本　（各高用量群の比較）　1ヶ月後　（Tomonaga et al., 2025）

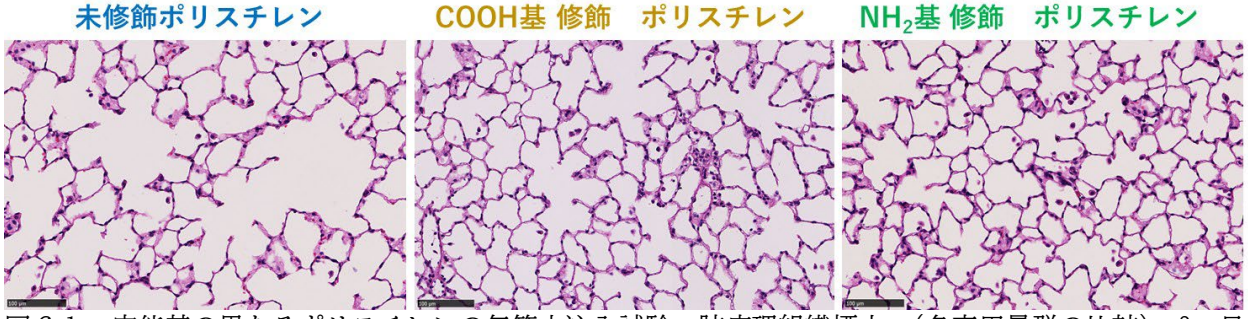


図６１．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験　肺病理組織標本　（各高用量群の比較）　3ヶ月後　（Tomonaga et al., 2025）

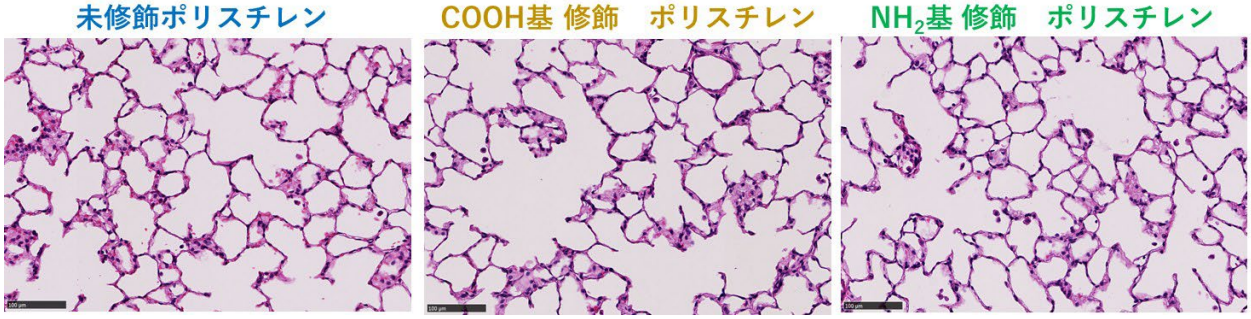


図６２．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験　肺病理組織標本　（各高用量群の比較）　6ヶ月

後 (Tomonaga et al., 2025)

表５．官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の結果のまとめ

	PS-非修飾		PS-COOH		PS-NH_2	
	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)
総細胞数	－	－	－	＋	－	＋
好中球数	－	－	－	－	－	＋
好中球割合	－	－	－	－	－	＋
CINC-1	－	＋	－	＋	－	－
CINC-2	＋	＋	－	－	－	＋
LDH活性	－	－	－	－	－	＋
総蛋白濃度	－	＋	－	－	－	＋
HO-1	－	－	－	－	＋	＋

－：有意な変化なし、＋：一過性の変化あり、＋＋：1ヶ月以上持続的な変化あり

続いて、表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験において、NH_2基修飾のポリスチレンで、非修飾やCOOH基修飾のポリスチレンと比べ、肺炎症能や酸化ストレス能が高かった。アミノ基修飾のポリスチレンの肺障害性メカニズムを明らかにするために、RAW細胞を用いて培養細胞試験を実施した。

培養細胞試験においても、気管内注入試験と同様に、NH_2基修飾のポリスチレンで細胞生存率と相関するATP活性に最も影響を与えていた(図６３)。また、肺組織で認められた酸化ストレスは、培養細胞試験でも観察され、酸化ストレス増加の傾向は、肺組織中と同様に、酸化ストレスマーカーであるAREの発現がNH_2基修飾のポリスチレンで最も有意に増加していた(図６４)。AREは抗酸化物質HO-1、Gclm、Srxn1を誘導することから、酸化ストレスの指標と考えられている。本研究課題では、肺組織でHO-1のみ有意な遺伝子発現が観察され、タンパク質レベルでも有意な発現が観察されており、培養細胞試験においても、HO-1を誘導するAREの有意な発現上昇を認めたことから、NH_2基修飾のポリスチレンが誘導した酸化ストレスは、肺炎症と関係している可能性が考えられる。ポリスチレン粒子の表面にNH_2基が修飾されると、一般的に表面がプラスの電荷をもつことが知られている。生体内の細胞表面はマイナスに帯電していることから、NH_2基修飾のポリスチレンは生体内で細胞に接着しやすい性質があると推測される。本研究課題においては、使用したポリスチレンの細胞への接着性は、定量的に評価は実施できてはいないが、表面官能基の異なるポリスチレンにおいて、培養細胞から直接、誘導される酸化ストレスに差が認められたことを考慮すると、ポリスチレンと細胞との接着が酸化ストレスに差異が生じ、最終的に急性期の肺炎症に差が認められたと考えられる。

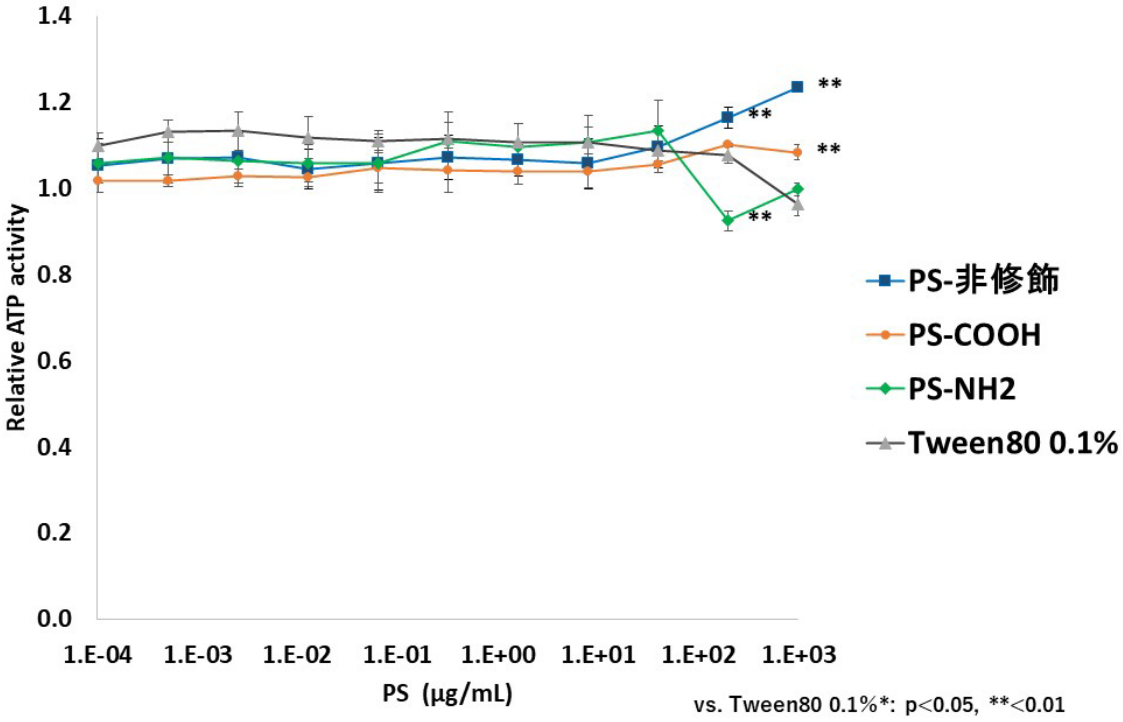


図６３．官能基の異なるポリスチレンの培養細胞試験(ATP活性：細胞生存率と相関)
(Tomonaga et al., 2025)

