

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・目的

マイクロプラスチック（MP）は粒子状物質であり、その生態影響は粒径、粒子数、表面積、表面電荷、凝集性などの物理特性に大きく依存する。しかし、既存のOECD生態毒性試験法は水溶性化学物質を対象としているため、質量濃度（mg/L）のみではMP毒性を適切に評価できない。

UNEPによる国際プラスチック条約やOECD・ISOでの種々の標準化検討が進む一方、MPの生態影響評価法は未整備である。同一質量濃度でも粒径によって粒子数や生物との接触確率は大きく異なり、従来の濃度概念だけでは毒性を説明できない。また、市販MPでは保管液中の分散剤や保存剤による影響や、主要な毒性機構の一つといわれる「腸閉塞」についても十分な検証が行われていない。このため、粒子特性を考慮した新たな評価体系の構築が求められている。

本研究では、MPの物理特性と生物影響との関係を体系的に解析し、粒子状物質に適した生態毒性試験法および評価指標の構築を目指す。

## MP評価が難しい理由

マイクロプラスチックは「濃度」だけでは評価できない。

既存のOECD生態毒性試験は、基本的に水に溶けた化学物質の外部濃度と毒性の関係を評価する設計である。

しかしMPでは、同じmg/Lであっても粒径が変わると粒子数、総表面積、沈降性、拡散性、生物との接触確率が大きく変わる。

### MPの定量指標は？

| Diameter of MPs( $\mu\text{m}$ ) | Theoretical       |                                         |                                               |                                     |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|
|                                  | Total mass (mg/L) | Total volume ( $\text{mm}^3/\text{L}$ ) | Total surface area ( $\text{mm}^2/\text{L}$ ) | Total particle number (particles/L) |
| 31.4                             | 100.0             | 95.2                                    | $1.8 \times 10^4$                             | $5.9 \times 10^6$                   |
| 10.5                             | 100.0             | 95.2                                    | $5.4 \times 10^4$                             | $1.6 \times 10^8$                   |
| 3.0                              | 100.0             | 95.2                                    | $1.9 \times 10^5$                             | $6.7 \times 10^9$                   |
| 1.0                              | 100.0             | 95.2                                    | $5.7 \times 10^5$                             | $1.8 \times 10^{11}$                |

そのため、従来の「濃度—応答」だけでは粒子状物質としての毒性を十分に説明できない。

## 問題提起：粒子影響の支配因子は何か

### 同じ質量濃度でも、粒径が変われば影響も異なる？

MP評価では、質量濃度、個数濃度、体積濃度、総表面積、ゼータ電位、形状、分散安定性など多くのパラメータが関与する。

とくに粒径が小さくなると、同一質量濃度でも粒子数は急激に増加し、生物との接触機会が増える。

小粒径粒子では沈降しにくく、懸濁時間が長くなるため、ミジンコのろ過摂食過程で遭遇する頻度も高くなる。

したがって「どの濃度単位で毒性を表すべきか」は、標準化に直結する重要課題である。

13期ではまず、粒径を変えた実験により、MP影響を支配する因子を探索した。

表面電荷とゼータ電位



# 研究全体ロードマップ

13期は現象確認、14期は作用機序、15期以降は生物種拡張と指針化

## 13期：現象の発見

サイズ依存毒性、腸閉塞説の再検証、摂食阻害仮説、体表付着、添加剤影響を整理。

## 14期：作用機序解明

粒径・個数・表面積・ゼータ電位の寄与を比較。RNA-seqにより（表現型に無いものも含めて）分子応答を解析する。

## 15期：評価対象の拡張

魚類・底生生物、さらにナノサイズ粒子へ展開し、粒子影響の一般性と限界を検証。

## 16期：評価指針化

得られた知見を試験法、濃度表現、前処理、データ解釈のガイダンスを提案。

# これまでの進捗

## 主要成果

- ・ 延長急性毒性試験により、通常の48時間試験では見えにくい栄養障害型の影響を検出できた
- ・ 31.4  $\mu\text{m}$ および10.5  $\mu\text{m}$ では影響が小さく、3  $\mu\text{m}$ および1  $\mu\text{m}$ で明確な毒性が認められた
- ・ 腸管内にMPは観察されたが、排泄も確認され、完全な腸閉塞は支持されなかった
- ・ 1  $\mu\text{m}$ 粒子では体表、とくに胸脚周辺への付着が見られ、摂食・呼吸機能への影響が示唆された
- ・ 市販粒子の上清毒性から、添加剤・分散剤等の寄与を分離評価する必要性が明らかになった

