

マイクロプラスチックの水生生物への影響に係る特性解析と生態毒性試験に関する新たな指針の提案

愛媛大学農学研究科

鑑迫典久

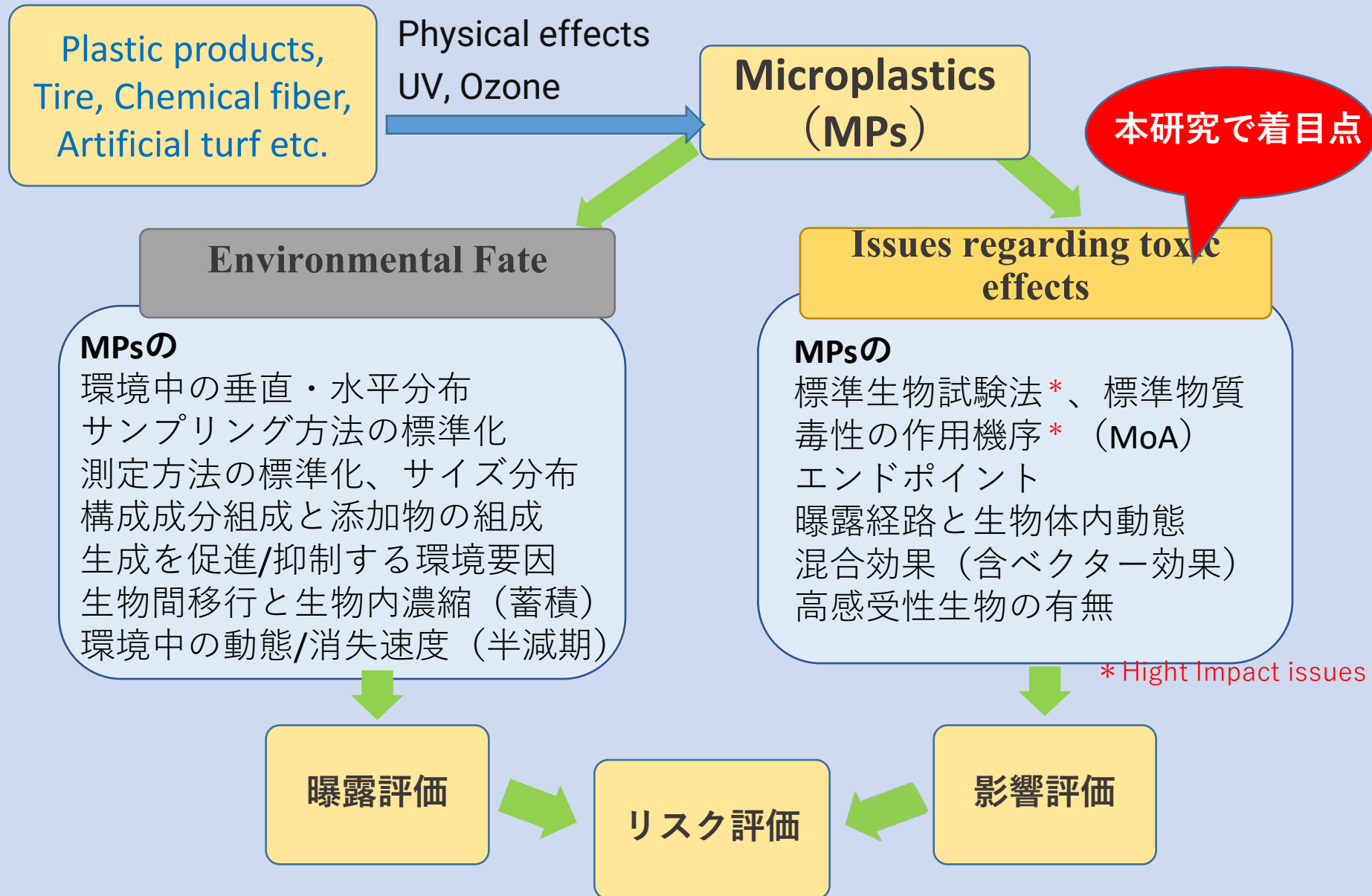
背景

1. 従来の生態毒性試験法は水溶性物質向けに設計されており、水に不溶なマイクロプラスチック（MPs）に特有の影響（体表付着、餌と競合、腸管の擦過など）を適切に評価できていない。
2. 既存の試験ガイダンス（OECD GD23やGD317）もMPsに対応しておらず、MPsの毒性試験では再現性や評価の信頼性が課題となっている。
3. そこで本研究では、MPs特有の物理化学的性質を踏まえた新たな生態毒性試験法と、それに基づくGD（ガイダンス文書）の作成を目指す。

