

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明

研究代表者： 井手 鉄哉 （国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官）

研究要旨

近年、ポリスチレン、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されているため、ヒトは食品を通じて生涯に渡って高分子化合物に経口暴露され続けると予想されるが、ヒトへの影響を評価するためのデータは国内外ともに乏しいのが現状である。一方で、腸管は粘液や上皮細胞から構成される粘膜バリアで保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物がヒトの体内へ吸収される量は少ないと予想されるが、腸管の炎症性疾患により粘膜バリアが破綻した条件下では、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、血管やリンパ管を通して容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）の自由飲水投与による腸炎モデルラットを作製し、健常ラットと腸炎モデルラットへ高分子化合物を反復経口投与した際の生体影響や体内動態の差異について比較・検証することを目的とする。研究初年度である令和元年度は、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた高分子化合物の反復経口投与実験を実施するための実験条件の設定を行った。

DSS 誘発腸炎モデルラット作製のための DSS 自由飲水投与の条件設定では、6 週齢の雄性 F344 ラット各群 4 匹に、DSS を 1.0 または 3.0 % の濃度で 1 週間自由飲水投与した。その結果、実験期間中、3.0 % 濃度群の全例で血便及び体重増加抑制の傾向がみられ、うち 2 例が投与開始 5 日後に切迫屠殺となった。1.0 % 濃度群では実験期間中に 1 例で肛門周囲被毛の汚れがみられたものの、体重増加抑制の傾向等は認められなかった。病理組織学的検索では、直腸においては 3.0 % 濃度群でび慢性の潰瘍性病変がみられた一方で、1.0 % 濃度群では散在性の糜爛性病変が認められた。結腸においては 3.0 % 濃度群で固有層及び粘膜下織におけるび慢性の炎症細胞浸潤がみられた一方で、1.0 % 濃度群では固有層における散在性の炎症細胞浸潤が認められた。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかった。現在、高分子化合物の反復経口投与実験の実験期間中に軽度な腸炎を持続的に誘発できる DSS 自由飲水投与の実験条件を検討している。

高分子化合物であるポリスチレン粒子の反復経口投与実験の条件設定では、6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 4 匹に、粒径 0.03 μm または 0.3 μm のポリスチレン粒子を 200 または 1000 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、対照群には蒸留水を同様に投与した。実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移については、ポリスチレン粒子投与群と対照群間に有意な差はみられなかったが、粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群では雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められた。今後実施する反復経口投与実験では、毒性影響がより強く発揮される可能性がある粒径 0.03 μm のポリスチレン粒子を使用し、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日とする方針を定めた。

研究分担者：

松下 幸平 (国立医薬品食品衛生研究所・
病理部・主任研究官)

A. 研究目的

近年、ポリスチレン、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。従って、ヒトは食品を通じて生涯に渡って高分子化合物に経口暴露され続けると予想されることから、これら高分子化合物の生体影響が注目されている。

しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。動物を用いた研究の多くにおいて、経口暴露による毒性影響はほとんど認められなかったと報告されているものの、ヒトへの影響を評価するためのデータは国内外ともにまだまだ乏しいのが現状である。

一方で、腸管は粘液や上皮細胞から構成される粘膜バリアで保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物がヒトの体内へ吸収される量は少ないと予想される。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症といった炎症性疾患が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、血管やリンパ管を通して容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。

本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の自由飲水投与による腸炎モデルラットを作製し、健常ラットと腸炎モデルラットへ高分子化合物を反復経口投与した際の生体影響や体内動態の差異について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合

物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを検討する。さらに、得られた結果に基づき、変化のみられた項目については、その毒性的意義及び発現機序についての追加検討を実施し、高分子化合物の毒性機序の解明を目指す。

B. 研究方法

B-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定

B-1-1. 被験物質及び動物

被験物質として MP Biomedicals より製造ロット番号 S2187 の DSS (分子量 36-50 kDa) を購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

