

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

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

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）

研究要旨

食品中から検出されている高分子化合物の一つであるポリスチレン粒子については、生物に対する物理的影響を検証した報告が多く存在する。水生生物に対しては、マイクロスケール（一次粒径 0.1-5000 μm ）のポリスチレン粒子であれば毒性影響を誘発しない一方で、ナノスケール（一次粒径 0.001-0.1 μm ）のポリスチレン粒子では生存率、摂食率、代謝反応、免疫反応、抗酸化作用の低下や神経症状の誘発等の毒性影響に関する報告がされている。しかしながら、動物に対しては、マイクロスケールのポリスチレン粒子を用いたマウスの経口投与による亜急性毒性試験において、腸管や他の主要臓器に毒性影響はみられなかったとの報告があるものの、ナノスケールのポリスチレン粒子については詳細に検討した報告はなく、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。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であるポリスチレン粒子を反復経口投与した際の生体影響の差異について比較・検証することを目的に、ポリスチレン粒子の至適投与用量を設定する。研究初年度である令和元年度は、ナノスケール及びマイクロスケールそれぞれのポリスチレン粒子のラットを用いた単回経口投与実験を実施した。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。その結果、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。

A. 研究目的

食品中から検出されている高分子化合物の一つであるポリスチレン粒子については、生物に対する物理的影響を検証した報告が多く存在する。

水生生物に対しては、マイクロスケール（一次粒径 0.1-5000 μm ）のポリスチレン粒子であれば毒性影響を誘発しない一方で、ナノスケール（一次粒径 0.001-0.1

μm ）のポリスチレン粒子では生存率、摂食率、代謝反応、免疫反応、抗酸化作用の低下や神経症状の誘発等の毒性影響に関する報告がされている。一方で、動物を用いた研究はほとんどないものの、動物に対しては、マイクロスケールのポリスチレン粒子を用いたマウスの経口投与による亜急性毒性試験において、マウスの腸管や他の主要臓器に毒性影響はみられなかったとの報告があるものの、ヒト

への影響を評価するためのデータは国内外ともに乏しいのが現状である。また、ナノスケールのポリスチレン粒子については詳細に検討した報告はない。

従って、ナノスケールのポリスチレン粒子では、マイクロスケールのポリスチレン粒子とは異なった特有の毒性影響を発現する可能性がある。

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、ポリスチレン粒子の至適投与用量を設定するため、令和元年度はナノスケール及びマイクロスケールそれぞれのポリスチレン粒子について、ラットを用いた単回経口投与実験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 被験物質及び動物

被験物質として Thermo Fisher Scientific より平均一次粒径 $0.03\ \mu\text{m}$ 及び $0.3\ \mu\text{m}$ 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. 動物試験

6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 4 匹に、粒径 $0.03\ \mu\text{m}$ または $0.3\ \mu\text{m}$ 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り扱い規定に基づき、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 $0.03\ \mu\text{m}$ 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 (Figure 3)。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 $0.03\ \mu\text{m}$ 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 (Table 1)。

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、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発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。

E. 結論

DSS 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用い、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) 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.
- 2) 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