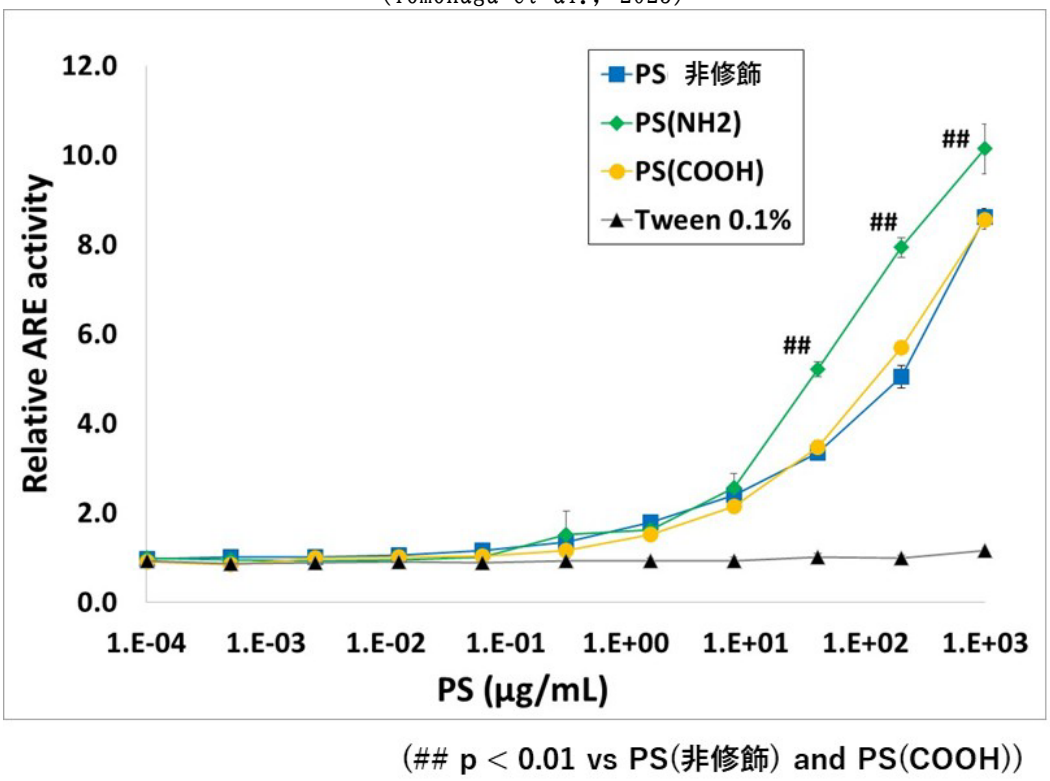


図６４．官能基の異なるポリスチレンの培養細胞試験(ARE活性：酸化ストレ指標)
(Tomonaga et al., 2025)

参考文献

- Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2025) Comparison of lung disorders following intratracheal instillation of polystyrene microplastics with different surface functional groups. J Occup Health. 7;67(1):uiaf006. doi: 10.1093/joccuh/uiaf006.

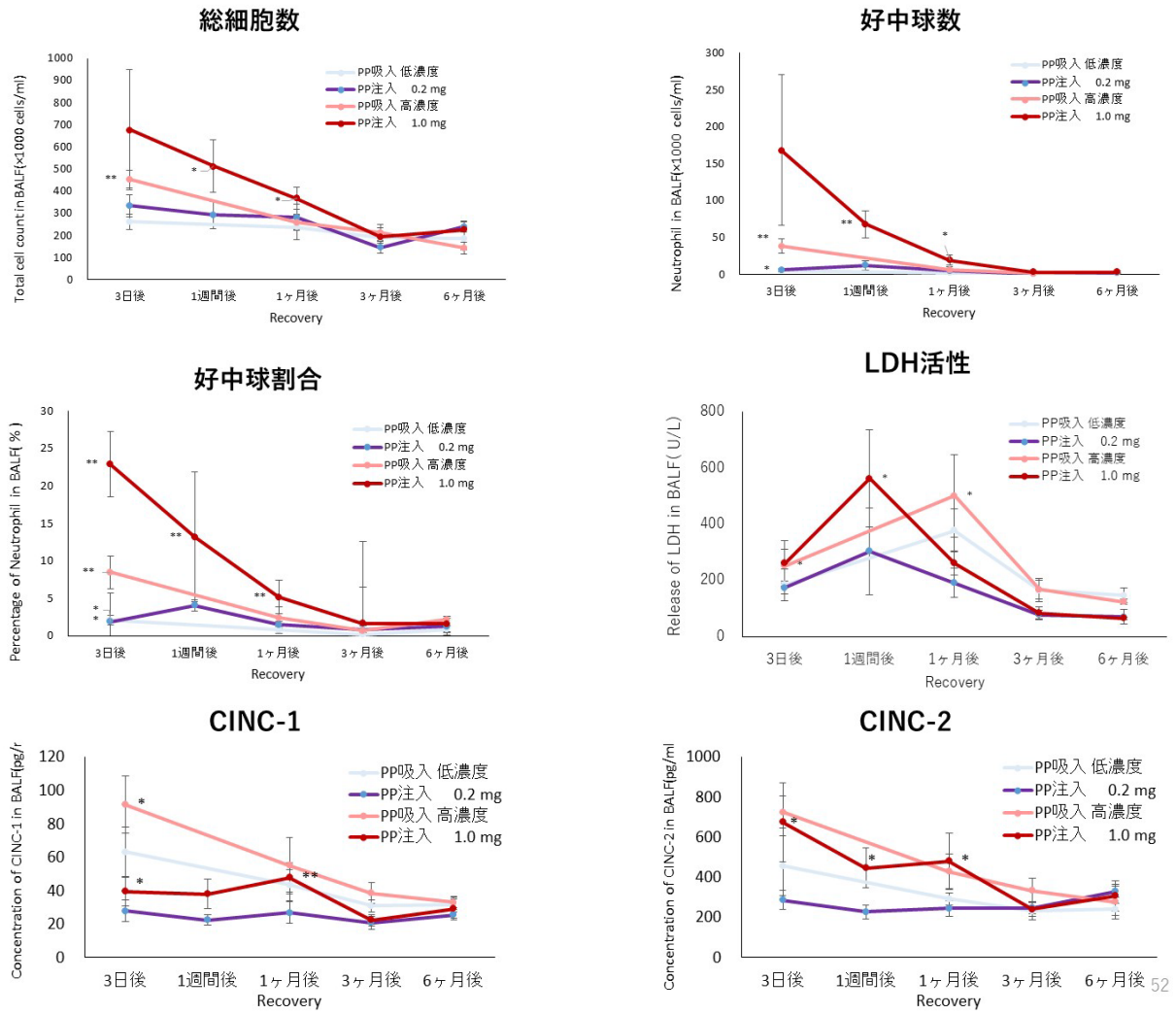
ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の相同性の評価　（成果９）

本研究のポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の比較の結果を図６５に示す。ポリプロピレンの気管内注入試験では、高用量で気管支肺胞洗浄液中の総細胞数や好中球数(炎症細胞)が1ヶ月程度まで上昇が持続しており、低用量では、3日後の一過性の好中球の上昇が認められた。ポリプロピレンの吸入ばく露試験では、高濃度群で、ばく露終了から3日後で、総細胞数、好中球数の上昇が認められ、低濃度で、好中球割合の上昇が3日後で認められ、ごく軽度の肺炎症が確認された。また、肺傷害指標のLDH活性や総蛋白濃度、炎症性サイトカインであるCINC-1,CINC-2についても、各陰性対照群と比較し有意な上昇を認める傾向は、吸入ばく露試験の高濃度群と気管内注入試験の高用量群、低濃度群と低用量群でそれぞれ同様の上昇傾向が認められた。病理所見においても、気管内注入試験のほうが炎症細胞の流入は多い傾向は認められたが、両試験ともに、肺胞腔への炎症細胞の流入が主な病態であった(図６６)。以上より、ポリプロピレンの気管内注入試験と吸入ばく露試験の肺障害は程度に差はあるが、炎症の傾向には相同性があることが伺えた(表６)。

また、我々は、以前、工業用ナノ材料に対する肺障害性の評価において、吸入ばく露試験と気管内注入試験の結果の整合性を検討し、工業用ナノ材料における気管内注入試験が吸入ばく露試験の推定に有用であることを報告している(Morimoto et al., 2016)。マイクロプラスチックにおいても、吸入ばく露試験と気管内注入試験の結果の整合性を評価することで、気管内注入試験が吸入ばく露試験の結果を推定し、スクリーニング手法としての有用性が期待できると考えている。

参考文献

- Morimoto, Y. et al. (2016) ‘Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles’, Nanotoxicology, 10(5), pp. 607-618. doi: 10.3109/17435390.2015.1104740.