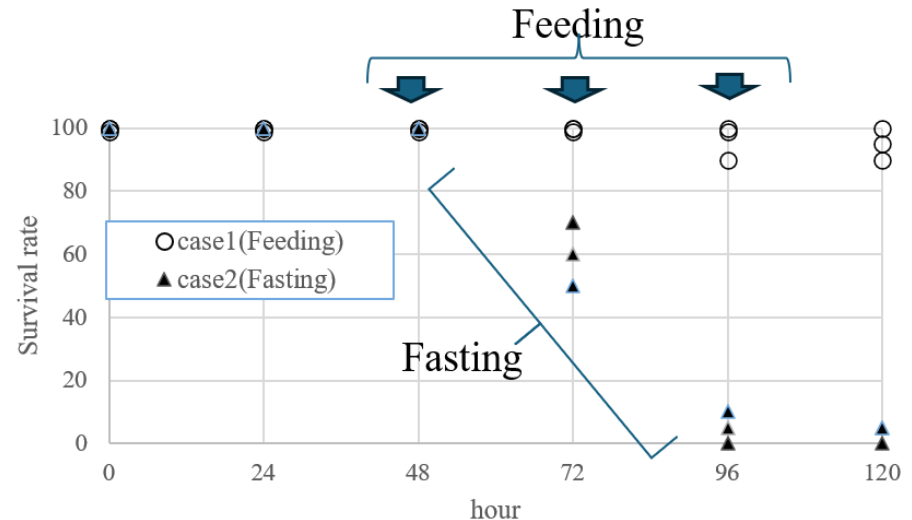
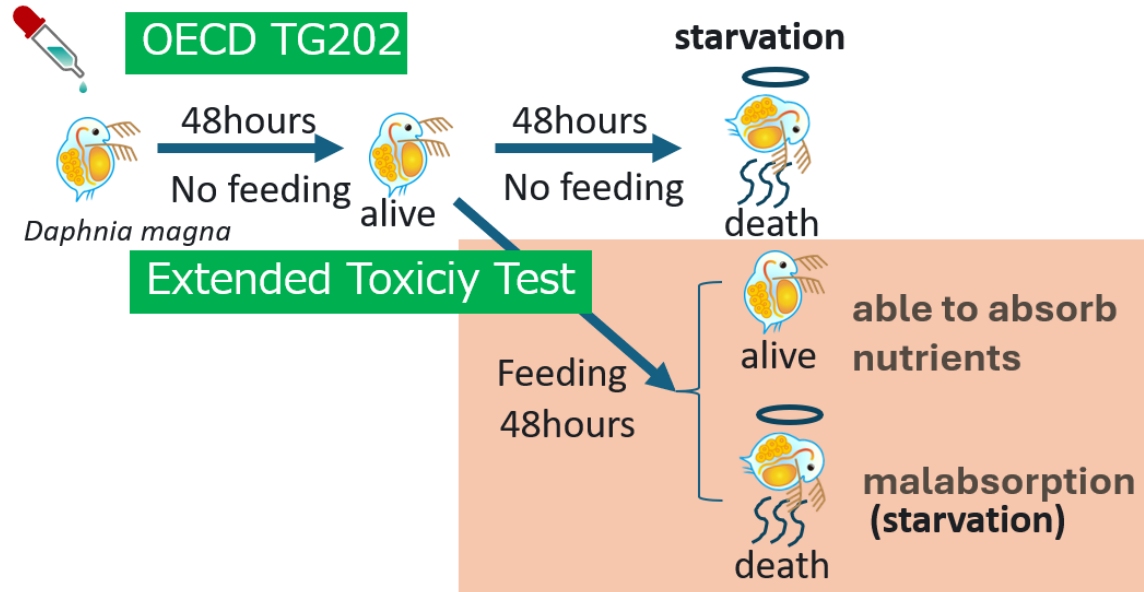
## 今後の展開

物理特性解析、RNA-seq（AOP整理）、ナノサイズ粒子の評価法検討へ展開する

# 延長急性毒性試験法

通常の48時間試験では見えない「摂食阻害」を検出するための試験系を開発した。

- OECD TG202の急性遊泳阻害試験は48時間無給餌で実施されるため、餌の摂取阻害による影響を検出しにくい
- 本研究では、48時間まではOECD TG202に準じた条件で曝露し、その後クロレラを給餌して96時間まで観察した
- この設計により、化学物質型の急性毒性ではなく、粒子による餌摂取の競合や栄養阻害を評価できる
- 給餌区と無給餌区を比較することで、単なる長期曝露の影響と栄養供給の有無による影響を区別できる
- この延長急性毒性試験法は、MPや生分解性プラスチック粒子の評価に応用可能な技術的成果である



# 市販MPの前処理と上清分離

MP評価法を標準化するうえで、前処理法と上清評価の有無は重要な管理項目となる。

市販MP粒子は、粒子計測機の標準品として売られており、製造・保存・分散の過程で界面活性剤、分散剤、未反応成分、酸化防止剤などが含まれる可能性がある。

そのため、観察される毒性が粒子そのものによるものか、分散液中の可溶性成分によるものかを区別する必要がある。

本研究では遠心分離、洗浄、再分散を繰り返し、粒子画分と初期上清画分を分離したこの前処理により「粒子毒性」と「添加剤・上清毒性」を同じ試験系で比較できる。

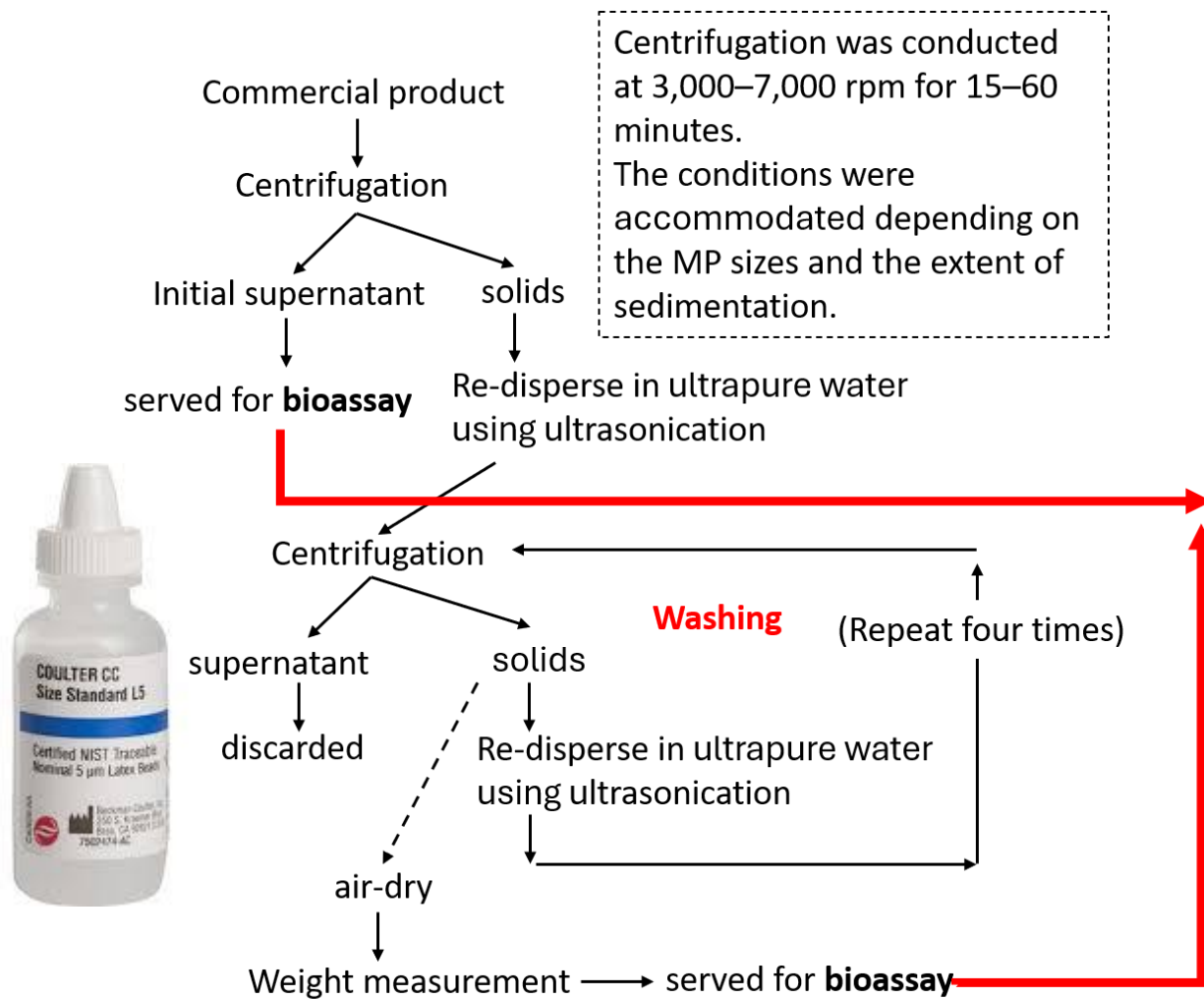


Figure. Pre-treatment of the Commercial Microplastics

## サイズ依存毒性の結果

毒性は質量濃度だけでは説明できず、粒径に強く依存した。

Table 2. Toxicity values ( $EC_{50}$ ) for each MP size (unit: mg/L).  
〈95%confidence range〉, NE: No Effect.

| EC50 (95 %CI) | 24hour | 48hour                    | 72hour                     | 96hour                     |
|---------------|--------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 31.4 $\mu$ m  | NE     | NE                        | NE                         | NE                         |
| 10.5 $\mu$ m  | NE     | NE                        | NE                         | NE                         |
| 3 $\mu$ m     | NE     | NE                        | 151.4<br>〈43.25～<br>529.9〉 | 54.94<br>〈23.09～<br>130.7〉 |
| 1 $\mu$ m     | NE     | 411.3<br>〈72.74～<br>2326〉 | 69.04<br>〈25.43～<br>187.5〉 | 56.29<br>〈21.12～<br>150〉   |

31.4  $\mu$ mおよび10.5  $\mu$ m粒子では、300 mg/Lでも大きな生存率低下は認められなかった。一方、3  $\mu$ mおよび1  $\mu$ m粒子では、給餌開始後の72～96時間で生存率が大きく低下した。同じポリスチレン粒子であっても、粒径が変わるだけで生物影響が大きく変化した。この結果は、MP毒性をmg/Lだけで比較することの限界を示している。サイズ依存性の存在は、14期で個数濃度、表面積、接触確率を解析する根拠となる。

# 腸管観察から見た摂取の実態

小粒径MPは摂取されるが、クロレラ摂取も同時に確認され、完全閉塞は支持されなかった。



**Figure 1.**  
**Particle size:**  
**31.4 μm (300 mg/L,**  
 **$1.76 \times 10^7$**   
**particles/L).**



**Figure 2.**  
**Particle size:**  
**10.5 μm (300 mg/L,**  
 **$4.72 \times 10^8$**   
**particles/L).**



**Figure 3.**  
**Particle size:**  
**3 μm (300 mg/L,**  
 **$2.02 \times 10^{10}$**   
**particles/L).**



**Figure 4.**  
**Particle size:**  
**1 μm (300 mg/L,**  
 **$5.46 \times 10^{11}$**   
**particles/L).**

31.4 μm粒子では腸管内にMPはほとんど確認されず、クロレラ摂取も正常に見られた。

10.5 μm粒子では一部個体で腸管内にMPが確認されたが、クロレラの摂取は維持されていた。

3 μm粒子では腸管全体にMPが観察され、クロレラとサイズが近いいため餌として誤摂取された可能性が高い。

1 μm粒子でも腸管内に多量のMPが観察されたが、単純な完全閉塞ではなく摂食効率低下が疑われた。

腸管観察の結果は、毒性発現が「摂取の有無」だけでなく、摂食過程での競合に依存することを示唆している。

# 1 $\mu\text{m}$ 粒子で見た体表付着の可能性

小粒径では腸管内だけでなく、体表・胸脚周辺への付着も重要な作用経路となる。



1  $\mu\text{m}$ 粒子では、腸管内への取り込みに加えて、体表への顕著な付着が観察された。特に胸脚周辺への粒子集積が見られた点は重要である。胸脚はミジンコの摂食、換水、呼吸に参与する器官である。粒子が胸脚に付着すると、餌粒子の取り込み効率、鰓様機能、遊泳・換水行動に影響する可能性がある。

この影響は、腸閉塞説では説明できない新しい粒子毒性経路である。

今後、体表付着の程度、粒子表面電荷、ゼータ電位、粒子濃度との関係を解析する。

# まとめ

MPはサイズ依存的に毒性メカニズムが変化することが示された。  
つまり、**サイズによって毒性の質的变化**が生じる可能性が示された。

これは、水溶性物質には起こりえなかった現象であり、  
MP のリスク評価を行う上で、従来考慮しなかった以下の点を考慮する必要がある。

- ・ 摂取されないサイズは論外なので、環境中濃度ではなく、**摂取可能量**
  - ・ 特定サイズの有効曝露量。
  - ・ サイズごとのエンドポイントの種類
  - ・ 生物種による有効サイズの違い
- を考慮する必要がある。

さらに、

100 mg/Lという同じ質量濃度でも、粒径が31.4  $\mu\text{m}$ から1  $\mu\text{m}$ へ小さくなると、理論粒子数は大きく増加する。測定値には分散の不均一性や計数誤差が含まれるが、全体として小粒径ほど粒子数が増える傾向は明確である。総表面積も粒径低下に伴って増加し、吸着や生物表面との相互作用の機会が増える。

**したがって今後は、粒子数濃度・表面積濃度を用いた毒性整理を進め、最も説明力の高い指標を探索する。**