

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

総合分担研究報告書

腸炎モデルラット作製のための条件検討及び高分子ナノマテリアルについての情報収集

研究分担者：井手 鉄哉（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官，独立行政法人医薬品医療機器
総合機構・審査専門員）

研究要旨

近年，ポリスチレン(PS)，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．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．一方，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や金属等の粒子状物質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（一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ）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（*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492），強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の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報告されている．（*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78）．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，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)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて，健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・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明らかにすることを目的とした．

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている．ロットによって重合度合い等が異なっているとされており，我々の研究室で過去に行った検討では，ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた．また，文献においても 0.5-5% まで様々な濃度での報告があるため（<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>），適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考えられた．初年度は，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条件設定として，DSS 投与実験短期投与による影響について検討を行った．その結果，直腸においては 3% 群ではび慢性の潰瘍性病変がみられ，1% 群では散在性のびらん性病変が認められた．結腸においては 3% 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，1% 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ことから，3% 投与による炎症は高度すぎると考えられた．

次年度は，PS をはじめとする高分子ナノマテリアルの毒性に関する情報収集を実施した．結果，2021 年 1 月に，欧州委員会の Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) の専門家パネルによる化粧品中のナノマテリアルの安全性に関する提言において，潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）+スチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）（SCCS/1595/18）を取り上げていることがわかった．その他の対象としては，銀ナノ粒子（ナノ）（SCCS/1596/18），シリカ，水和シリカ，およびアルキルシリレート（ナノフォーム）で修飾されたシリカ表面（SCCS/1545/15）]があげられていた．スチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）に関しては，物理化学的，毒物学的，および暴露の側面を総合的に検討すると，他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があるとされていた．また，PubMed 検索においても，多くの関連論文が発表されているが，ナノサイズを含むポリスチレンの毒性影響については，特に *in vivo* データについては情報が限られていると考えられた．

A. 研究目的

近年、ポリスチレン(PS), 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。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。

一方, 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や金属等の粒子状物質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(一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ)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の(*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492), 強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の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報告されている(*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78)。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, 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)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて, 健康ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・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明らかにすることを目的とした。

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている。ロットによって重合度合い等が異なっているとされており, 我々の研究室で過去に行った検討では, ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた。また, 文献においても 0.5-5%まで様々な濃度での報告があるため

(<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>), 適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考え, PS の反復投与試験に先立って DSS 投与の条件設定を実施した。

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①-短期投与

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。

動物試験では, 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。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 染色標本作製して病理組織学的検査を行った。

B-2. 情報収集

PS を含む高分子ナノマテリアルについて, Web 検索により, 近年の欧州委員会における毒性評価情報及び文献情報を収集した。

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-短期投与

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 1-1)。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 1-2)。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。

C-2. 情報収集

2021 年 1 月に, 欧州委員会の Scientific Committee

on Consumer Safety (SCCS) の専門家パネルは化粧品中のナノマテリアルの安全性に関する提言を提出した

(https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_239.pdf). その中で、潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)+スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)(SCCS/1595/18)を取り上げている。その他の対象としては、銀ナノ粒子(ナノ)(SCCS/1596/18)、シリカ、水和シリカ、およびアルキルシリレート(ナノフォーム)で修飾されたシリカ表面(SCCS/1545/15)]をあげている。

スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)に関する記述

・物理化学的側面

1. 他の物質を含むスチレン/アクリレート共重合体(ナノビーズ)は、ナノスケール(20-160 nm)の粒子で構成されている(SCCS/1595/18)。

2. スチレン/アクリレート共重合体は、ナノスケールの非溶解性粒子で構成されており、報告されている溶解度は0.01 mg/L未満であり、水性媒体へのそれ以上の溶解はない(SCCS/1595/18)。

3. 不溶性ポリマーの性質により、スチレン/アクリレート共重合体は、一般に不溶性、非分解性、および本質的に持続性である他のマイクロ/ナノプラスチックと類似している(Ganesh Kumar et al, 2020)。したがって、SCCSは、スチレン/アクリレート共重合体の安全性評価に使用できる可能性のある他のマイクロ/ナノプラスチックの物理化学的および毒物学的側面に関する入手可能なデータも調査した。

・毒物学的側面

4. マイクロ/ナノプラスチック(スチレン/アクリレート共重合体を含む)は、潜在的な毒物学的危険性について以下の様に報告されている。

遺伝毒性:

PS ナノ粒子(100 nm)は、ヒト線維芽細胞の *in vitro* での細胞質分裂ブロック小核(CBMN)アッセイでDNA損傷を誘発することが示されている(Poma et al, 2019)。PS ナノ粒子(~100 nm)の表面にタンパク質コロナが存在すると、コメットアッセイでリンパ球のDNA損傷が増加することが報告されている(Gopinath et al, 2019)。しかし、CHO-K1細胞におけるPS ナノ(47-64 nm)およびマイクロ(565-597 nm)粒子の小核アッセイからは、否定的な結果が報告されている(Hesler et al, 2019)。

