

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井手 鉄哉

令和2年（2020）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

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	-----	1
---	-------	---

井手鉄哉

II. 分担研究報告

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	-----	7
--	-------	---

井手鉄哉

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	-----	12
--	-------	----

松下幸平

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
---------------------	-------	----

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。

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。

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

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

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

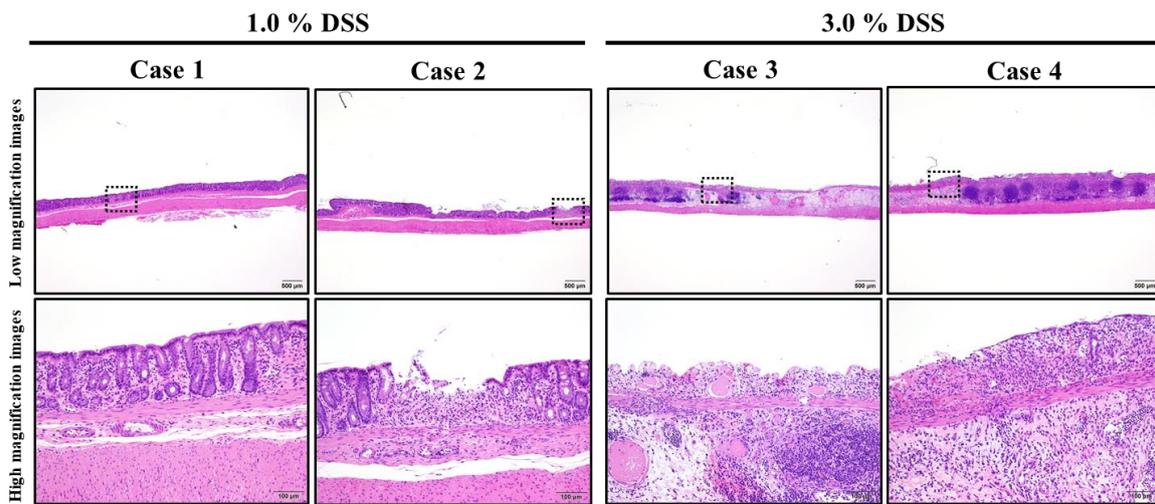


Figure 1. Histopathological changes in the rectum of F344 rats treated with DSS for 1 week.

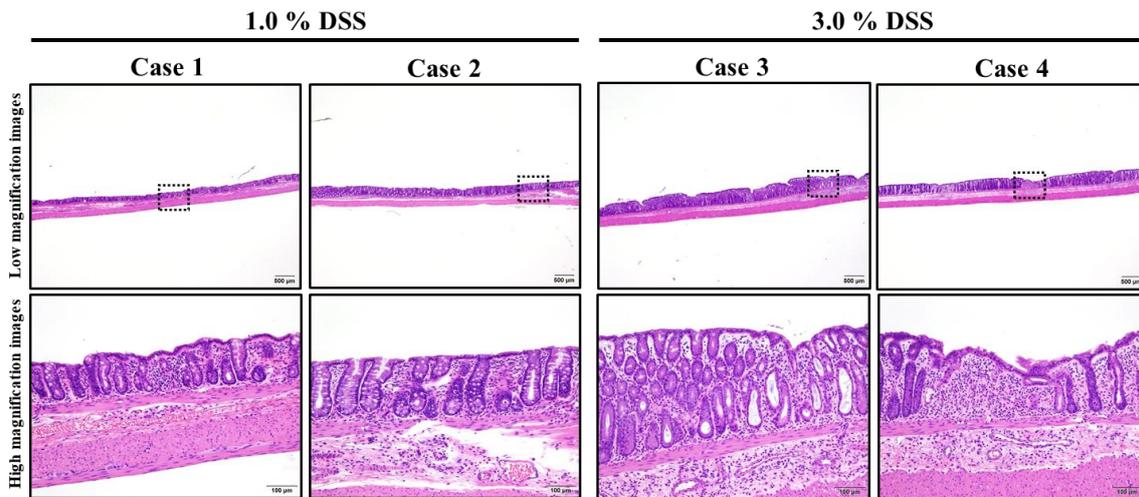


Figure 2. Histopathological changes in the colon of F344 rats treated with DSS for 1 week.

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

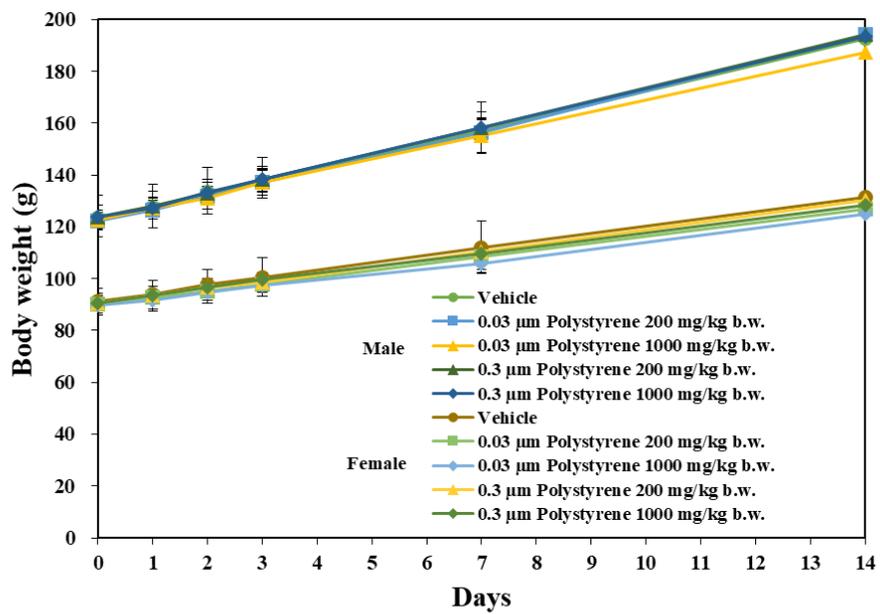


Figure 3. Body weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Regulatory Toxicology and Pharmacology</i>	印刷中		2020
Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Tomomi Morikawa, Kumiko Ogawa.	A 13-week subchronic toxicity study of vanillin propylene glycol acetal in F344 rats.	<i>Food and Chemical Toxicology</i>	132	110643	2019
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.	<i>Journal of Toxicologic Pathology</i>	32	205-212	2019

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 井手 鉄哉 (イデ テツヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴夫

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 松下 幸平 (マツシタ コウヘイ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。