目的

1. 本研究では、MPsに特化した生態毒性試験法の開発を目指す。
2. 第1段階では、文献や国際機関の報告を分析し、MPsの物理的特性と毒性の関係を整理する。
3. 第2段階では、上記情報をもとにMPsに特化した科学的根拠に基づく生態毒性評価法を提案する。
4. 将来的なMPs規制における背景データ取得や、リスク評価の精度向上に貢献することを目標とする。

Environmental Risk Assessment Framework for Microplastic



MPsの生態毒性に関する論文について考察

野外（生物）で**毒性影響**があったという“信頼のおける”論文は皆無。ほぼ、試験室内実験での結果。

ここでの毒性影響とは、**インビボ試験で成長、繁殖、致死、行動異常**などを指す。

体内から検出された、何らかの遺伝子が動いた、腸内細菌叢が変わった、など**変化はあるが有害性に結びつかないエンドポイント**は毒性影響に含まない。

野外観察で、上記で定義したエンドポイントを観察することは困難（野外で影響がないのではなく、検出されないだけの可能性がある）。

例えば、野生生物の死骸から、その死因を断定することは難しい。

生態試験では**10～20%**程度の繁殖力低下があれば統計的に検出できるが、野外生物で**10%**の変動は意味をもたない。また他の死亡要因（外敵、餌など）もあるため、**MPs**との因果については明確にできない。

MPのリスク評価に必要な曝露評価と有害性評価

粒径ごとに見た場合のGAP

- 300 μ m以上5mm以下
- 環境中MPsの**実測値は豊富**
- 室内実験データは、全論文（351件）の5%程度（主に魚類）
- 10～300 μ m
- 上記サイズ的环境中の実測データは限定的
- 室内実験データは、全論文の33%程度（魚類、甲殻類、一部藻類）。
- 毒性値は微妙（有ると無いの論文が混交）
- 10 μ m未満～ナノサイズ
- 環境中の定量的な実測データはほぼ無し（検出された報告程度）
- 室内実験データは、全論文の62%程度（藻類、甲殻類、一部魚類）
- 甲殻類繁殖で毒性があるという報告が多い。

MPsのリスク評価に関する考察

リスク評価でPNECに用いるのは試験室内実験での結果。

⇔野外で実測したMPsサイズとギャップあり

$$\text{環境リスク} = \frac{\text{PEC}(\text{MEC})}{\text{PNEC}}$$

The diagram illustrates the formula for environmental risk. The numerator is labeled 'PEC(MEC)' with a red 'MEC'. A callout box points to 'MEC' with the text '予測環境中濃度' (Predicted environmental concentration). The denominator is labeled 'PNEC'. A callout box points to 'PNEC' with the text '予測無影響濃度' (Predicted no-effect concentration). A green callout box points to both 'MEC' and 'PNEC' with the text 'そもそも濃度ではなく個数?' (Isn't it number of particles instead of concentration?).