B-1-2. 動物試験

6 週齢の雄性 F344 ラット各群 4 匹に、DSS を 1.0 または 3.0 % の濃度で 1 週間自由飲水投与した。投与期間中は一般状態及び便性状を観察するとともに、体重及び飲水量測定を実施した。明らかな一般状態の悪化を示した動物については、イソフルラン深麻酔下にて腹部大動脈より放血安楽殺した。計画屠殺例については投与期間終了後にイソフルラン深麻酔下にて腹部

大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に小腸及び大腸を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

B-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子のF344ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

B-2-1. 被験物質及び動物

被験物質として Thermo Fisher Scientific より平均一次粒径 0.03 μm 及び 0.3 μm のポリスチレン粒子懸濁液を購入した。動物は5週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

B-2-2. 動物試験

6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 4 匹に、粒径 0.03 μm または 0.3 μm のポリスチレ

ン粒子を 200 または 1000 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、対照群には蒸留水を同様に投与した。投与後 14 日間は一般状態を観察するとともに、体重及び摂餌量測定を行い、投与後 15 日目にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に全身臓器の肉眼観察を行うとともに、肝臓、腎臓、脾臓及び心臓を摘出し、重量測定を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

C-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定

実験期間中、3.0% 濃度群の全例で軽度から重度の血便及び体重増加抑制の傾向がみられ、うち 2 例が投与開始 5 日後に切迫屠殺となった。1.0% 濃度群では実験期間中に 1 例で肛門周囲被毛の汚れがみられたものの、体重増加抑制の傾向等は認められなかった。

病理組織学的検索では、直腸においては 3.0% 濃度群で出血、陰窩膿瘍やリンパ組織過形成を伴うび慢性的潰瘍性病変がみられた一方で、1.0% 濃度群では杯細胞減少を伴う散在性の糜爛性病変が認められた。結腸においては 3.0% 濃度群で粘膜上皮の好塩基性化や固有層及び粘膜下織におけるび慢性的炎症細胞浸潤がみられた一方で、1.0% 濃度群では固有層におけ

る散在性の炎症細胞浸潤のみが認められた。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかった。

C-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移については、ポリスチレン粒子投与群と対照群間に有意な差はみられなかったが、粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群では雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められた。摂餌量についてはポリスチレン粒子投与群と対照群間に差はみられなかった。

臓器重量の検索では、雌の粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群において肝臓の絶対重量の有意な低下が認められた。

D. 考察

D-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定

本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットを用いたポリスチレン粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できる DSS の製造ロットを探索するとともに、DSS の自由飲水投与の至適濃度を設定する目的で、まずは F344 ラットに起炎作用を發揮する濃度の DSS を 1 週間自由飲水投与した。

その結果、製造ロット番号 S2187 の DSS において、3.0 % 濃度群では全例にび慢性の潰瘍性病変が誘発されたのに対し、1.0 % 濃度群では全例に散在性の糜爛性病変が誘発されたことから、製造ロット番号 S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に

腸炎を誘発できることが明らかになった。一方で、DSS 誘発腸炎モデルラットを用いたポリスチレン粒子の反復経口投与実験を行う上では、若干軽度の腸炎が持続的に誘発されたラットを用いるのが適切と考えられたことから、3.0 % の投与濃度は不適と判断した。

令和元年度から 2 年度にかけて、3.0 % よりも低濃度の DSS を用い、ポリスチレン粒子の反復経口投与実験の実験期間中に軽度な腸炎を持続的に誘発できる DSS 自由飲水投与の実験条件を検討している。

D-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットを用いたポリスチレン粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、ポリスチレン粒子の至適投与用量を設定する目的で、雌雄 F344 ラットに粒径 0.3 μm または 0.03 μm のポリスチレン粒子を 0 (対照群)、200 または 1000 mg/kg 体重の投与量で単回強制経口投与した。

