

課題番号：1RF-2202

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

研究代表者名：宮川 一志（宇都宮大学）

体系的番号：JPMEERF20221R02

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）（主）

：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（副）

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

研究実施期間：2022年度～2024年度

【研究体制】

サブテーマ1

宮川 一志（宇都宮大学）

サブテーマ2

宮川 一志（宇都宮大学）

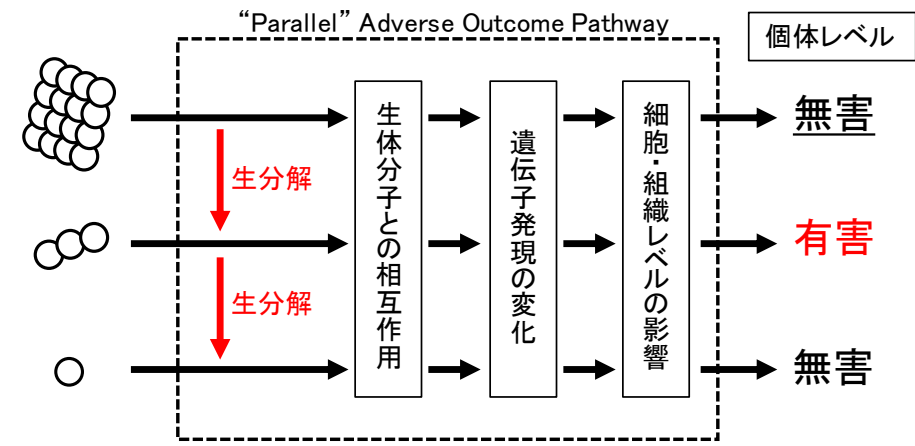
1. 研究背景、研究開発目的及び研究目標

【研究背景】

海洋プラスチック汚染問題に代表されるように、我々の生活と密接に関わる高分子材料が自然界に放出された際に環境にどのような影響を与えるかが昨今大きく注目されている。そのため近年では材料としての機能性に加え、自然環境下における速やかな分解が可能ないわゆる生分解性プラスチックが盛んに研究・開発されている。しかしながら、生分解性プラスチックの分解過程で生じる様々な分解産物が生物に与える影響はまだあまり理解されていない。またさらに、生物体内における高分子の振る舞いは完全にブラックボックスであり、たとえ生物試験で高分子分解産物の有害影響が示されたとしてもそれをどう材料設計にフィードバックするかは大きな課題である。

【研究開発目的】

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（Adverse Outcome Pathway解析）。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。



高分子とその分解産物のAdverse Outcome Pathway

1. 研究背景、研究開発目的及び研究目標

サブテーマ1 生体内における高分子の挙動の解析

【研究目標（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。

軸となる研究項目

生体内の時空間的分解過程の解析

- OP1 暴露試験データの取得
- OP2 分解産物混合物の分析手法の確立
- OP3 生体内の分解産物の時間変化データの取得
- (OP4 生体内の分解産物の局在データの取得)

高分子および分解産物暴露に応じた遺伝子発現変化の解析

- OP5 遺伝子発現プロファイルの取得
- OP6 パスウェイ解析の実行

派生的な研究項目

相互作用する生体分子の同定

OP1で強い毒性を示す分解産物が見つければ実行

- OP7 ドッキングシミュレーション
- OP8 結合を実験で証明
- OP9 結合構造を解明

代謝に関与する酵素の機能解析

OP6で候補の代謝経路が推定できた際に実行

- OP10 阻害薬剤の暴露で機能を証明
- OP11 遺伝子組換えで機能を証明

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

サブテーマおよび
目指すアウトプット（OP）

高分子の毒性評価試験法の確立

- OP12 高分子毒性マーカー遺伝子の確立
- (OP13 レポーターアッセイ系の確立)

材料設計・改変へのフィードバック

- OP14 生体内外の分解過程を統合したモデル構築
- OP15 学術変革領域とのコラボレーション

2. 研究目標の進捗状況

(1) 進捗状況に対する自己評価 (サブテーマ1)

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1の研究目標】

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。

【令和4年度研究計画】

- ・モデル高分子を選択し、オオミジンコを使用した生物試験で高分子及び分解産物の毒性データを取得する。
- ・生体内の高分子の振る舞いを理解するために、生体内から高分子を検出する手法を確立する。
- ・毒性が明らかとなった高分子分解産物について、そのメカニズムの解明のために遺伝子発現解析に着手する。

【令和5年度研究計画】

- ・遺伝子発現解析の結果から関与の疑われた遺伝子の機能推定・機能解析を行う。

【令和6年度研究計画】

- ・高分子分解産物の毒性発揮におけるAOPを構築する。

【自己評価】 計画以上の進展がある

2. 研究目標の進捗状況

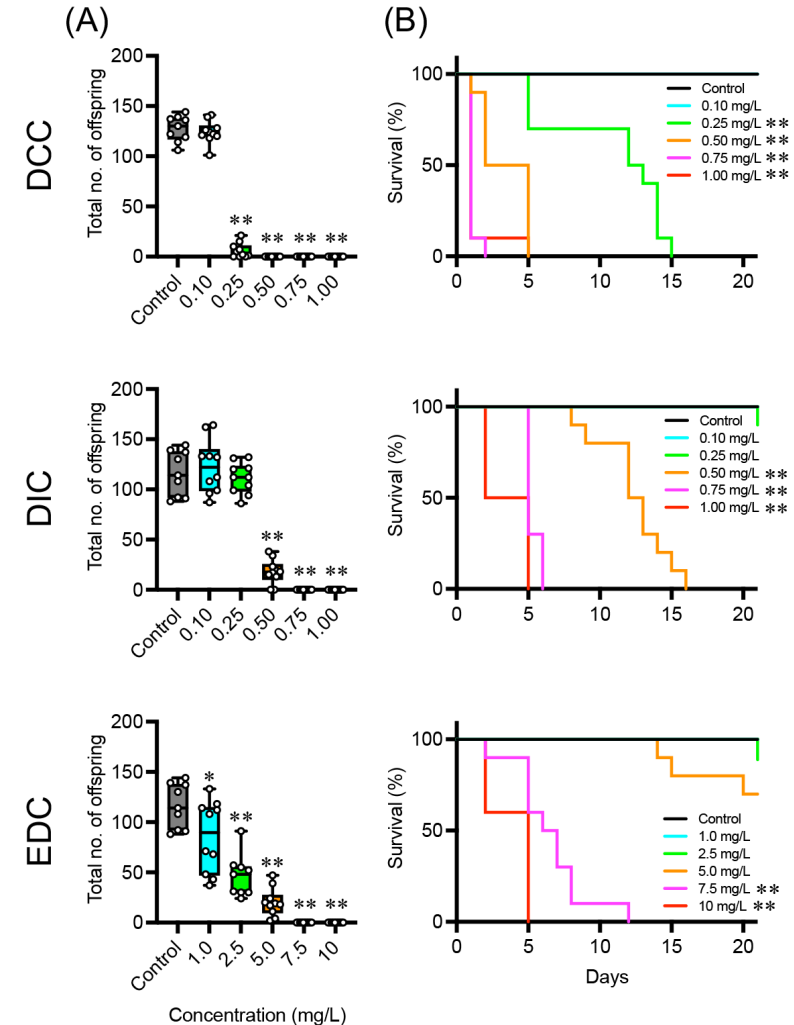
(2) 自己評価に対する具体的な理由・根拠と目標達成の見通し (サブテーマ1)

【具体的な理由・根拠】

代表者が専門としていない化学合成の実験などで研究協力者とうまく連携し、現在までの達成目標についてはほぼ達成できたと言える。特に暴露試験においては非常に順調に進めることができ、高分子であるポリカプロラクトンおよびPCLに添加されるカルボジイミドの毒性に関して得られた結果がすでに2報の査読つき論文として出版されている。生体内の高分子の検出については当初予定していたLC-MSによる検出が困難であることが実験を進めるに従い明らかになったが、代替手法として検討実施したMALDI-TOF-MSによるMSイメージングの結果が良好なものであった。

【目標達成の見通し】

現在データを待っているRNAシーケンスが順調に終われば、それに関連したサブテーマ1の残りの達成目標は概ね完了できると思われる。したがって、これらの結果を踏まえたサブテーマ2を予定通りスタートできると期待される。



カルボジイミドの毒性

Matsumoto et al. 2023, J Appl Toxicol

2. 研究目標の進捗状況

(1) 進捗状況に対する自己評価 (サブテーマ2)

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2の研究目標】

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。

【令和4年度研究計画】

サブテーマ2はサブテーマ1の結果をもとに行われるものであるため、令和4年度は研究を開始せずサブテーマ1に注力する。

【令和5年度研究計画】

- ・サブテーマ1の遺伝子発現解析結果をもとに、毒性評価のマーカー遺伝子を確立する。
- ・既知の転写調節システムの活性化が示唆された場合、それを検出するレポーターアッセイ系を確立する。

【令和6年度研究計画】

- ・結果を元に毒性の少ない改変分子を設計する。
- ・環境中における高分子の分解・蓄積モデルを構築する。

【自己評価】 計画通り進展している

2. 研究目標の進捗状況

(2) 自己評価に対する具体的な理由・根拠と目標達成の見通し (サブテーマ2)

【具体的な理由・根拠】

サブテーマ2はサブテーマ1の結果を踏まえて行うものであり、遺伝子発現解析が終了した令和5年度の8-9月ごろから開始する予定としている。サブテーマ1の毒性試験で意義のある高分子分解産物が見出せていなかったり、遺伝子発現解析に着手できていなかった場合はサブテーマ2を開始する目処が立てられないところであるが、本研究においてはサブテーマ1が順調に進行しているため、本年8月ごろよりサブテーマ2を予定通り開始し、目標を達成していけると考えている。

【目標達成の見通し】

サブテーマ2の前提となるサブテーマ1が上記の通り順調に進行しているため、本年8月ごろよりサブテーマ2を予定通り開始し、目標を達成していけると考えている。

3. 研究成果のアウトカム（環境政策等への貢献）

【行政等が活用することが見込まれる成果】

本研究によって高分子およびその分解産物の毒性評価において以下に挙げる点を新たに考慮する必要があるが示された。

- ①高分子の分解に伴って変化する水への溶解性は生物毒性の有無に影響する
- ②高分子の分解によって生じたオリゴマーの生物毒性は末端構造で変化する可能性がある
- ③不溶性物質の暴露試験では攪拌機（ローテーター）の使用が推奨される場合もある
- ④不溶性の粒子の生物毒性にはその粒子のサイズや形状が大きく影響する可能性があり、現在主流である均一な市販ビーズを用いた試験では正確な毒性を評価できない
- ⑤高分子の毒性を評価する際に、添加されている低分子が分解に伴い流出し生物に影響を与える可能性を考える必要がある

これらはいずれも具体的な実験データから示唆されたものであり、今後の高分子の毒性評価基準を策定する際に組み込むべき視点であると考えられる。特に⑤は、現在高分子の添加剤が生物に与える影響が世界的に注目されている時代背景とも合致しており（Tian et al., 2021）、添加物の流出量測定的重要性を強く提案するものである。

【行政等が既に活用した成果】

特に記載すべき事項はない。

4. 研究成果の発表状況

【誌上発表（査読あり）：2件（+予定1件）】

- 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. Biomacromolecules, 24(6):2721-2729, doi:10.1021/acs.biomac.3c00160. (IF: 6.2)
- 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, *Daphnia magna*: Carbodiimide additives have acute and chronic toxicity. Journal of Applied Toxicology, in press, doi:10.1002/jat.4516. (IF: 3.3)
- 3) 【予定】Miyakawa H, Iguchi T (2023) Establishment of a testing system for juvenoids that disturbs the sex determination system of *Daphnia*, based on a molecular interaction of ligands and the JH receptor. Current Opinion in Toxicology, revision submitted. (IF: 4.6)

【口頭発表：2件】

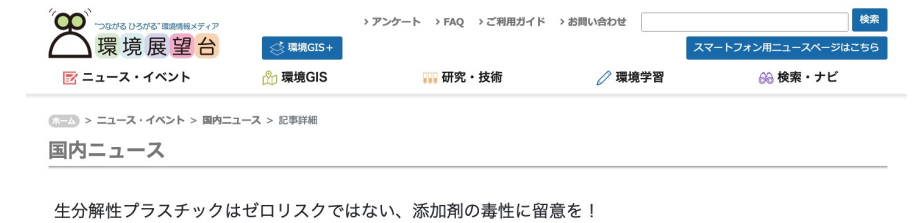
- 1)宮川一志「ミジンコを用いた化学物質の生物影響の作用機序の解明」 第12回 CSJ化学フェスタ 特別企画：高分子の分解を多方面・他分野から考える（シンポジウム） 2022年10月18日
- 2)宮川一志「オオミジンコを用いたPCL分解産物の生物影響の解析」 海洋プラスチックごみ学術シンポジウム（研究セッション） セッションC：生物・生態系影響 2023年3月5日

【知的財産権：0件】

特に記載すべき事項はない。

【国民との科学・技術対話：4件】

- 1) 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）
- 2) 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）
- 3) 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）
- 4) 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）



発表日：2023.07.20

宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターを中心とする研究グループは、生分解性プラスチックの環境リスクを指摘した。生分解性プラスチックとは、微生物の働きなどによって最終的に水・CO₂に完全分解するプラスチックのこと。最終処分（埋立）量の削減はもとより、非石化由来プラスチック（例：バイオマスプラスチック）とともに循環型社会の形成に貢献すると見られている。生分解性プラスチックのなかには、ポリカプロラクトン（PCL）をはじめ、有機酸などから化学的に合成されたものも多い。PCLは融点比較的低く、熱可塑性のフィルムとして広く普及している。上市に当たっては、機能性はもちろん、環境安全性の評価が行われている（例：グリーンプラ識別表示制度）。しかし、使用済みのPCL等が最終分解に至るまでの過程については、制度設計や実験把握は殆ど行われていなかった。本研究は、そのような生分解性プラスチックの盲点を衝くものとなっている。環境安全性テストのガイドラインにない、実験条件下におけるPCLおよび添加剤のミジンコ類におよぼす影響を精査した。その結果、未分解で重合度・分子量が大きなPCLポリマーはミジンコの消化管に詰まり生存率を低下させることを見出した。この傾向は、分解が進んだオリゴマーやモノマーでは見られなかったという。一方、耐久性の向上を狙い、生分解を損なわない範囲内でPCLに添加される「カルボジイミド化合物」は、0.1～1 mg/Lの濃度で殆どのミジンコを死滅させるレベルの比較強い毒性を有することが判明した。生分解性プラスチックの安全性を評価する際、今後は添加剤の毒性や分解時の流出量を綿密に調べる必要がある、と結んでいる（掲載誌：Journal of Applied Toxicology）。

誌上発表 2) に関するWebメディアの報道

5. 研究の効率性

本研究は生物を飼育する暴露実験、遺伝子発現解析などの分子生物学実験、質量分析装置を用いた化学分析実験、実験に用いる様々な高分子を準備するための化学合成実験、将来的な数理モデリングなど、極めて多岐にわたる実験を計画している。これらの実験を代表者の研究室のみで行うことは現実的に困難であり、またそれぞれに必要な実験装置を準備する予算も全く足りない。また、多くの実験を計画していることにより、いずれもが中途半端な進行となり、結果としてどの研究も論文化できるレベルまで至らないというケースも考えうる。このような事態を避け有用な成果を得るべく、本研究では以下の工夫をしている。

【研究体制】

代表者が参画している学術変革領域B「高分子精密分解」と密に連携し、個々の実験に関して設備とノウハウを共有しながら研究を遂行した。具体的には、代表者はこれまでの経験からの強みである実際に生物個体を用いた実験や分子生物学実験は代表者の研究機関で行い、化学合成などはこの分野に強みのある協力研究者の研究機関で行なった。

【課題管理】

着実に成果が出せるように、まずは行政ニーズ（2-1）の目標である高分子分解産物の毒性の解明を最優先課題として進めた。その結果、中間審査の段階で2報の査読つき論文を出版することができた。またLC-MSによる高分子の検出など当初予定していたが実現が困難であることが示唆された研究に対しては、MALDI-TOF-MSを使用するなど代替策で迅速に対応し良好な結果が得られている。

【研究資金の運用】

大学共通機器や協力研究者の所持している機器を活用することで、貴重な研究資金をなるべく高額な機器の購入に割かないように工夫をした。