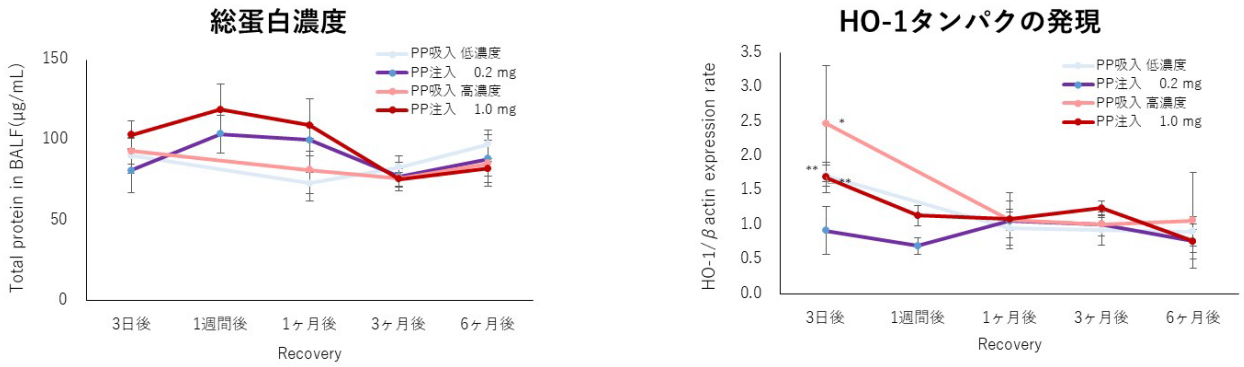


図６５．ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の比較結果

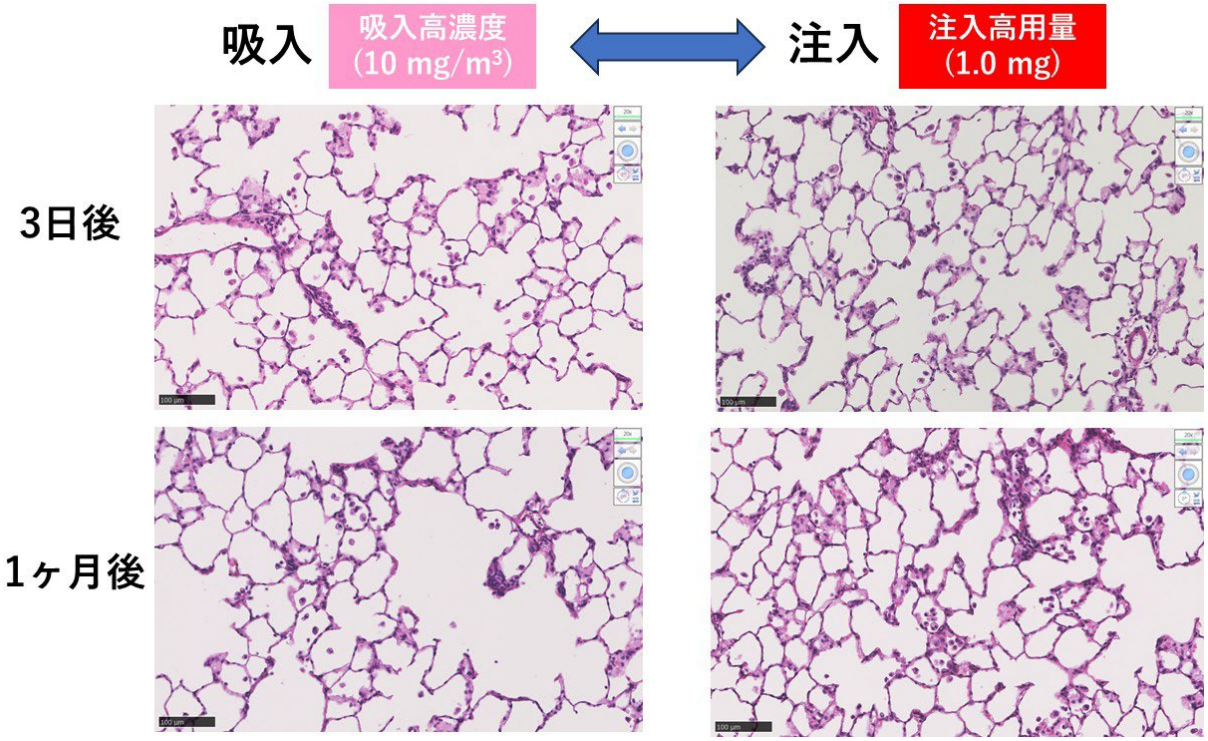


図６６．ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の病理所見の比較

表６．ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験の比較結果のまとめ

	注入	吸入	注入	吸入
	低用量 (0.2 mg)	低濃度 (2 mg/m³)	高用量 (1.0 mg)	高濃度 (10 mg/m³)
総細胞数	ー	ー	＋＋	＋
好中球数	＋	ー	＋＋	＋
好中球割合	＋	＋	＋＋	＋
CINC-1	ー	ー	＋＋	＋
CINC-2	ー	ー	＋＋	＋＋
LDH活性	ー	ー	＋	＋＋
総蛋白濃度	ー	ー	ー	ー
HO-1	ー	＋	＋	＋

ー：有意な変化なし、＋：一過性の変化あり、＋＋：1ヶ月以上持続的な変化あり

表面官能基の異なるポリスチレンの吸入による影響の推測（成果１０）

ポリプロピレンの気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果から、マイクロプラスチックの気管内注入試験と吸入ばく露試験には、一定の相同性があることが確認されたことから、ポリプロピレンの気管内注入試験の肺障害を基準となる病変(基準病変)とし、表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の肺障害との比較をおこなった(表７)。まず、ポリプロピレンの気管内注入試験結果と表面官能基の異なるポリスチレ

ンの気管内注入試験の肺障害性のランキングは、低用量群で比較すると、ポリプロピレン＞NH_2基修飾ポリスチレン＞非修飾ポリスチレン・COOH基修飾ポリスチレンであり、高用量群で比較すると、ポリプロピレン＞NH_2基修飾ポリスチレン＞非修飾ポリスチレン・COOH基修飾ポリスチレンであった(図６７)。

基準物質としてのポリプロピレンの前項に示した結果として、①気管内注入試験による急性期の持続性炎症を認め(図６５)、②吸入ばく露試験による軽度の急性炎症（肺炎症）を認めた(図６６)。

このポリプロピレンを基準として比較すると、気管内注入したポリスチレンは修飾の有無にかかわらず、レベルの差はあるが急性炎症を引き起こした。しかし、そのポリスチレンの炎症は、ポリプロピレンによる炎症と類似しているが、そのレベルが低く一過性であった。つまり、ポリスチレンの炎症所見は、修飾の有無にかかわらず、ポリプロピレンよりも質的にも量的にも、総合的に低い反応であった。したがって、ポリスチレンの気管内注入試験の結果をポリプロピレンの結果との相互性から考えるとポリスチレンの吸入ばく露試験による肺病変の推測は、修飾の有無にかかわらず、ポリプロピレンよる肺病変と類似しており、そのレベルは低いことが示唆された。このように、基準物質であるポリプロピレンの気管内注入試験と吸入ばく露試験の結果との相互性を評価することにより対象とするマイクロプラスチックの気管内注入試験を行うだけで、吸入ばく露試験の肺病変レベルを推測することが可能である。あくまで推測であり、この推測の信頼性を高めるためには、複数のマイクロプラスチックを用いた吸入ばく露試験や気管内注入試験を実施し、比較基準となるエビデンスを構築していくことが重要であり、マイクロプラスチックの吸入ばく露による影響を評価していく上で、今後の新たな重要な研究テーマであると考える。

表７．　4種のマイクロプラスチックの気管内注入試験のまとめ

ポリプロピレン

	注入 低用量 (0.2 mg)	注入 高用量 (1.0 mg)
総細胞数	－	＋＋
好中球数	＋	＋＋
好中球割合	＋	＋＋
CINC-1	－	＋＋
CINC-2	－	＋＋
LDH活性	－	＋
総蛋白濃度	－	－
HO-1	－	＋

ポリスチレン

	PS-非修飾		PS-COOH		PS-NH_2	
	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)	低用量 (0.2 mg)	高用量 (1.0 mg)
総細胞数	－	－	－	＋	－	＋
好中球数	－	－	－	－	－	＋
好中球割合	－	－	－	－	－	＋
CINC-1	－	＋	－	＋	－	－
CINC-2	＋	＋	－	－	－	＋
LDH活性	－	－	－	－	－	＋
総蛋白濃度	－	＋	－	－	－	＋
HO-1	－	－	－	－	＋	＋