を計算するときに、2次MPsの場合には、何年かかって分解する（MPsになる）のか分からないので発生源からPEC値を推定できない。よってMECを使う。

生態毒性試験では、被験生物の摂取できるMPsサイズが限られているため、小さいMPsで試験することが多い。

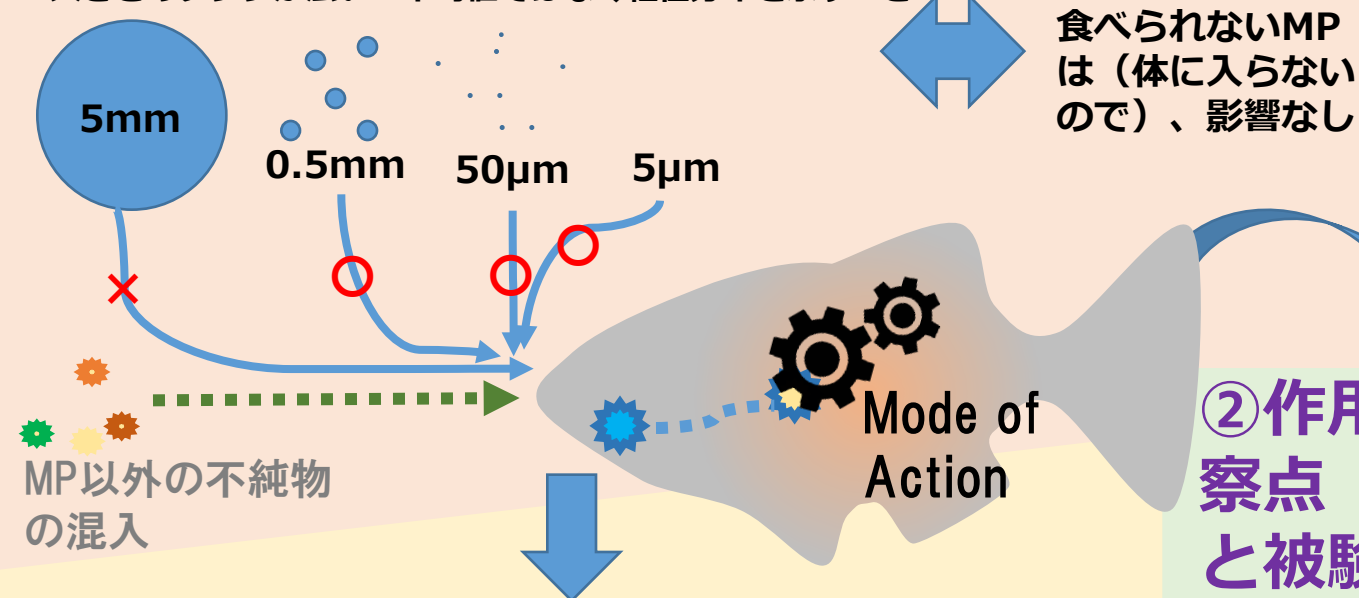
前出のファイルで示したように、**分子と分母が違うものの測定値を使用している。＝現行ではリスク評価が不適切**

MPの生態毒性試験で重要な3つのこと

①曝露量（PEC）とは

MPの性状（素材、大きさ、形、色）と
測定項目（重量、体積、個数、表面積、電荷）のGAP

大きさのレンジが広い＝平均値ではなく粒径分布を示すべき



因みに生物が呑み込める
サイズは決まっている

ヒト：2cmくらい

メダカ：0.7mm

ミジンコ：30µm

食べられないMP
は（体に入らない
ので）、影響なし

粒径分布が無いと真
＝のPECが不明？
どの測定項目がPEC
に適しているか？

③標準試験方法とポジティブコントロール（標品）が無い

標準試験法（ガイドライン）が無いと、
結果の再現性が得られない
結果の比較ができない
データの互換ができない
標品が無い場合、試験の有効性確認ができない

②作用機序（MoA）と観察点（エンドポイント）と被験生物が不明

物理的な影響

- ・体表、鰓等へ付着
- ・消化管閉塞、擦過
- 生物学的特殊性が必要？
- 化学的な影響？
- ・活性酸素発生？
- ・ストレス

まず、取り組むべきこと
生態毒性試験の標準化のために必要な検討

1. 被験材料の検討（種類、前処理等）
2. 試験方法の検討（既存手法との関係）
3. MPsの毒性作用機序（MoA）の解明

まず、取り組むべきこと

生態毒性試験の標準化のために必要な検討

1. 被験材料の検討（種類、前処理）

野外で得られたMPsサンプルで試験する必要はあるか・・・NO

→サンプリング方法、場所、時期などにより、同一性の担保が得られず、再現性に乏しい。

→環境影響に近いが、反映しているかどうかは疑わしい

→リスク評価に使えない

市販のマイクロビーズを使う・・・YES

→入手が容易で、得られる結果の再現性は高く、殆んどの論文が使用。ただし、サンプルによっては、分散剤や防腐剤が入っているものがあり、そのまま生物試験に使用する場合には留意が必要。ほとんどの論文は留意していない。おそらく前処理（洗浄）が必要。

→均一サイズのMPsによる試験ができる

→MPsの素材による毒性の違いを明確にできる

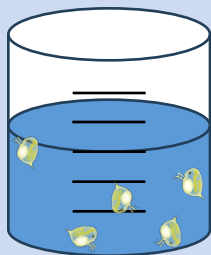
→環境中の劣化程度を反映していない。しかし、劣化と毒性の関係も未知であり、劣化MPsの試験は次の段階で良いと思われる。

実験１：腸管閉塞を考慮したMPs毒性試験

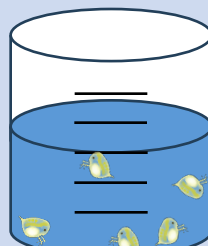
実験２：サイズを考慮したMPs毒性試験 を同時に行う

ミジンコ急性遊泳阻害試験

標準試験



0 h



48 h

給餌なし

水溶性物質向け

(試験困難物質用GD
→ ナノ粒子の凝集性, 分散性)

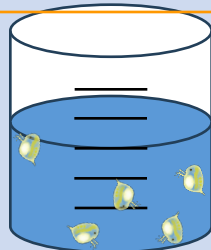
MPへの適応は難しい



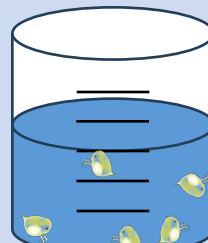
MPの特異的な影響を考慮

- ・ 体表付着
- ・ 餌との競合
- ・ 腸管擦過etc

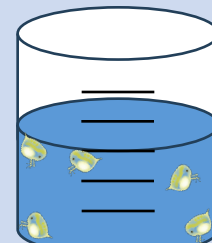
提案：延長急性毒性試験



0 h



48 h



96 h

給餌あり



毒性試験に使用したMPsのサイズ

サイズの異なるMPsを使用した延長毒性試験

→同一素材で粒子径の異なるサンプルを用い, 毒性影響の有無または程度の違いを検証

大

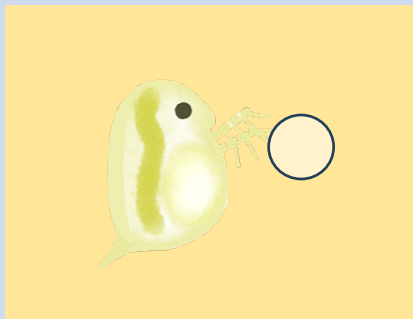


数十

μm

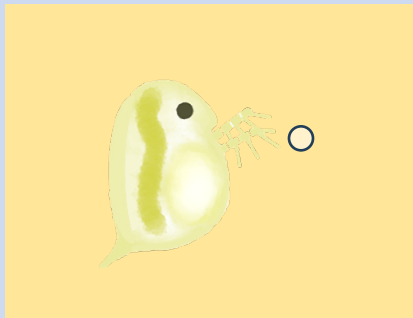


小



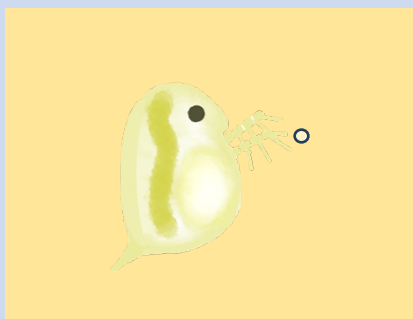
摂取できないサイズの粒子

- ・直接的な影響は考えにくい
- ・栄養吸収阻害等の可能性も薄い



摂取できるサイズの粒子

- ・特に餌と類似サイズでは, 直接的な影響が考えられる
- ・栄養吸収阻害, 体表付着, 腸管擦過等による影響の可能性



摂取できるサイズの粒子

- ・さらに微小サイズでは, 直接的な影響が考えられる
- ・栄養吸収阻害, 体表付着, 腸管閉塞/擦過等による影響の可能性

MPsの素材の違いによる毒性試験

素材の異なるMPを使用した延長毒性試験

ポリエチレン(polyethylene)

用途：袋, 容器, ボトル, チューブ等

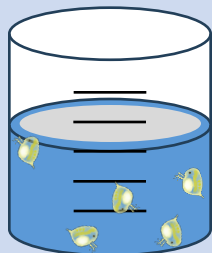
比較的柔らかく, やや弾性あり

使用サイズ：106 μm ~ 1 μm

比重：水より軽い



浮きやすい



ミジンコとの
接触頻度が少ない
→ 影響 = 比較的(小)

ポリスチレン(polystyrene)

用途：食品容器, 発泡スチロール等

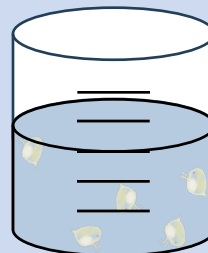
硬く, 脆く割れやすい

使用サイズ：10 μm ~ 0.061 μm

比重：水に近い



水中浮遊, 沈下

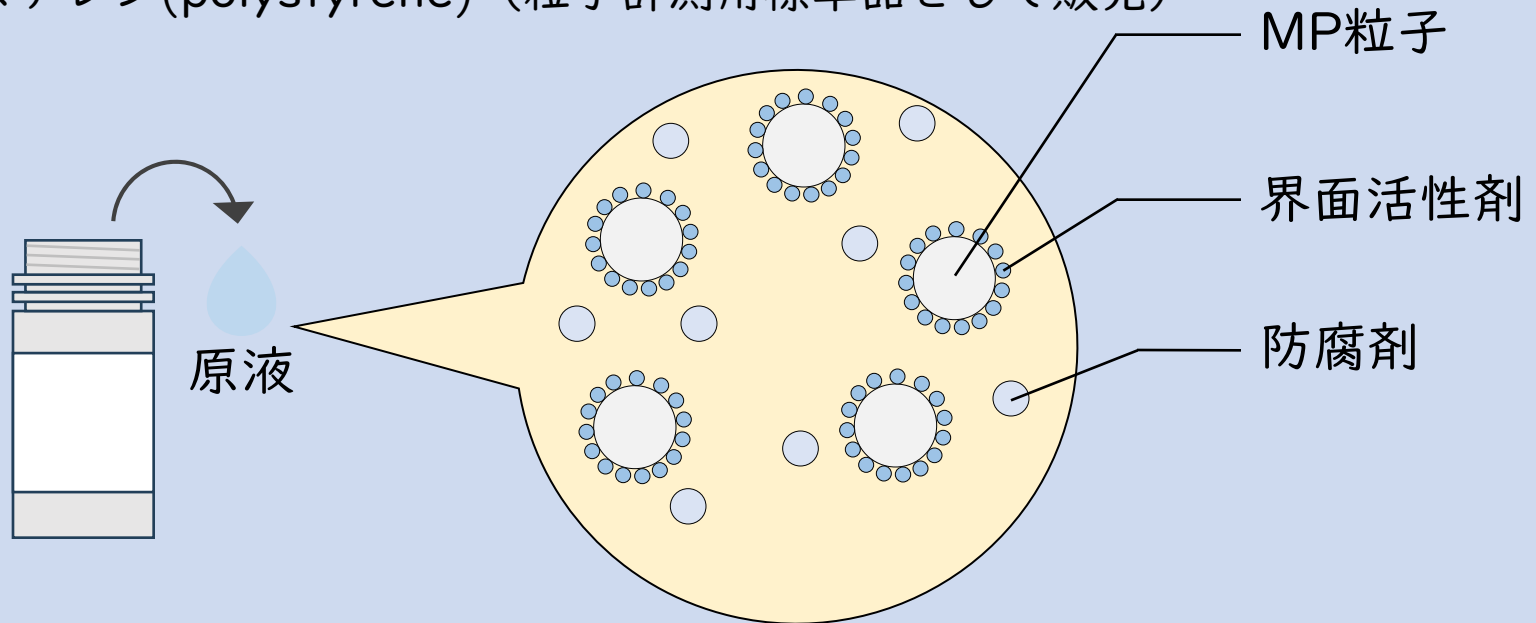


ミジンコとの
接触頻度が多い
→ 影響 = 比較的(大)

市販のMPsの前処理の必要性について

素材の異なるMPを使用した延長毒性試験を行う場合

- ・ポリスチレン(polystyrene) (粒子計測用標準品として販売)



市販のMPs粒子には, 分散させるため不純物が混入しており、それらが遊泳阻害する



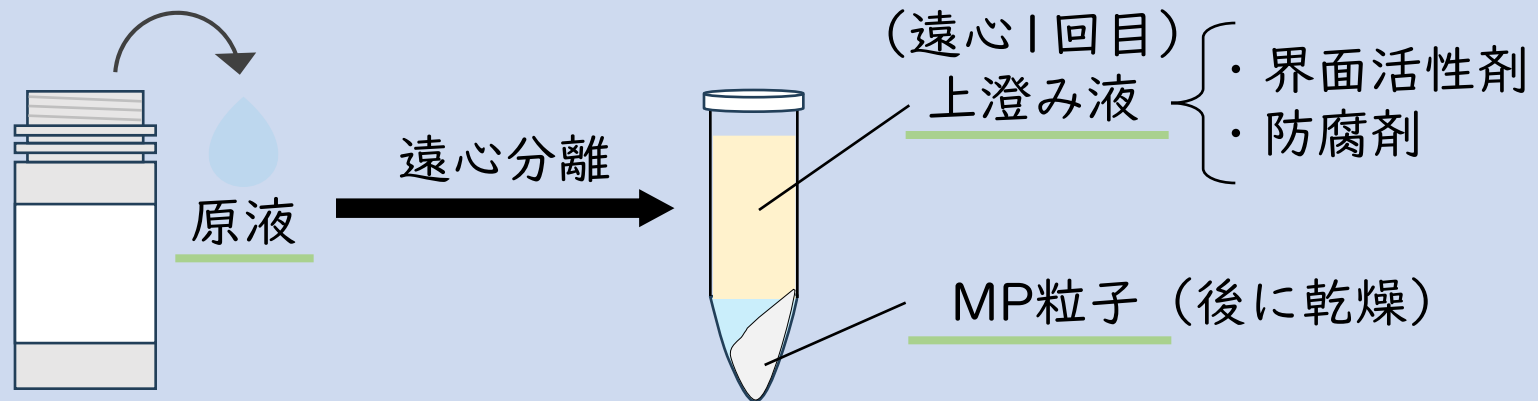
MPsの影響をみるためには, 不純物の除去が必要

前処理の必要性

市販のMPsの前処理の必要性について、つづき

素材の異なるMPを使用した延長毒性試験

- ・ポリスチレン(polystyrene)

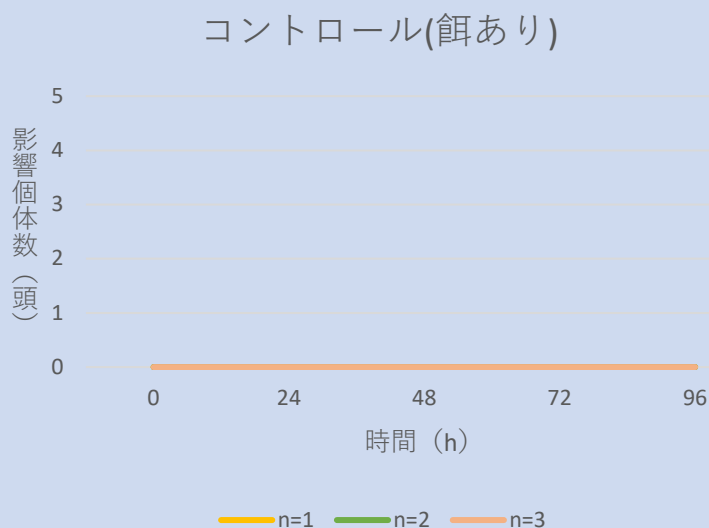


- ・ 原液/上澄み液：確認された毒性影響には、
含有している薬剤の毒性が影響していると考えられる
- ・ MP粒子：MP単体の毒性影響がみられると考えられる
サイズ/素材により影響が異なる可能性
- ・ 遠心。乾燥後のMPsは、超音波処理によって飼育液に分散させて試験に使用する

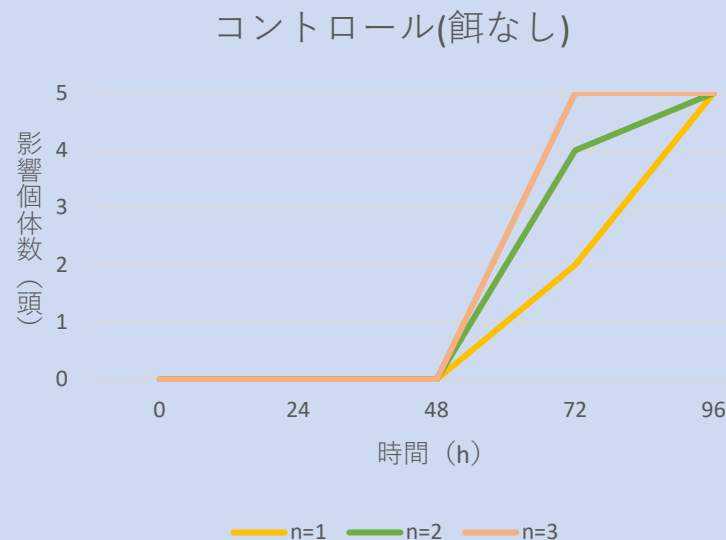
延長毒性試験の基礎データ

ミジンコ延長急性毒性試験

コントロール（餌あり）



コントロール（エサなし）



通常のみジンコ急性毒性試験（OECD TG 202）は無給餌、48時間の観察を行うが、48時間目の観察後に毎日給餌し、96時間まで観察する。48時間以降給餌した場合には、96時間目でも死亡しないが（左図）（繁殖開始日も遅れない、data not shown）、餌が無いと72時間目から死に始めて96時間ではほぼ餓死する（右図）。MPsが存在した場合、餌との競争吸収障害が起きると餓死すると考えられる。

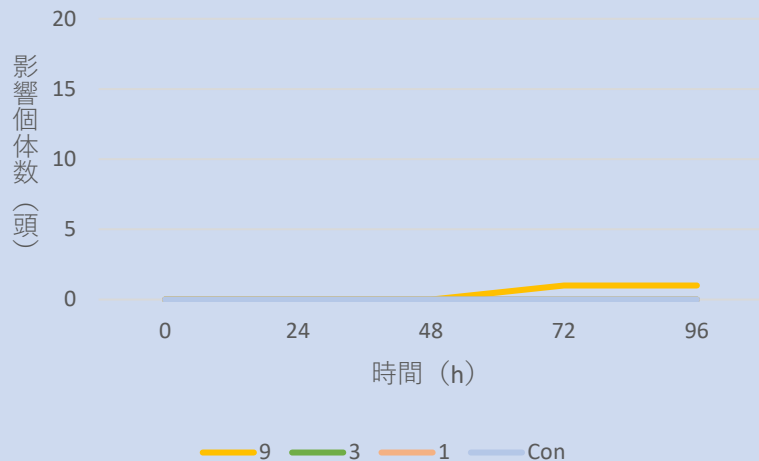
延長毒性試験の結果

素材の異なるMPを使用した延長毒性試験

ポリエチレン(polyethylene)

サイズ：10-22 μm

ポリエチレン 10-22 μm 乾燥粒子



ポリスチレン(polystyrene)

サイズ：10 μm

ポリスチレン 10 μm 乾燥粒子



餌ありの延長毒性試験において、ポリスチレンは消化管閉塞をおこし（目視で消化管内を確認）、エサとなるクロレラの摂餌阻害が起きたため、72時間以降に無給餌の場合と同様に餓死した。ポリエチレン粒子は水面に浮いていて摂食できず（目視で消化管に無いことを確認）、摂餌競争阻害がおきなかった。

MPsの添加量；黄300mg/L、緑100mg/L、橙30mg/L

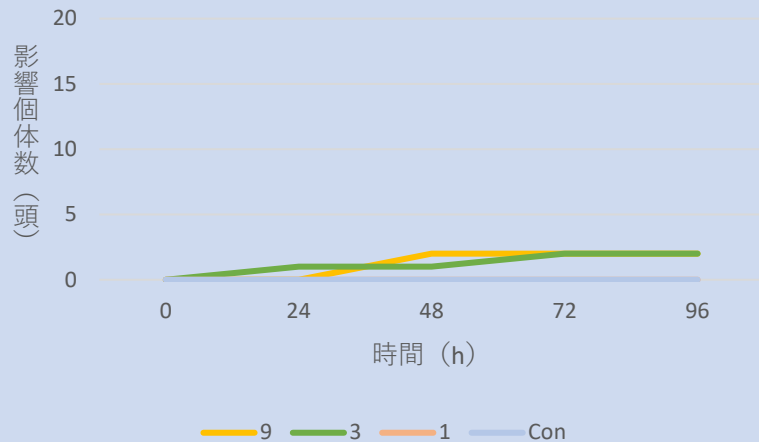
延長毒性試験の結果つづき（サイズの違い）

素材の異なるMPsを使用した延長毒性試験

ポリエチレン(polyethylene)

サイズ：1-4 μm

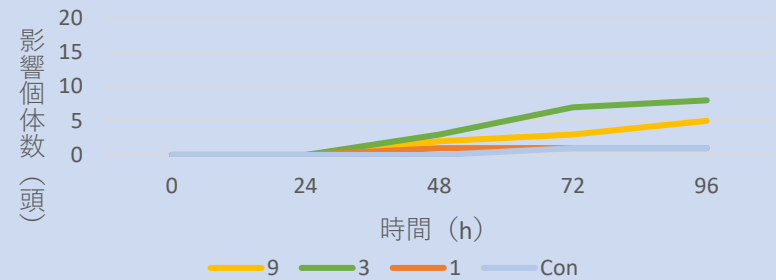
ポリエチレン 1-4 μm 乾燥粒子



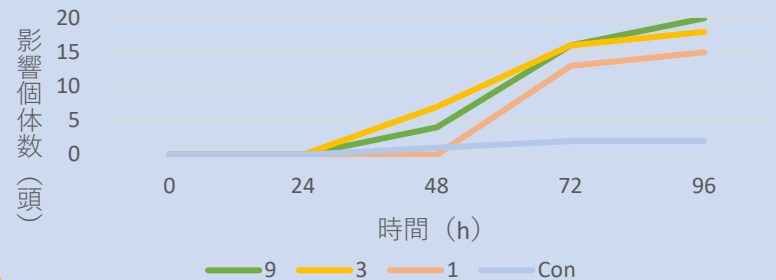
ポリスチレン(polystyrene)

サイズ：1 μm と 3 μm

ポリスチレン 1 μm 乾燥粒子



ポリスチレン 3 μm 乾燥粒子



当方で使っている餌クロレラのサイズが直径3~5 μm であり、3 μm ポリスチレンビーズのサイズと競合していると考えられる。1 μm だと競合しないと思われる（右図）。ポリエチレンは取り込まれていないため影響は無い。

考察とまとめ

- 特定サイズのMPsが、特定の生物に対して餌の競争吸収阻害をおこす。ミジンコの場合、消化管に取り込まれたMPsが排泄されているのを確認したので、消化管閉塞ではない。
- 影響した最低濃度（個数）は100mg/Lであり、個数に換算すると 1.8×10^8 個/Lとなる。餌として添加しているクロレラの量は、約 1.0×10^8 cell/Lなので、個数の桁数が同程度なので、競争阻害が起きても不思議ではない。ただし、環境中濃度よりもはるかに高濃度での曝露が行われている。
- 大きさの違い、素材の違い、生物種・餌の違いなど、様々な条件が重なったときにMPsの生物影響が発生する可能性がある。しかし現段階ではそれは物理的影響であり、自然界では起こりにくい極端な条件であると思われる。

