

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）

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

分担研究報告書

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

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、ヒトでは腸管に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において高分子化合物を摂取した場合、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へ移行し、重篤な毒性影響が誘発される懸念がある。本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットに高分子化合物を強制経口投与した際の生体影響の差異について比較・検証するため、DSSの自由飲水投与によるラット腸炎モデル（粘膜バリア破綻モデル）を作製する。研究初年度である令和元年度は、DSS投与実験の条件設定のため、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みられた。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。

A. 研究目的

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体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカの実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているも

の、強制経口投与では2000 mg/kg体重の投与量で亜慢性毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったとの報告がある。しかしながら、ヒトでは腸管に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において高分子化合物を摂取した場合、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へ移行し、重篤な毒性影響が誘発される懸念がある。その懸念を解決するために、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の自由飲水投与によるラット腸炎モデル(粘膜バリア破綻モデル) を作製し、健常ラットと腸炎モデルラットに高分子化合物を反復強制経口投与した際の生体影響の差異について比較・検証することで、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体内挙動や毒性発現に影響を及ぼし得るかどうかを明らかにする必要がある。

しかしながら、DSS の起炎作用は分子量に依存し、分子量 36-50kDa の DSS でげっ歯類に腸炎が発生することは知られているが、同一の分子量でも製造ロットによって起炎作用が大きく異なることが知られている。

そこで、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 の至適濃度を検討するため、ラットを用いた DSS の 1 週間自由飲水投与を実施した。

B. 研究方法

B-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-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静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。

C. 研究結果

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の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 (Figure 1)。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のみが認められた (Figure 2)。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。

D. 考察

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の至適自由飲水投与濃度を設定する目的で、まずはF344ラットに起炎作用を発揮する濃度の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。

E. 結論

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実験条件を検討している。

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. 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

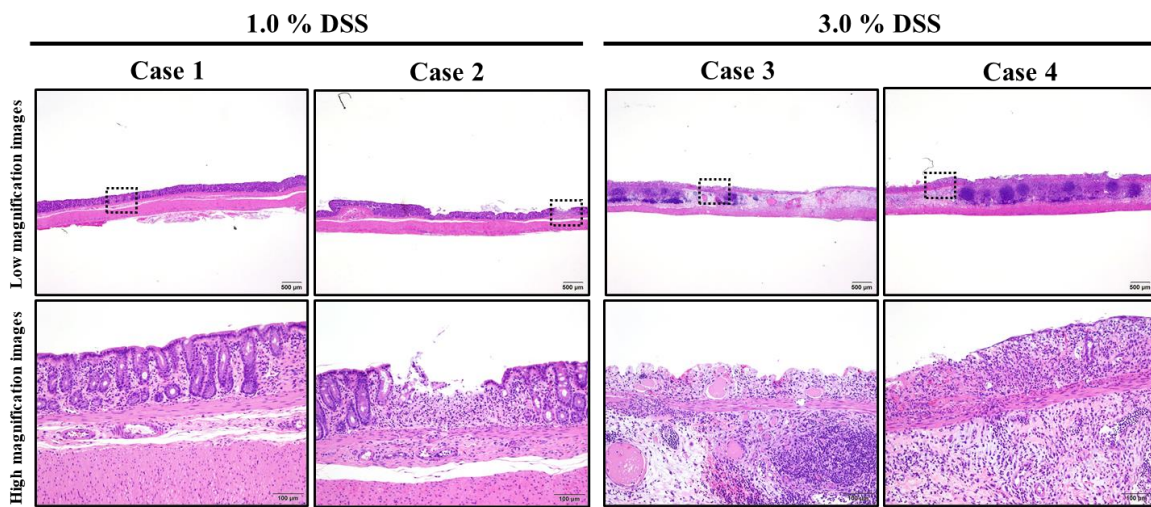


Figure 1. Histopathological changes in the rectum of F344 rats treated with DSS for 1 week.

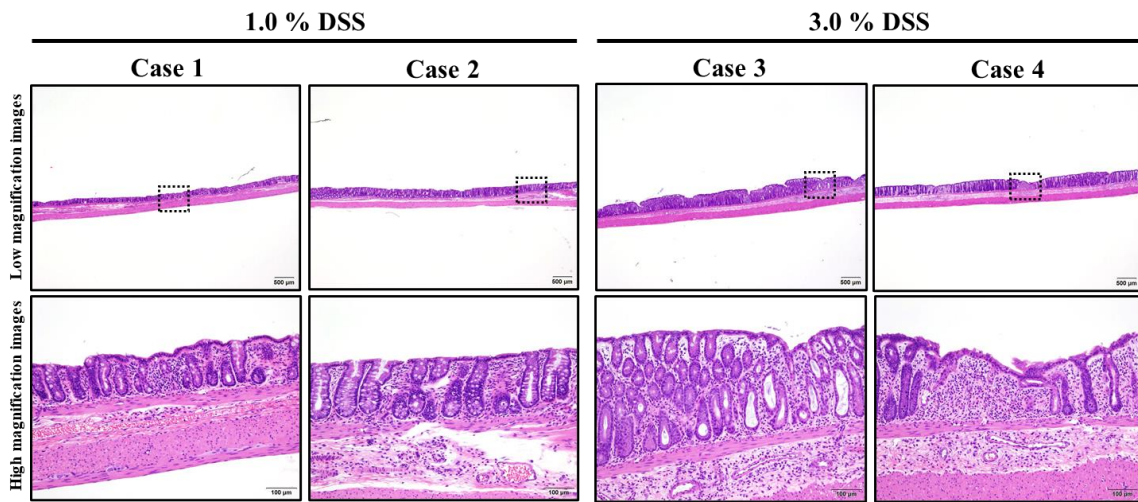


Figure 2. Histopathological changes in the colon of F344 rats treated with DSS for 1 week.