その結果、粒径 0.3 μm のポリスチレン粒子ではいずれの投与用量でも毒性影響は認められなかった一方で、粒径 0.03 μm のポリスチレン粒子では 1000 mg/kg 体重の投与量において雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められたことから、粒径の小さなポリスチレン粒子ほど毒性影響が強く發揮される可能性が示唆された。なお、臓器重量の検索において認められた、雌の粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群における肝臓の絶対重量の有意な低下は、絶対重量のみの変動であり、相対重量に変動は認められなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

以上の結果に基づき、今後実施する反復経口投与実験では、毒性影響がより強く發揮される可能性がある粒径 0.03 μm のポリスチレン粒子を使用し、高用量を 1000

mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200, 低用量を 40 mg/kg 体重/日とする方針を定めた。

E. 結論

E-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定

F344 ラットを用いた DSS の 1 週間自由飲水投与の結果より、製造ロット番号 S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できたものの、3.0 % の濃度では腸炎の程度が重度であったことから、現在、3.0 % よりも低濃度の DSS を用い、ポリスチレン粒子の反復経口投与実験の実験期間中に軽度な腸炎を持続的に誘発できる自由飲水投与の条件を検討している。

E-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

DSS の自由飲水投与の実験条件を設定後、F344 ラットを用いたポリスチレン粒子の単回経口投与実験の結果に基づき、粒径 0.03 μm のポリスチレン粒子を使用し、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200, 低用量を 40 mg/kg 体重/日として、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた反復経口投与実験を実施し、健常ラットと腸炎モデルラットそれぞれについて無毒性量 (NOAEL) を決定し、毒性影響の比較を行うことに決定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tetsuya Ide, Yasuko Mizuta, Jun-Ichi Akagi, Naoko Masumoto, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Kumiko Ogawa, Young-Man Cho. A 90-day repeated oral dose toxicity study of four stereoisomers of 2,4-dimethyl-4-phenyltetrahydrofuran, a synthetic flavoring substance, in F344 rats. Regul Toxicol Pharmacol. 2020, doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104664. [Epub ahead of print]
- 2) Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Tomomi Morikawa, Kumiko Ogawa. A 13-week subchronic toxicity study of vanillin propylene glycol acetal in F344 rats. Food Chem Toxicol. 2019, 132, 110643 - 110643.
- 3) Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Kohei Matsushita, Shigehiro Tachibana, Mika Senuma, Jun-Ichi Akagi, Kumiko Ogawa. A 13-week subchronic toxicity study of hexyl acetate in SD rats. J Toxicol Pathol. 2019, 32(3), 205 - 212.

2. 学会発表

- 1) Shuji Yamashita, Young-Man Cho, Tetsuya Ide, Kumiko Ogawa, Takafumi Hirata : Imaging analysis of individual nanoparticles for biological samples using a laser ablation-ICP mass spectrometry : 7th international symposium on metallomics. 2019 海外.
- 2) 井手鉄哉, 山下修司, 平田岳史, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, Young-Man Cho, 小川久美子 : レーザープラズマ質量分析計を用いたナノ粒子イメージングによる銀ナノ粒子の粒径依存的な肝毒性メカニズム検証の試み: 第 46 回日本毒性学会学術年会. 2019 国

内.

- 3) Young-Man Cho, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 井手鉄哉, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性における抗酸化剤の影響: 第 46 回日本毒性学会学術年会. 2019 国内.
- 4) 山下修司, Young-Man Cho, 井手鉄哉, 小川久美子, 平田岳史: レーザーアブレーション ICP 質量分析計による生体試料中ナノ粒子のイメージング分析: 日本質量分析学会第 67 回質量分析総合討論会. 2019 国内.
- 5) 山下修司, 鈴木敏弘, 小川久美子, 曹永晚, 井手鉄哉, 平田岳史: レーザーアブレーション ICP 質量分析計を用いたナノ粒子イメージング: 日本分析化学会第 79 回分析化学討論会. 2019 国内.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし