

研究課題番号	1-1908
研究課題名	「研究用マイクロプラスチックの調整と Bio-MEMS 技術による免疫学的検証」
研究実施期間	令和元年度～令和3年度
研究機関名	熊本大学
研究代表者名	中西 義孝

## 1. 研究開発目的

本研究は3つの実施項目で構成される。

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

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

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

## 2. 研究目標

節足動物2種以上、魚類1種以上、ほ乳類1種以上の生体に、材質4種以上と幾何学的パラメータ（粒子径、アスペクト比、ポーラス比）を調整した研究用マイクロプラスチックを曝露する。どのような幾何学的パラメータのMPが生体組織に移行・蓄積し、どのような組織学的な影響を及ぼすかを明らかにする（実施項目1）。

マイクロプラスチックが免疫に与える影響をヒト末梢血由来単球マクロファージにより明らかにする。生体内へ移行・蓄積されたMPとHMDMの環境を生体内に近づけるため、バイオ微小電気機械システム（Bio-MEMS: Micro Electro Mechanical Systems）技術を取り入れた試験培養環境を開発・運用する。ヒト免疫に影響を与えるマイクロプラスチックの素材、幾何学的パラメータおよび濃度を明らかにする（実施項目2）。

ポリスチレン（PS）、ポリエチレン（PE）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリプロピレン（PP）のような利用量の多いプラスチック4種以上の素材に対して、研究用マイクロプラスチックとして調整・生産したものを実施項目1～2に活用できる体制を整える（実施項目3）。

### 3. 研究の進捗状況

研究計画書（最終版）に記載の内容を転記・調整し、自己評価を加筆した。

	令和元年度	令和2年度	令和3年度（最終年度）
<p>実施項目1： 生体組織への移行・蓄積とその影響の組織学的調査</p>	<p>[目標] 調整した極微細片を生体系に近似した環境で魚類・マウス等の脊椎動物ならびに節足動物に曝露する。曝露システムは物質循環に留意し構築する。</p> <p>[自己評価] 計画通り進展している。</p> <p>[具体的理由] 魚類1種・節足動物1種に対して急性曝露/長期曝露試験を実施。マウスに対しての飼育環境およびプロトコルの整備が完了。</p>	<p>[目標] 魚類・マウス等の脊椎動物ならびに節足動物に対してパラフィン・凍結組織切片の観察を試行する。</p> <p>[自己評価] 計画通り進展している。</p> <p>[具体的理由] 現段階で、凍結組織切片の観察準備も進んでいる。</p>	<p>[目標] 節足動物2種以上、魚類1種以上、ほ乳類1種以上の生体で組織学的観察。 ヒト免疫に影響を与えるマイクロプラスチックの素材、幾何学的パラメータおよび濃度を明らかにする 4種以上の素材に対して、研究用マイクロプラスチックとして調整・生産できる体制を整える</p> <p>[達成の見通し] 計画通り進展すると予測できる。</p>
<p>実施項目2： マクロファージによる食食とその影響の免疫学的調査</p>	<p>[目標] 調整した極微細片を生体内に近似した環境でヒトマクロファージに暴露する。開発・運用するBio-MEMSシステムには、①培養雰囲気成分を定量的に制御できる培養システム、②微粒子をマクロファージ近傍にアプローチさせるシステム、③均質・定量的に微粒子をマクロファージにアプローチさせる培養液循環システム、の機能が含まれる。</p> <p>[自己評価] 計画以上の進展がある。</p> <p>[具体的理由]</p>	<p>[目標] 極微細片を取り込んだマクロファージの反応については、顕微鏡観察、LDHによる細胞毒性分析やELISAによる炎症性サイトカインの産生量、FACSによる受容体解析などの生化学的分析のほか、Bio-MEMS技術を応用したOnsite動態解析（形態変化挙動、遊走性、刺激応答性、機械的特性など）を行う。</p> <p>[自己評価]</p>	<p>[具体的理由] 実施項目1～3のすべてにおいて、令和元年度（初年度）は「計画通り進展している」以上の自己評価となっている。令和2年度においても、「計画通り進展している」状況であるため、最終年度においても達成の見通しがある。</p>

	<p>目標①～③を満たす Bio-MEMS デバイス (マイクロ流路デバイス) を提案済み。出力特性についての検証まで進んでいる。</p>	<p>計画通り進展している。</p> <p>[具体的理由]          現段階で、顕微鏡観察、LDH による細胞毒性分析やELISA による炎症性サイトカインの産生量について実施している。</p>	
<p>実施項目 3 :          マイクロプラスチックの調整</p>	<p>[目標]          プラスチック素材を疑似海洋環境下で極微細片化。極微細片の Structure について化学組成も含めて解析。曝露実験用スタンダード試料として利用。</p> <p>[自己評価]          計画通り進展している。</p> <p>[具体的理由]          MP 調整システムとしての進捗は早い。MP の化学的分析が弱い。</p>	<p>[目標]          曝露実験のスタンダード試料として利用 (実施項目 1～2 への活用)</p> <p>[自己評価]          計画通り進展している。</p> <p>[具体的理由]          現段階で、MP の幾何学パラメータの調整指針が得られているため。</p>	

#### 4. 環境政策への貢献(研究代表者による記述)

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

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

ヒトや生物に起こりうる影響の未来予測においては、低環境負荷・高効率でありながらも的確な結が得られる手法が求められる。環境研究において環境に影響を与えるプロトコルは望ましくないと考えている。

本研究はBio-MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) などの技術シーズを活用し、閉鎖・管理された研究設備内の実施できる内容となっている。本研究手法の確立は、大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化および評価・解明にも大きく貢献できると考えている。

#### 5. 評価者の指摘及び提言概要

興味ある成果が得られていると思われる。現段階では、実験用マイクロプラスチックの標準物質の生成に目処が立ち、生体試料のどこに移行したかがわかるようになったということなので、今後は、化学成分も明らかにしたうえで、生体内輸送や影響のメカニズムを明らかにする研究を期待する。ここで得られた知見が現場・現実をどこまで再生しており、その結果がどこまで有用かについての評価が必要である。また、生体内での蓄積の再現性、生物の違いによる影響の違いの評価について、免疫学的な検証が、本研究で示された方法でどこまでできるのか、についても残りの期間で確認して頂きたい。

#### 6. 評点

評価ランク：A