該当なし

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

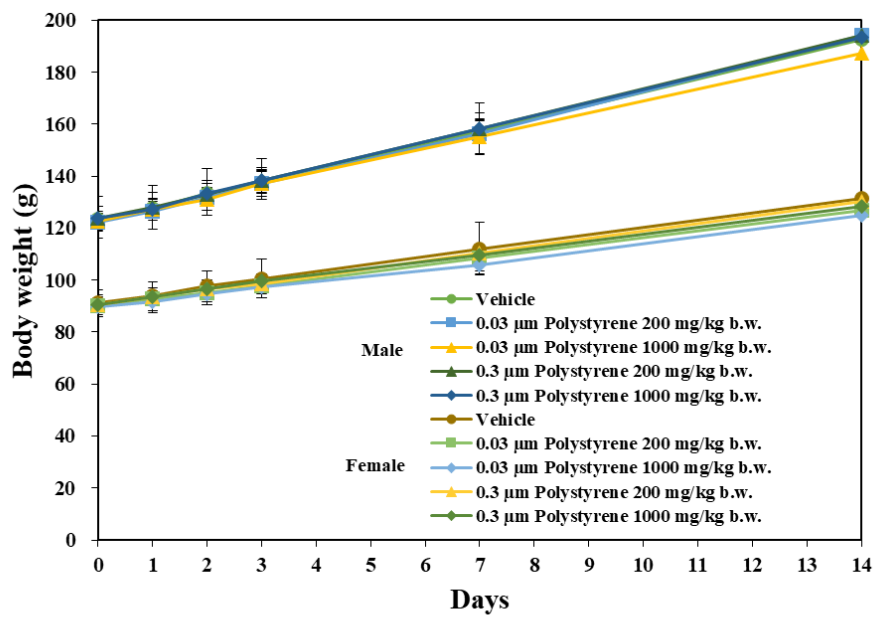


Figure 3. Body weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

Table 1. Final body weights and organ weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

Sex	Male				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 µm nano-polystyrene		0.3 µm micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	1	2	3	4	5
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	192.800 ± 13.392	194.325 ± 8.538	187.475 ± 8.487	194.250 ± 9.374	193.550 ± 3.712
Absolute (g)					
Heart	0.673 ± 0.061	0.664 ± 0.046	0.644 ± 0.042	0.686 ± 0.036	0.659 ± 0.034
Spleen	0.505 ± 0.044	0.517 ± 0.028	0.489 ± 0.012	0.520 ± 0.027	0.509 ± 0.023
Liver	7.635 ± 0.538	7.681 ± 0.329	7.275 ± 0.440	7.608 ± 0.568	7.446 ± 0.059
Kidneys	1.435 ± 0.095	1.469 ± 0.101	1.395 ± 0.071	1.426 ± 0.085	1.392 ± 0.040
Relative (g%)					
Heart	0.349 ± 0.014	0.341 ± 0.009	0.344 ± 0.018	0.353 ± 0.016	0.341 ± 0.015
Spleen	0.261 ± 0.007	0.266 ± 0.007	0.261 ± 0.008	0.267 ± 0.008	0.263 ± 0.007
Liver	3.960 ± 0.060	3.953 ± 0.067	3.879 ± 0.119	3.913 ± 0.123	3.848 ± 0.067
Kidneys	0.744 ± 0.005	0.756 ± 0.043	0.744 ± 0.009	0.734 ± 0.027	0.719 ± 0.015

Sex	Female				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 µm nano-polystyrene		0.3 µm micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	6	7	8	9	10
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	131.450 ± 5.729	127.000 ± 3.595	124.900 ± 7.217	130.425 ± 4.055	128.550 ± 2.777
Absolute (g)					
Heart	0.475 ± 0.031	0.467 ± 0.024	0.471 ± 0.039	0.477 ± 0.018	0.474 ± 0.029
Spleen	0.376 ± 0.026	0.355 ± 0.023	0.353 ± 0.015	0.373 ± 0.020	0.358 ± 0.017
Liver	4.870 ± 0.179	4.779 ± 0.065	4.492 ± 0.333 *	4.851 ± 0.095	4.579 ± 0.072
Kidneys	1.008 ± 0.060	0.980 ± 0.025	1.005 ± 0.051	1.013 ± 0.040	0.976 ± 0.029
Relative (g%)					
Heart	0.362 ± 0.060	0.368 ± 0.025	0.377 ± 0.019	0.366 ± 0.003	0.369 ± 0.029
Spleen	0.286 ± 0.011	0.280 ± 0.024	0.283 ± 0.007	0.286 ± 0.013	0.278 ± 0.017
Liver	3.707 ± 0.117	3.766 ± 0.144	3.594 ± 0.105	3.721 ± 0.056	3.562 ± 0.025
Kidneys	0.767 ± 0.036	0.772 ± 0.031	0.805 ± 0.012	0.777 ± 0.016	0.759 ± 0.019

Values are means ± standard deviation.

* Significantly different from the Vehicle group at p < 0.05