



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | マイクロ・ナノプラスチックの毒性発現における物性の影響                                                                                                                           |
| Author(s)    | 生野, 雄大                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2023, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/92976">https://hdl.handle.net/11094/92976</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 氏 名 ( 生野 雄大 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                             |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | マイクロ・ナノプラスチックの毒性発現における物性の影響 |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>マイクロプラスチックとは、環境中に存在する5 mm以下のプラスチック粒子と定義されており、空気中や海洋中、土壌中など、環境中の至る所に存在している。そのためヒトは、環境中のマイクロプラスチックへの曝露を避け得ない。実際にヒトの胎盤や肺、血液から検出されており、人体に取り込まれていることが判明している。そのため、ヒトへの健康影響が危惧されており、マイクロプラスチックがヒトに与える影響を評価することが多方面から望まれている。しかしながら、そのヒト健康影響はほとんど明らかとされていない。実環境中に存在するマイクロプラスチックには、さまざまな種類、形状、サイズが存在している。さらには、環境中のマイクロプラスチックは紫外線や波などの外的要因により、表面が化学的に劣化していることが知られている。そのため、実環境中においてヒトが曝露しうるマイクロプラスチックの生体影響を評価するためには、劣化状態を模したサンプルを用いた評価が必須であるものの、本観点での研究は世界的に立ち後れている。そのうえ近年のNanoTox（ナノマテリアルの毒性；ナノ毒性）への警鐘も相俟って、1 <math>\mu\text{m}</math>よりも小さいナノプラスチックへの懸念が急速に高まりつつあるものの、その詳細は全く判明していない。そこで本研究では、環境中に存在しうる多岐にわたるマイクロプラスチックに着目し、その中でも劣化状態とサイズの観点から生態影響を評価していくこととした。</p> <p>まず、第一章では、環境中に存在するマイクロプラスチックの劣化状態を模擬した標準品を作製する手法を確立することを目指した。マイクロプラスチックのサンプルとして、プラスチックの中で最も製造量の多いポリエチレン（PE）の粉末サンプル（中位粒径231 <math>\mu\text{m}</math>）を入手し、波長172 nmの紫外線を照射することで、サンプル表面を化学的に劣化させた。サンプルの化学劣化状態を測定するため、減衰全反射赤外分光（ATR-IR）法により赤外吸収スペクトルを得た。その結果、劣化の指標となるカルボキシ基（C=O）やヒドロキシ基（O-H）の吸収帯が増加しており、化学的な劣化が認められた。さらに、顕微鏡観察及び粒度分布測定により、劣化に伴う形状やサイズの変化がないことを確認した。次に、得られた劣化後サンプルが実環境中に存在しうる劣化状態であることを確認するため、実際に環境中のマイクロプラスチックサンプルを採取し、赤外分光測定を実施した。その結果、環境サンプルにおいても、カルボキシ基やヒドロキシ基の吸収帯がみられ、作製した劣化後PEが環境中に存在しうるものであることが示された。以上により、作製した劣化後サンプルは、実環境中のマイクロプラスチックを模した標準品として利用しうるものであることが示された。次に、作製したPEサンプルを用いて細胞毒性試験を実施し、劣化による影響の評価を試みた。細胞種は、免疫細胞であるRAW264.7（マウスマクロファージ）とTHP-1（ヒト単球）および、マイクロプラスチックに曝露しうる肺、皮膚、腸の上皮細胞である、A549（ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞）、HaCaT（ヒト表皮角化細胞）、Caco-2（ヒト結腸癌由来細胞）を選択し、MTTアッセイにより細胞生存率を求めた。その結果、すべての細胞種において、劣化前PEでは細胞生存率にほとんど変化は認められないのに対して、劣化後PEでは濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。このことから、PE粒子は劣化の有無によって細胞に対する毒性が異なることが示された。さらに、PE添加後の細胞の様子を経時的に観察することで、劣化後PEが誘導する細胞死には、アポトーシスなどのプログラム細胞死とネクローシス様の細胞死の異なる機序があることが示唆された。</p> <p>次に、第二章では、マイクロプラスチックの劣化状態による影響の詳細な評価やサイズによる影響の評価を試みた。劣化進行具合による影響を評価するため、紫外線の照射時間を変えて劣化状態の異なるPEサンプルを作製し、MTTアッセイを実施した。劣化度は、IRスペクトルにおけるPEの骨格のC-H結合に由来する1463 <math>\text{cm}^{-1}</math>のピーク高さに対する、C=Oの伸縮振動に由来する1715 <math>\text{cm}^{-1}</math>のピーク高さの比（C=O / C-H）で求められ、一般に劣化の指標として用いられるカルボニルインデックスを指標とした。その結果、劣化度が高くなるほど細胞毒性が増強する傾向が得られた。さらに、劣化度（C=O / C-H）と細胞毒性の指標となる50%阻害濃度（<math>\text{IC}_{50}</math>）が強く相関することを見出した。さらに、劣化に加えて粒子サイズの影響を評価するため、中位粒径24 <math>\mu\text{m}</math>のPE粒子についても細胞毒性試験を実施したところ、同様に</p> |                             |

劣化後PEでのみ細胞毒性が認められ、230  $\mu\text{m}$ のPEサンプルより低濃度で細胞生存率の低下が認められた。さらなるサイズによる影響を検討するため、フィルター処理したサンプルを用いた検討を実施した。この研究で用いたPE粉末は、1  $\mu\text{m}$ 以下のナノプラスチックも含んでいるサンプルであるため、10  $\mu\text{m}$ のフィルターで処理し溶媒を乾燥させて回収したサンプルによる細胞毒性試験を実施した。その結果、劣化後PEをフィルター処理したサンプルの毒性が最も強く、動的光散乱法で測定した粒度分布から、1  $\mu\text{m}$ 以下の粒子の細胞毒性が最も強いことが示唆された。

さらに、第三章では、近年着目されている粒子径が1  $\mu\text{m}$ 以下のナノプラスチックの影響を評価するため、ナノプラスチックを作製し、細胞毒性試験を実施した。その結果、これまでの結果と同様、劣化により細胞生存率の低下が認められた。また、異なる種類のプラスチック粒子として、ポリプロピレン（PP）のナノ粒子を作製し、同様の検討を実施した。その結果、PEと同様に、PPでも劣化により細胞生存率の低下が認められ、PEと同程度の毒性を示した。このことから、異なる素材であっても表面が劣化することで細胞毒性が発現する可能性が示唆された。

以上、本研究では、マイクロプラスチックに特徴的な物性である劣化に着目し、環境中のマイクロプラスチックの劣化状態を模擬したサンプルを作製し、これを用いた細胞毒性試験の結果、劣化前のPEに比べて劣化後のPEで細胞毒性が発現することを見出した。さらには、劣化したPEは劣化が進行するほど、またサイズが小さくなるほど細胞毒性が増強することを明らかとした。また、PPではPEと同様の細胞毒性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、マイクロプラスチックの劣化と生体への影響の関係を示す重要な結果であり、マイクロプラスチックの生体影響のさらなる理解に貢献するものである。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 生 野 雄 大 ) |     |    |       |
|-----------------|-----|----|-------|
|                 | (職) |    | 氏 名   |
| 論文審査担当者         | 主 査 | 教授 | 堤 康央  |
|                 | 副 査 | 教授 | 有澤 光弘 |
|                 | 副 査 | 教授 | 井上 豪  |
|                 |     |    |       |

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、環境中に存在するマイクロプラスチックの特徴的な物性の一つである化学的劣化に着目し、化学的劣化に伴う生体、特に細胞への影響を解析すると共に、ナノサイズからマイクロサイズまでの粒子径および化学的劣化と細胞影響との関係を追求することで、以下の興味深い結論を得た。

1. ポリエチレン (PE; Polyethylene)、ポリプロピレン (PP; Polypropylene)、ポリスチレン (PS; Polystyrene) に関して、環境中のマイクロプラスチックの化学的劣化状態を反映したサンプルの作製手法を確立した。
2. 環境中のマイクロプラスチックは、様々な種類、大きさ (サイズ)、形状、化学的劣化度を有すると共に、多様な添加剤を含むこと、またこれらを考慮したサンプルを用いることで、初めてマイクロプラスチックの生態/生体系への影響を評価し得ることを認めた。
3. 環境中の化学的劣化状態を反映したポリエチレン粒子 (マイクロプラスチック) は、化学的劣化度の上昇に伴い、細胞障害性が高まることを明らかにした。
4. 環境中の化学的劣化状態を反映したポリエチレン粒子 (マイクロプラスチック) の細胞障害性は、粒子径が小さいほど増強し得ること、特にナノサイズのマイクロプラスチックの生体影響を追求することの重要性を認め、今後のグローバル課題となり得ることを提示した。
5. 環境中の化学的劣化状態を反映したポリプロピレン粒子 (マイクロプラスチック) は、ポリエチレン粒子 (マイクロプラスチック) と同様、化学的劣化により細胞障害性を示すことを見出し、また比重の軽いマイクロプラスチックの生体影響評価の留意点を提示した。

以上、本研究では、環境中に存在するマイクロプラスチックに特徴的な物性である化学的劣化に着目し、化学的劣化状態を反映したサンプルを作製し、マイクロプラスチックの化学的劣化とサイズ、生体への影響の関係を、今後に紐解き得る知見を提示する、貴重な研究成果である。

以上より、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。