一般毒性:

ナノプラスチックに関するほとんどの懸念は、そ

の持続性と環境への影響に関連している(Ng et al.2018, Alimba and Faggio 2019, Stapleton 2019, Yong et al.2020, Ganesh Kumar et al, 2020)。最近では、哺乳類とヒトの毒性に関する懸念がより注目を集めているが、データは一般的に不足している(Lehner et al. 2019, Chang et al. 2020, Stapleton 2019, Yong et al. 2020, Allan et al. 2020 でレビューされている)。プラスチック粒子の考えられる毒性作用は、プラスチック自体の潜在的な毒性、および浸出性添加剤や吸着汚染物質との複合毒性に起因している(Chang et al, 2020)。

インビトロ研究では、PS粒子は、Caco-2とHT29-MTX-E12またはBeWo b30細胞の共培養に対して急性毒性はなく、腸および胎盤の障壁を通過しなかったが、ナノ(47-64 nm)およびマイクロ(565-597 nm) PS粒子は、細胞への取り込みと細胞内蓄積を示した(Hesler et al, 2019)。同じ研究で、NIH/3T3およびマウス胚性幹細胞について25µg/mLを超える用量でPS微粒子の細胞毒性が観察され、胚性幹細胞における心筋細胞の分化は、1µg/mLの用量への曝露後に妨げられた。微粒子は、細胞毒性と胚毒性の両方の点でナノ粒子よりも毒性が高いことがわかった(ナノ粒子IC50>100µg/mL, 微粒子IC50>12.6µg/mL)が、どちらも弱毒性とされた。

PS ナノプラスチック(粒子サイズ~100 nm)では、10µg/mLの暴露量でかなりの細胞毒性と溶血が観察されたが、粒子表面でのタンパク質コロナ形成後に劇的に増加した(Gopinath et al, 2019)。

5. SCCS/1595/18で評価された2つの物質(マンヌロン酸メチルシラノールとヒアルロン酸ジメチルシラノール)の毒性データは入手できない。ただし、シラノールは、シラノール基(≡Si-OH; =Si(OH)2)が化学構造に組み込まれているさまざまな複雑さの化合物で構成されている。シラノールは、シリカ粒子の表面に化学官能基として存在し、シリコンナノ粒子の親水性(Napierska et al, 2010)を規定している。角膜毒性に関して、長鎖シラノール末端化合物は短鎖シラノール末端化合物よりも毒性が高いことが明らかとなった(Green et al.1992)。

・暴露の側面

6. 他の化合物が充填されたスチレン/アクリレート共重合体ナノビーズの使用の目的は、制御された拡散により皮膚レベルで化合物の徐放を提供するとされている。SCCSは、これを化粧品にナノスケールで物質を使用する新しい方法のテストケースと見なしている。このタイプのアプリケーションは、多くの他の(生物活性)物質を多数のアプリケーションで使用する機会を開く可能性があり、その結果、安全性がまだ評価されていないナノカプセル化材料への消費者の曝露が広がることになる。

・その他の側面

7. スチレン/アクリレート共重合体ナノビーズにカプセル化された物質に関する情報は事実上存在しないが、疎水性プラスチック製のナノサイズの担体に物質をカプセル化すると、カプセル化されていない形態の同じ物質と比較して、その毒物学的影響をさらに変化させる可能性のある生物動力学的挙動を示す可能性があると考えられる。このようなナノキャリアは、皮膚または他の全身器官のより深いところに物質を送達する可能性があるため、このタイプのアプリケーションは、さまざまな化粧品アプリケーションのために他の多数の物質をカプセル化するために使用できる。ただし、ポリマーとカプセル化物質の安全性を個別に示すことができたとしても、ナノスケールの実体の形でまとめた場合、これを2つの安全性の証拠と見なすことはできないことに注意が重要である。これに関連して、SCCSは、ポリマーマトリックスにナノカプセル化された化合物の安全性を実証するのに十分なデータがない場合、そのようなアプリケーションは消費者の安全性に対する懸念を構成すると考えている。

・まとめ

物理化学的、毒物学的、および暴露の側面を総合的に検討すると、他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があると考えている。化粧品は、消費者に健康上のリスクをもたらす可能性がある。SCCSは、化粧品での材料の安全な使用をサポートするために提供された証拠を評価する準備がある。

PubMedにおける文献検索では、polystyrene nanoparticle toxicityのキーワードでも、2020年に71件、2021年も現時点(5月)で32件の文献が見られる。PS ナノ粒子が様々な細胞に取りこまれ得ることが、報告されている。