－：有意な変化なし、＋：一過性の変化あり、＋＋：1ヶ月以上持続的な変化あり

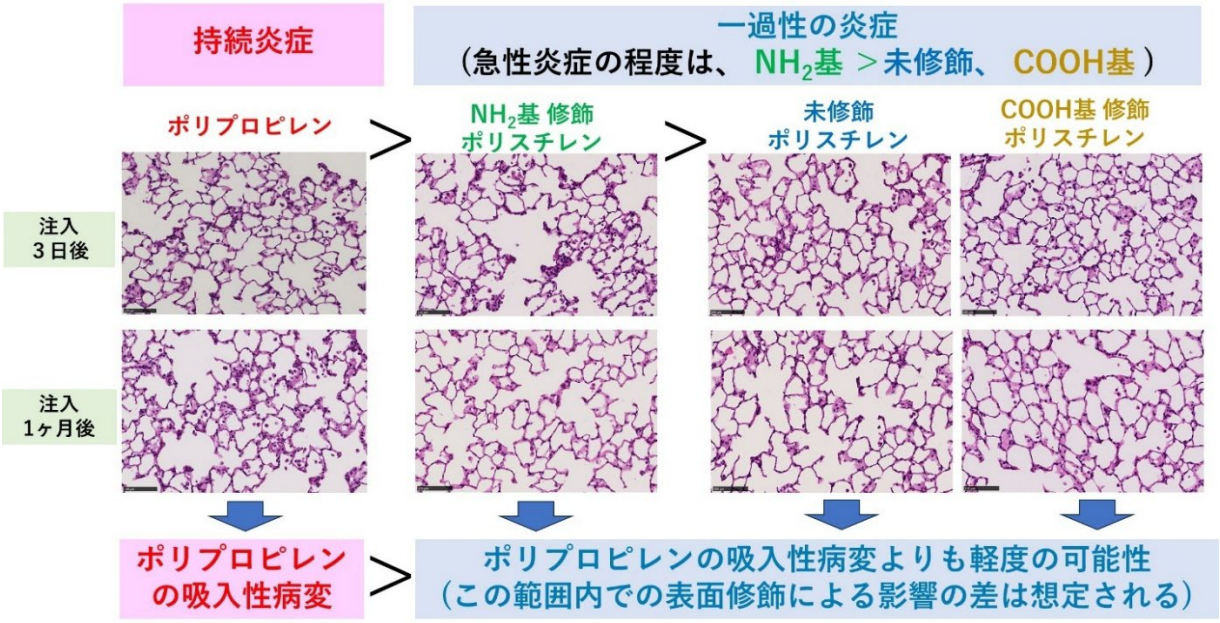


図６７． 4種のマイクロプラスチックの肺障害性ランキングと吸入性病変の予測

マイクロプラスチックの肺障害性に関与する物理化学的特性の関係性 （成果１１、１６）

本研究では、ポリプロピレンの気管内注入試験、3種の表面官能基の異なるポリスチレンの気管内注入試験の計4種の気管内注入試験を実施した。これらの気管内注入試験の結果を比較すると、ポリプロピレン＞NH_2基修飾ポリスチレン＞COOH基修飾のポリスチレンと未修飾ポリスチレンの順で肺障害性が認められた。マイクロプラスチックの物理化学的特性と肺障害性の関係性について、本研究課題の結果や既往の報告から検討を行った。

まず、気管内注入試験を実施した4種のマイクロプラスチックの肺障害性(肺炎症)の比較として、気管支肺胞洗浄液中の好中球数と肺病理組織標本の比較結果を示す(図６８、図６９)。この結果から、前述の通り、肺障害のランキングは、ポリプロピレン＞NH_2基修飾ポリスチレン＞非修飾ポリスチレン・COOH基修飾ポリスチレンであった。次に、気管内注入試験を実施したポリプロピレン、ポリスチレンの物理化学的特性のまとめた結果を示す(表８)。肺障害性のランキングと物理化学的特性の比較から、本研究課題では、ポリプロピレンがポリスチレンよりも肺障害性が高いという結果であった。既往の研究では、種類の異なるマイクロプラスチックのマウスへの気管内注入試験において、ポリプロピレンよりもポリスチレンのほうが肺炎症を誘発した報告もあり(Kwabena Danso et al., 2024, Danso, Woo and Lee, 2022)、本研究課題とは異なる報告も存在する。このため、マイクロプラスチックの種類だけが肺障害を規定する要因ではないと考えられ、マイクロプラスチックの種類だけで、ポリプロピレンは障害性が強いとは必ずしも断定できない。

前述の通り、表面官能基の異なるポリスチレンの比較の結果から、表面官能基の差は大きくないことが考えられた。本研究課題のポリスチレンは、同じメーカーの同じサイズのポリスチレン標準ラテックス粒子を用いた解析であり、純粋にポリスチレンの表面に官能基修飾を加えたものであることから、表面官能基の違いを評価することが可能であった。一方で、電子顕微鏡の観察上、ポリスチレンの表面性状は、NH_2で粗い傾向であった。これは、表面が官能基修飾された影響や、表面が修飾されたことにより、表面の電荷が変化し、分散液などの界面活性剤が影響を与えた可能性も考えられる。形状という観点でみると、ポリプロピレンの形状はさらに破片状であることを考慮すると、肺障害のランキングは、形状の違いと一致することから、形状が肺障害に影響を与える要因の一つである可能性が考えられる。

他方、他の報告では、マイクロプラスチックのサイズがナノサイズになると細胞傷害性が強くなることが報告されている(Shi et al., 2022)。本研究課題のポリプロピレンの粒径分布をみると、ナノサイズのポリプロピレンも存在している。今回、4つのマイクロプラスチックは単一の種類や形状ではないことから、サイズのみの単純比較はできていないが、ポリプロピレンにナノサイズも含まれていたことを考慮すると、サイズによる影響もあるかもしれない。

本研究課題では、ポリプロピレンは、製造段階で添加剤は使用されておらず、FT-IR上もポリプロピレンのスペクトルに一致しないピークは確認されていないことから、ポリプロピレンで特別に表面に他の化学物質等が付着していた可能性は低いと考えられる。

以上より、本研究課題の結果とこれまでの他の報告を考慮すると、マイクロプラスチックの物理化学的特性と肺障害の関係性について、形状やサイズが障害性に影響を与える可能性が示唆された。本研究課題では、4種のマイクロプラスチックの気管内注入試験の結果から得られた知見であり、物理化学的特性の影響を調べていく上では、今後も、様々な物理化学的特性や条件で、データを蓄積することが重要である。そのうえでは、本研究課題は、今後のマイクロプラスチックの生体影響研究を進めていくうえで、重要な知見であると考える。

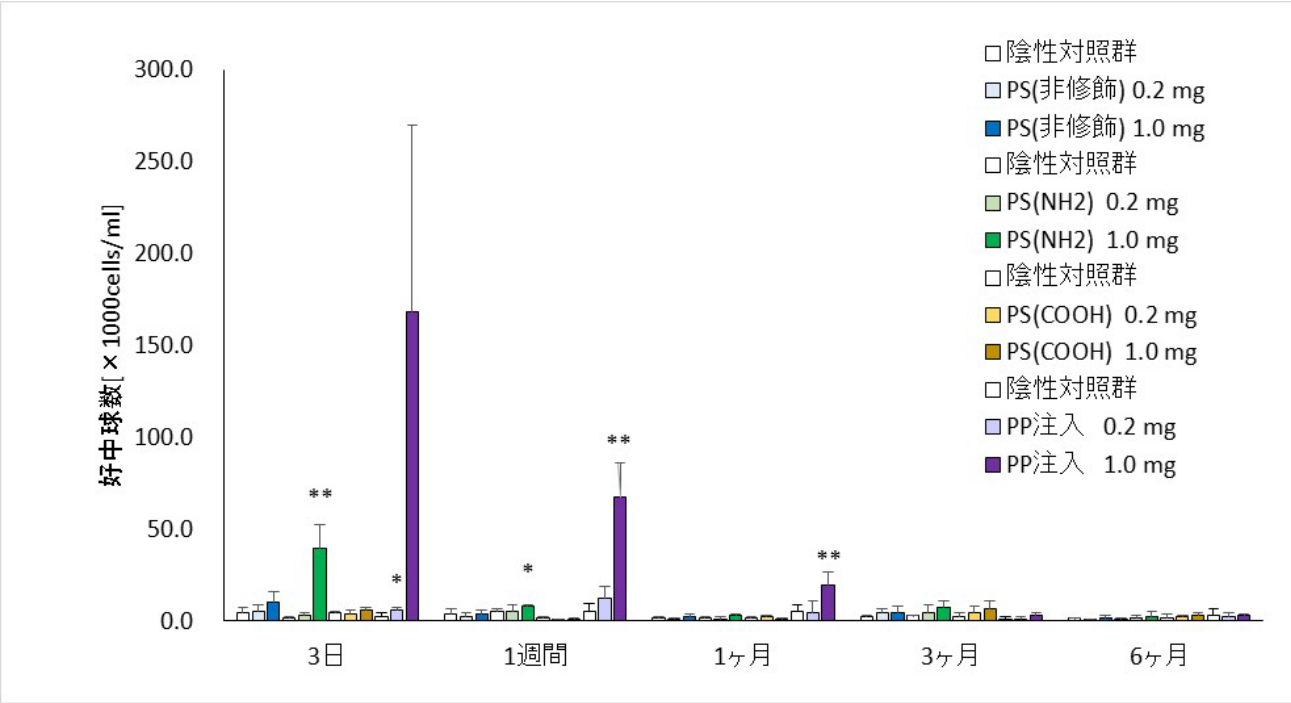


図６８．4種のマイクロプラスチック気管内注入試験後の
気管支肺胞洗浄液中の好中球数(炎症細胞数)

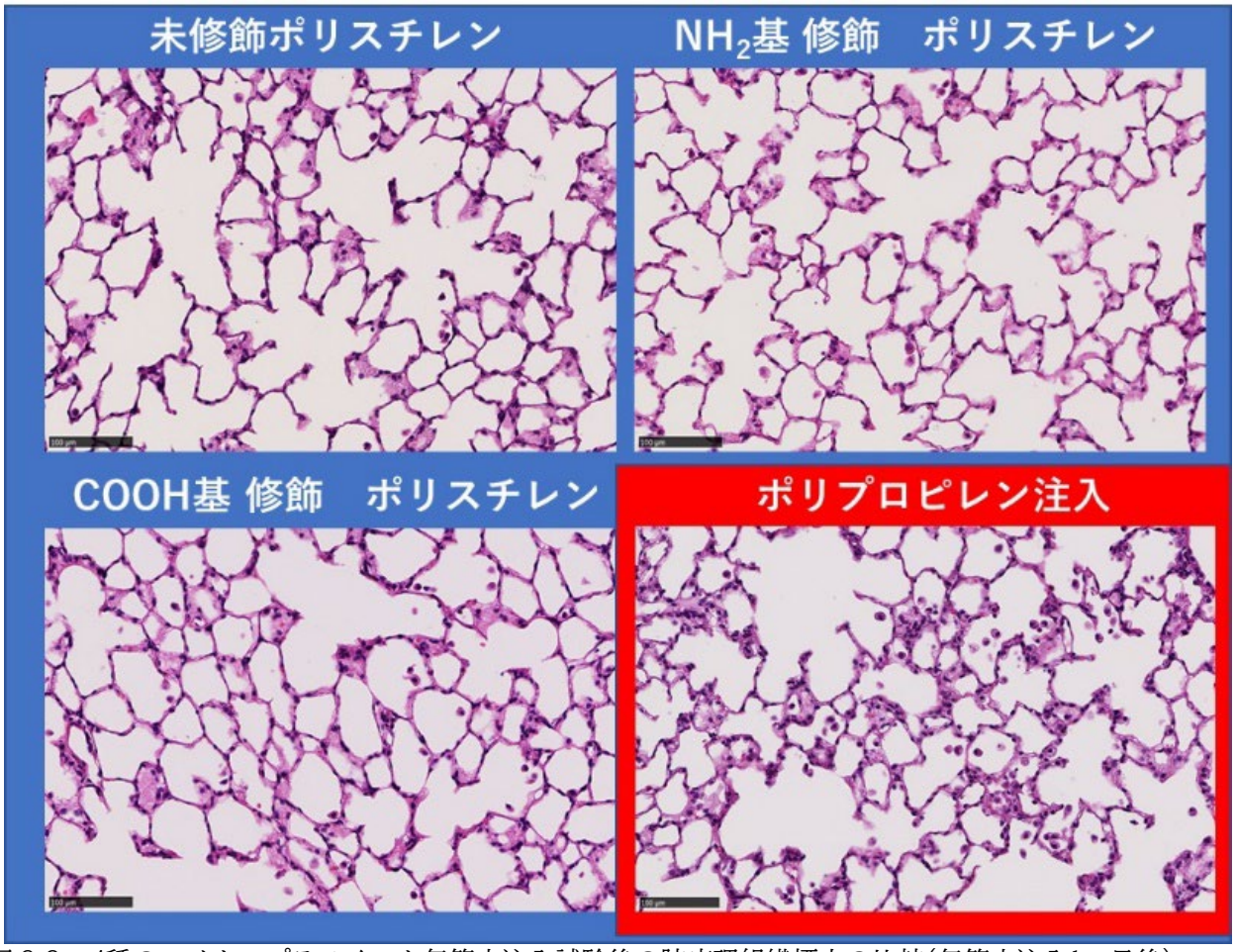
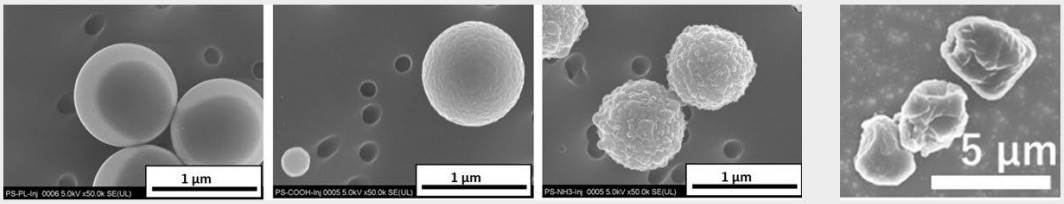


図６９．4種のマイクロプラスチック気管内注入試験後の肺病理組織標本の比較(気管内注入1ヶ月後)

表８．4種のマイクロプラスチックの物理化学的特性のまとめ

	PS-非修飾	PS-COOH	PS-NH_2	ポリプロピレン(PP)
肺障害性(有害性)	ー	ー	±	＋
溶媒	0.0025% Tween20	0.0025% Tween20	0.0025% SDS	0.1%Tween
表面修飾	ー	COOH基	NH_2基	ー
表面電荷	-0.36～-0.55	-5.56～3.09	-0.88～2.61	-0.72
形状	球状	球状	球状(凹凸あり)	破片状
粒径分布	1 µm	1 µm	1 µm	100 nm～4 µm



参考文献

- Kwabena Danso, I. et al. (2024) 'Pulmonary toxicity assessment of polypropylene, polystyrene, and polyethylene microplastic fragments in mice', Toxicological Research, 40(2), pp. 313-323. doi: 10.1007/s43188-023-00224-x.
- Danso, I. K., Woo, J.-H. and Lee, K. (2022) 'Pulmonary Toxicity of Polystyrene, Polypropylene, and Polyvinyl Chloride Microplastics in Mice', *Molecules*, 27(22), p. 7926. doi: 10.3390/molecules27227926.
- Shi, X. *et al.* (2022) 'Cytotoxicity and Genotoxicity of Polystyrene Micro- and Nanoplastics with Different Size and Surface Modification in A549 Cells', *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, pp. 4509-4523. doi: 10.2147/IJN.S381776.

マイクロプラスチックの肺有害性スクリーニング構築への応用の可能性　（成果１２）

本研究課題では、ポリプロピレンの吸入ばく露試験と気管内注入試験において、ばく露肺組織を用いた網羅的遺伝子解析遺伝子解析を実施した。これらの結果から、吸入によるばく露で発現が上昇する遺伝子がいくつか検出された。ポリプロピレンと表面官能基の異なるポリスチレンを用いた気管内注入試験の3日後のばく露肺組織を用いて、これらの遺伝子に対するRT-qPCRを実施した結果を、図７０－７３に示す。この結果、前述の肺障害性のランキングと同様の発現上昇の傾向が認められた。また、これらの発現遺伝子の肺障害性のスクリーニング指標としての有用性を検討するために、ROC曲線を用いた判別分析を実施した。判別分析では、曲線下面積が0.8以上で正確性の高い指標とされている。4種のマイクロプラスチックの気管内注入試験における遺伝子発現データを用いて、モデル１(PP低用量とPP高用量を肺障害ありと仮定)(図７４)、モデル２(PP低用量、PP高用量、NH_2基修飾のポリスチレンを肺障害ありと仮定)(図７５)で判別分析を実施した。いずれの判別分析において、CXCL1、CXCL5/6、CD177、LCN2のいずれの指標も曲線下面積が0.9を超えており、正確性の高い指標である結果が得られた。つまり、これらの遺伝子は、マイクロプラスチックの肺障害性を反映する指標と考えられ、将来的なマイクロプラスチックの肺障害のスクリーニングや評価指標としての有用性も期待できると考えられる。

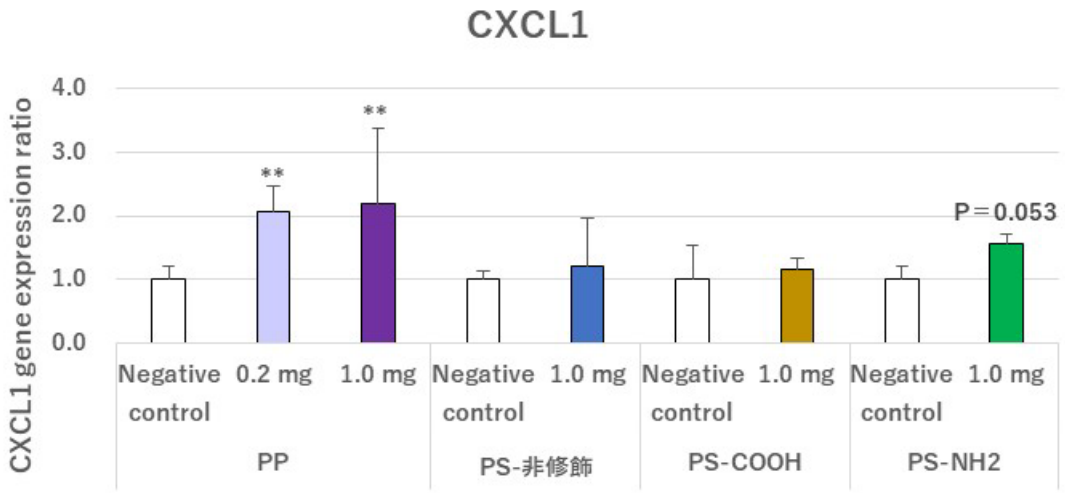


図７０．4種のマイクロプラスチックの肺組織中の遺伝子発現の比較(CXCL1)（気管内注入3日後）

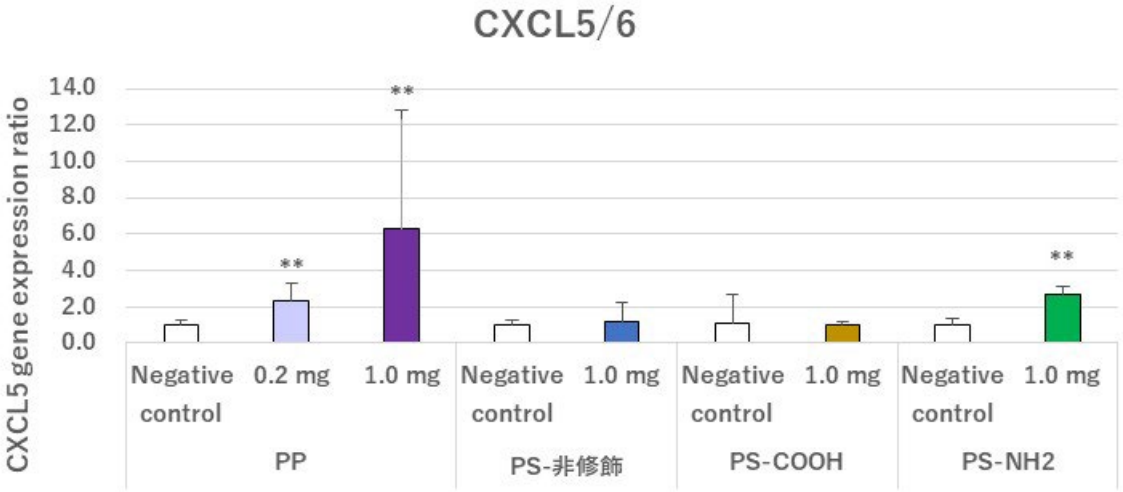


図７１．4種のマイクロプラスチックの肺組織中の遺伝子発現の比較(CXCL5/6)(気管内注入3日後)

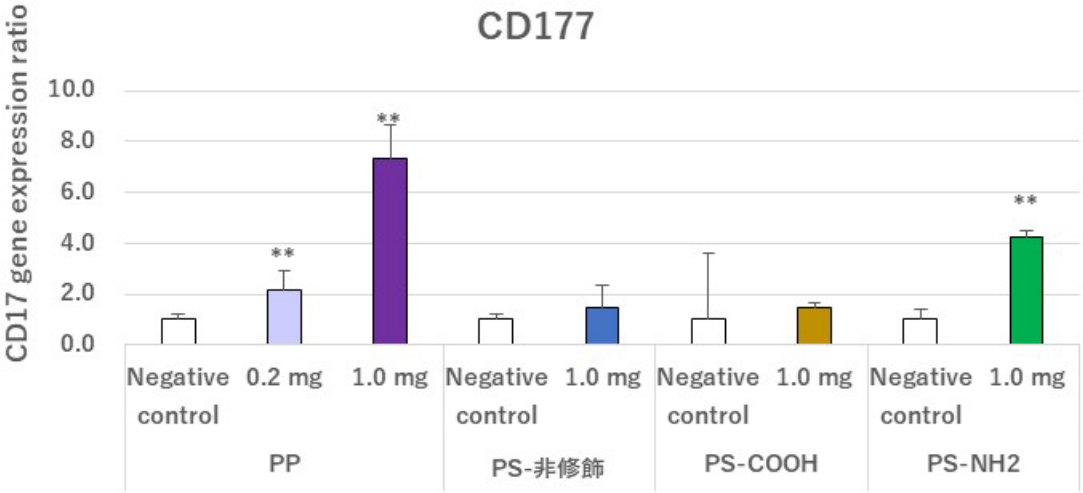


図７２．4種のマイクロプラスチックの肺組織中の遺伝子発現の比較(CD177)（気管内注入3日後）

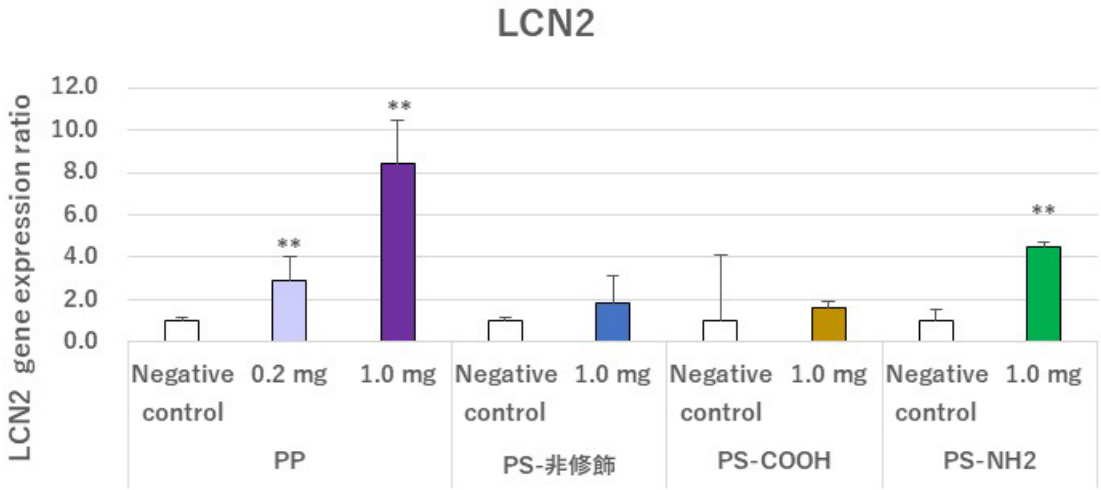
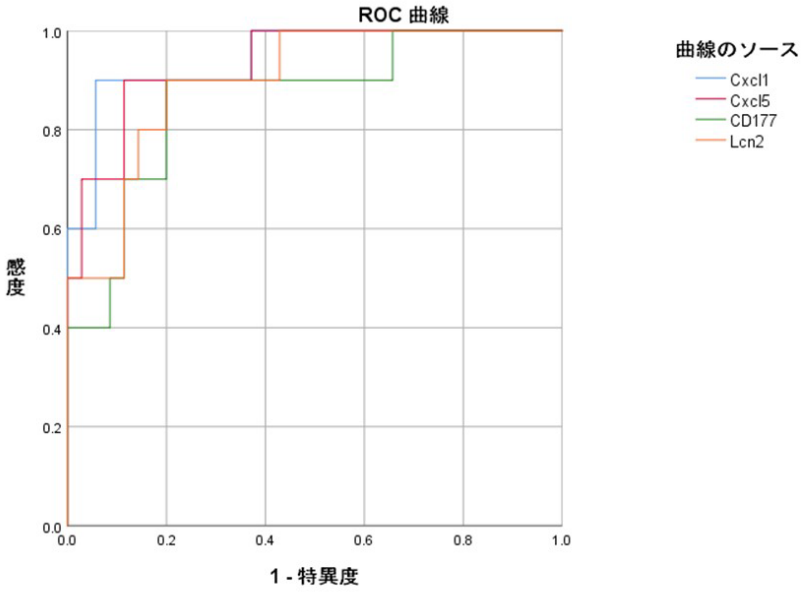
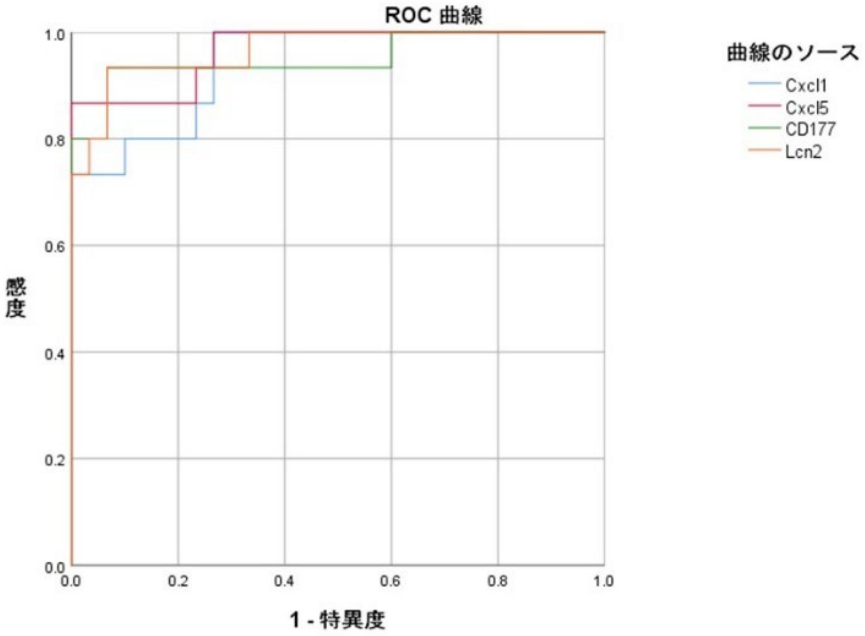


図７３．4種のマイクロプラスチックの肺組織中の遺伝子発現の比較(LCN2)（気管内注入3日後）



遺伝子名	曲線下面積	標準誤差[a]	漸近有意確率	漸近 95% 信頼区間 下限	上限
Cxcl1	0.946	0.039	<0.001	0.869	1
Cxcl5	0.934	0.041	<0.001	0.853	1
CD177	0.863	0.068	0.001	0.73	0.996
Lcn2	0.9	0.051	<0.001	0.801	0.999

図７４．モデル1：PP低用量とPP高用量を肺障害ありと設定したROC曲線



遺伝子名	曲線下面積	標準誤差[a]	漸近有意確率	漸近 95% 信頼区間 下限	上限
Cxcl1	0.942	0.033	<0.001	0.877	1
Cxcl5	0.967	0.025	<0.001	0.917	1
CD177	0.951	0.04	<0.001	0.872	1
Lcn2	0.967	0.025	<0.001	0.917	1

図７５．モデル2：PP低用量、PP高用量、NH_2基修飾PSを肺障害ありと設定したROC曲線

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＞

本研究課題のポリプロピレンの吸入ばく露試験に関する成果は、世界で初めてポリプロピレンの急性影響の最小毒性量を示したものであり、これは、将来的に環境目標値等の策定の際に、重要なエビデンスとなり、先導性の高い成果である。マイクロプラスチックの吸入ばく露による肺への影響は、世界的にみてもほとんど報告がなく、新規性が非常に高い。また、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験の実施基盤の構築ができたことから、長期の吸入ばく露試験の実施の実現可能性が多いに高まる成果であり、発展性がある。

また、表面官能基の異なるポリスチレンの肺への影響に関する成果について、既往の多くの研究では、肺炎症のメカニズムに着目した研究が多い一方で、どの程度の有害性(肺障害性)を有するのかという観点の報告はなかった。我々は、ポリスチレンの表面官能基が変化することによる肺への影響は限定的であり、肺障害性は高くないことを明らかにした。この成果は、今後のマイクロプラスチックの肺への影響を評価していく上で、表面官能基という要因だけでみれば、肺に与える影響は小さいことを示唆する成果であり、マイクロプラスチックの肺障害性の一端の解明につながる成果であり、重要な知見となると考える。

さらに、本研究課題では、すべてのマイクロプラスチックを吸入ばく露試験で評価することは設備的にも技術的にも困難である。従って、本研究課題では、マイクロプラスチックの吸入ばく露試験と気管内注入試験の両方を実施し、その相互関係を基に気管内注入試験の結果から吸入ばく露病変レベルを推測することが可能となった。地域や季節による異なるマイクロプラスチックのそのサンプリングができ、気管内注入試験を実施すると吸入ばく露病変レベルを推測ができると考える。つまり、多様性のあるマイクロプラスチックの生体影響を、吸入ばく露試験を行うことなく、吸入ばく露病変レベルを推測できることから、これは革新的研究と考える。さらに、将来的に、様々な物理化学的特性のマイクロプラスチックのスクリーニング手法の構築につながる成果であることから、非常に発展性の高い成果であると考える。これらの成果を踏まえ、マイクロプラスチックを吸入することによる肺への影響を評価する研究が進む先導性の高い研究課題であると自負している。

＜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＞
貢献の見通しについては、大気中のマイクロプラスチックがPM2.5の枠組みとは別の規制が必要なのか、環境目標値等の設定が必要となるのか、行政推進課題として、環境省とコミュニケーションや意見交換を行いながら、研究を進めている。前述の通り、環境目標値等の設定が必要となれば、本研究課題の吸入ばく露試験による成果は、十分に貢献するものである。また、気管内注入試験の結果から吸入ばく露による影響を推測する手法については、様々な物理化学的特性のマイクロプラスチックを効率的に調べていく手法として期待ができ、本研究の成果は、この手法の実現可能性を高める成果であると考える。このように、本研究課題を歯切りに、大気中のマイクロプラスチックの有害性スクリーニングの構築にも寄与できると考える。
また、マイクロプラスチックの吸入による影響については、厚生労働省　化学物質対策課からも興味を持たれたことから、すでに論文が掲載されている成果１、成果２に関する情報提供をおこなった。このように、マイクロプラスチックに関する研究は、環境行政、厚生労働行政それぞれに共通して関わってくるものであり、本研究課題により、マイクロプラスチックを吸入することによる生体影響を社会に示していくことは、大いに社会への貢献につながると考えている。

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＞・・・・・　　１．目標を大きく上回る成果をあげた

＜サブテーマ１達成状況の自己評価＞・・・・・・・　１．目標を大きく上回る成果をあげた

本研究課題の全体およびサブテーマ１の目標の達成状況について、以下の５つの点を達成したことから、当初の目標は達成している。①ポリプロピレンの吸入ばく露試験の結果から、急性ばく露の最小毒性量を見いだすことができたこと(成果１)、②表面官能基の違いが与える肺障害への影響は大きくないこと(成果２)、③ポリプロピレンを基準として、吸入ばく露試験と気管内注入試験を実施し、気管内注入試験と吸入ばく露試験の肺障害の整合性・相同性を明らかにしたこと(成果９)、④気管内注入試験の結果から、吸入による影響の推測が可能であったこと(成果１０)、⑤4種の気管内注入試験の結果から、マイクロプラスチックの肺障害に関与する物理化学的特性として、形状やサイズが関連する可能性が考えられたこと(成果１１)。
さらに、本研究課題の目標以上の成果として、①長期の吸入ばく露試験の実施基盤を構築したこと(政策決定者向けサマリー提案２)、②多様なマイクロプラスチックの有害性評価に資する気管内注入スクリーニング試験の基盤構築につながる成果(成果９、政策決定者向けサマリー提案３)、③マイクロプラスチックの肺障害に関与する遺伝子変化を見いだし、肺障害のスクリーニング・評価指標としての有用性を見いだした成果が挙げられる(未発表、政策決定者向けサマリー提案３)。短期間の吸入ばく露試験が実施できたことは、長期吸入ばく露試験の実施基盤、実現可能性に大きく貢献した成果である。また、マイクロプラスチックの肺障害性を評価、スクリーニングする手法を構築することは、多種多様なマイクロプラスチックの肺障害性を調べていく上で、重要な課題であると考え、本研究課題は、これらの今後の課題解決につながる成果であると自負している。以上より、当初の目標は達成できており、さらに、今後の吸入することによるマイクロプラスチックの生体影響研究に貢献できる基礎的な研究成果の提供、そして、発展性に富んだ成果が見いだせたことから、上記の自己評価に至った。

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	2

査読無し論文	0
著書	0
「国民との科学・技術対話」の実施	2
口頭発表・ポスター発表	9
マスコミ等への公表・報道等	0
成果による受賞	1
その他の成果発表	2

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	Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2024) Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Part Fibre Toxicol. 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.
2	Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, et al (2025) Comparison of lung disorders following intratracheal instillation of polystyrene microplastics with different surface functional groups. J Occup Health. 7;67(1):uiaf006. doi: 10.1093/joccuh/uiaf006.
4	ラットを用いたポリプロピレン微粒子の肺障害性の評価 (2023)(第64回大気環境学会年会)
7	マイクロプラスチックの表面官能基の違いによる肺障害性の評価 (2024)(第41回エアロゾル科学・技術研究討論会)
8	ラットへの吸入ばく露試験によるポリプロピレン微粒子の肺障害性の評価 (2024)(第65回大気環境学会年会)
9	Comparison of lung disorder by microplastic between short-term inhalation exposure to and intratracheal instillation of polypropylene in rats (2024)(国際シンポジウム(産業医科大学))
１０	マイクロプラスチックによる肺障害 (2025)(第98回日本産業衛生学会)
１１	Comparison of oxidative stress among 4 microplastics with different physicochemical properties in rats (2025)(第32回韓日中産業安全保健学術会議)
１５	日本産業衛生学会　第10回若手論文賞(2025) Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics.
１６	韓国カソリック大学産業保健大学院との定期交流会(2024) Lung disorders caused by inhaled microplastics: domestic and overseas findings and our research reports

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２件行った。大気環境学会近畿支部人体影響部会2022年度セミナーでは、大気環境学会の会員だけでなく、一般の方の参加可能なセミナーでの口演を行い、マイクロプラスチックの肺への影響を調べる必要があることを示した。また、福岡県北九州市で毎年開催される西日本最大級の環境イベントであるエコライフステージ２０２４への出展(オンライン)をおこなった。内容としては、マイクロプラスチックを吸い込むことによる影響を正しく伝え、プラスチックの３Ｒ(リサイクル、リディース、リユース)の推進による、プラスチック破棄によるマイクロプラスチックの発生を防ぐことを伝える活動をおこなった。まずは、我々の成果をできることから社会に示すことで、社会貢献につながる活動を実施した。

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。

＜相手機関・国・地域名＞

機関名（正式名称）	（本部所在地等の）国・地域名

注：国・地域名は公的な表記に準じます。

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）
友永泰介	研究代表者及びサブテーマ１リーダー 産業医科大学　医学部医学科卒業 博士（医学） 産業医科大学大学 産業生態科学研究所　呼吸病態学 助教を経て、 現在、産業医科大学　産業生態科学研究所　呼吸病態学　学内講師 専門は吸入性化学物質の有害性評価、呼吸病態生理学 ＜委員会＞ 日本産業衛生学会　許容濃度委員会　粉じん小委員会　委員 文京区立さしがや保育園アスベスト健康対策等専門委員会　委員 有害大気汚染物質健康リスク評価等に関する検討会　委員 ＜受賞歴＞ 2017年　第35回産業医科大学学会　学会長賞　受賞 2021年　第39回産業医科大学学会　若手優秀演題賞　受賞 2023年　第3回大久保産業保健奨励賞　受賞 2025年　日本産業衛生学会　第10回若手論文賞　受賞

	2025年　日本産業衛生学会　優秀査読者賞　受賞 2025年　第43回産業医科大学学会　特別ポスター賞　受賞

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	2024	Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, Nishida C, Kawai N, Sato K, Morimoto T, Higashi Y, Yatera K, Morimoto Y. Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Particle and Fibre Toxicology. 2024 Aug 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.	1	有
2	2024	Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, Nishida C, Sato K, Nakamura Y, Morimoto T, Higashi Y, Kojima T, Sakurai K, Yatera K, Morimoto Y. Comparison of lung disorders following intratracheal instillation of polystyrene microplastics with different surface functional groups. Journal of Occupational Health. 2025 Jan 7;67(1):uiaf006. doi: 10.1093/joccuh/uiaf006.	1	有

（３）　著書

＜著書＞

特に記載する事項はない。

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ

（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
3	2023	マイクロプラスチックの表面官能基の違いによる肺炎症の比較 (第40回エアロゾル科学・技術研究討論会)	1	無
4	2023	ラットを用いたポリプロピレン微粒子の肺障害性の評価 (第64回大気環境学会年会)	1	無
5	2023	マイクロプラスチックの健康影響に関する現状把	1	無

		握 (第41回産業医科大学学会)		
6	2024	Investigation of lung disorder by microplastic; Short-term inhalation exposure of polypropylene in rats (国際産業保健学会　ICOH2024)	1	無
7	2024	マイクロプラスチックの表面官能基の違いによる肺障害性の評価 (第41回エアロゾル科学・技術研究討論会)	1	無
8	2024	ラットへの吸入ばく露試験によるポリプロピレン微粒子の肺障害性の評価 (第65回大気環境学会年会)	1	無
9	2024	Comparison of lung disorder by microplastic between short-term inhalation exposure to and intratracheal instillation of polypropylene in rats (国際シンポジウム(産業医科大学))	1	無
１０	2025	マイクロプラスチックによる肺障害 (第98回日本産業衛生学会 シンポジスト)	1	無
１１	2025	Comparison of oxidative stress among 4 microplastics with different physicochemical properties in rats (第32回韓日中産業安全保健学術会議)	1	無
１２	2025	マイクロプラスチックの気管内注入試験による肺組織中の遺伝子発現解析	1	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	大気環境学会近畿支部人体影響部会2022年度セミナーでの口演 (2023年3月7日)	1
１４	2024	エコライフステージ２０２４での出展(2024年11月16日、17日)	1

（６）　マスメディア等への公表・報道等

特に記載する事項はない。

成果 番号	発表 年度	成果 情報	主たる サブテーマ

（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
１５	2025	日本産業衛生学会　第10回若手論文賞 Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to	1

		polypropylene microplastics.	

（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
１６	2024	韓国カソリック大学産業保健大学院との定期交流会 Lung disorders caused by inhaled microplastics: domestic and overseas findings and our research reports	1

権利表示・義務記載

本報告書に表示・記載された企業名・製品名等は、各社の商標又は登録商標である。
文献を明示している図表は、成果１または成果２に掲載されたデータに基づいて、作成している。

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 :	Evaluation of Lung Toxicity of Micro / Nano Plastics by Inhalation Exposure and Investigation of Lung Toxicity Caused by Different Surface Functional Groups
Project Number :	JPMEERF20221R04
Project Period (FY) :	2022-2024
Principal Investigator :	Tomonaga Taisuke
(PI ORCID) :	ORCID0000-0003-3583-3785
Principal Institution :	Department of Occupational Pneumology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan.
Cooperated by :	Kitakyushu City, Fukuoka, JAPAN
Keywords :	Tel: +81-93-691-7466

[Abstract]

Environmental pollution caused by microplastics has become a growing concern in recent years. Studies have reported the presence of microplastics in the air, and evidence suggests that they can accumulate in the lungs through inhalation, raising concerns about their potential biological effects. The primary reason for this concern is the high stability of plastic materials, which allows them to persist in the lungs for extended periods without being broken down by the body.

We investigated the potential effects of inhaling microplastics by conducting a four-week, short-term inhalation exposure study using polypropylene. In addition to that, we performed intratracheal instillations using polypropylene and three types of polystyrene with different surface functional groups (unmodified, carboxyl-modified, and amino-modified) to examine how surface modifications affect their impact on the lungs.

The study produced three main findings:

1. Feasibility of Inhalation Testing:

The inhalation exposure with polypropylene was shown to be technically feasible. The minimum toxic dose causing acute effects was determined to be 2 mg/m^3. This finding provides a solid foundation for conducting future long-term inhalation exposure studies.

2. Establishing a Screening Method:

Results from both methods using polypropylene were compared to assess whether intratracheal instillation could be used to predict the effects of inhalation exposure. While there were differences in the degree of inflammation observed, acute inflammatory responses were found in both cases. By identifying a pathological condition common to both methods, the study established a basis for using intratracheal instillation as a screening tool to evaluate the health risks of inhaling

microplastics.

3. Effects of Surface Modifications:

Intratracheal instillation using polystyrene with different surface functional groups revealed that all types caused only transient lung inflammation. The differences in surface modification had little effect on the severity of lung disorders. Compared to polypropylene, polystyrene-induced inflammation was milder, indicating that surface modifications do not significantly influence the extent of lung inflammation caused by polystyrene microplastics.

In conclusion, this research lays the groundwork for future long-term inhalation studies and introduces a promising method for screening microplastic-induced lung disorders. These are pioneering findings in advancing our understanding of the potential health risks associated with inhaling airborne microplastics.

[References]

Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, Nishida C, Kawai N, Sato K, Morimoto T, Higashi Y, Yatera K, Morimoto Y. Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation exposure to polypropylene microplastics. Particle and Fibre Toxicology. 2024 Aug 6;21(1):29. doi: 10.1186/s12989-024-00592-8.

Tomonaga T, Higashi H, Izumi H, Nishida C, Sato K, Nakamura Y, Morimoto T, Higashi Y, Kojima T, Sakurai K, Yatera K, Morimoto Y. Comparison of lung disorders following intratracheal instillation of polystyrene microplastics with different surface functional groups. Journal of Occupational Health. 2025 Jan 7;67(1):uiaf006. doi: 10.1093/joccuh/uiaf006.

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