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-短期投与

健常ラットと腸炎モデルラットを用いた PS 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 PS 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。

D-2. 情報収集

欧州委員会の提言では、ナノスチレンは環境と共にほ乳類やヒトの毒性影響が懸念されるもののデータが不足しており、結論には達することができないとの見解と考えられた。

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-短期投与

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、3.0 % よりも低濃度の DSS を用い、軽度な腸炎を持続的に誘発できる自由飲水投与の条件検討が必要と考えられた。

E-2. 情報収集

ナノサイズを含む、PS の毒性影響については、情報が不十分とされていた。特に、海外において *in vivo* のデータは、ほとんど得られないことが、評価をより困難にしていると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

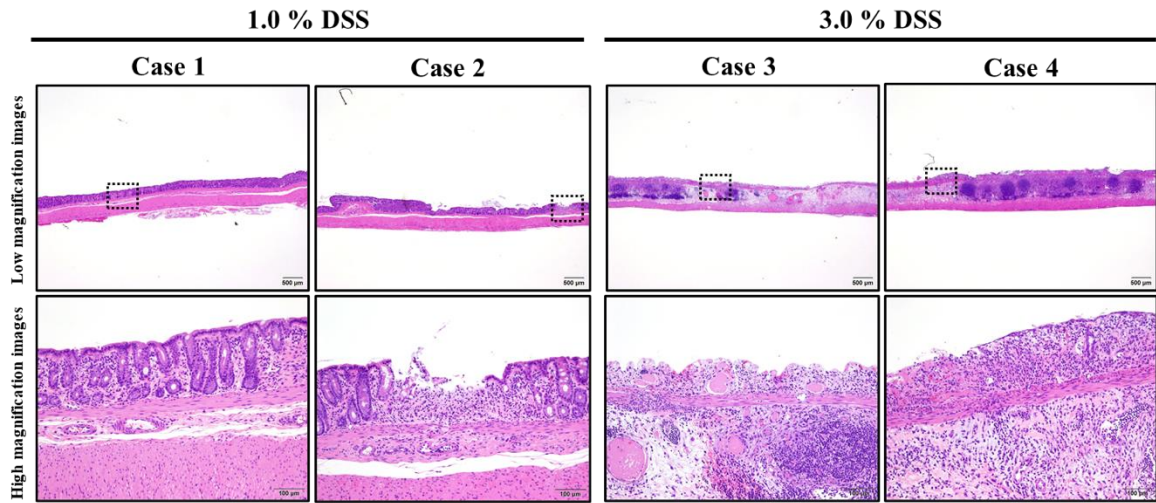


Figure 1-1. Histopathological changes in the rectum of F344 rats treated with DSS for 1 week.

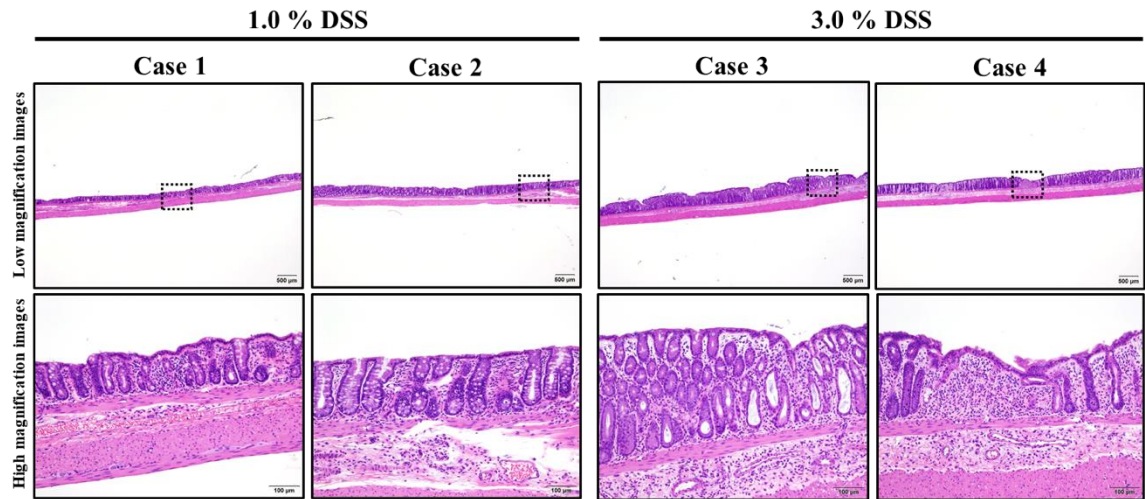


Figure 1-2. Histopathological changes in the colon of F344 rats treated with DSS for 1 week.

別紙4

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
該当なし					