

## 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

研究代表者： 松下 幸平 （国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官）  
研究分担者： 井手 鉄哉 （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

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  $\mu\text{m}$ ）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  $\mu\text{m}$ ）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。本年度は、ラットに持続的な腸炎を誘発できる DSS の投与濃度を決定するための予備試験として、DSS を 1 週おきに 6 週間 1% または 2% の濃度で飲料水投与し、経時的に大腸の炎症所見を評価した。その結果、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1% の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。本プロトコールに基づいて投与開始 1 週間後から、F344 ラットに粒径 30 nm 及び 300 nm 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 28 日間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が適切と考えられた。

## 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  $\mu\text{m}$  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明らかにすることを目的としている。

## B. 研究方法

## B-1. 被験物質及び動物

初年度は、高分子化合物としてポリスチレン(PS)粒子を選定し、PS 粒子の投与量設定試験および DSS のロットチェック（起炎作用評価）試験を実施し、PS 粒子の投与量およびラットに安定的に腸炎を誘

発できる DSS の製造ロットを決定した。本年度は、ラットに持続的な腸炎を誘発できる DSS の投与濃度を決定するための予備試験として、DSS を 1 週おきに 6 週間 1% または 2% の濃度で飲料水投与し、経時的に大腸の炎症所見を評価した。

DSS は、MP Biomedicals の製造ロット番号 S2187 (分子量 36-50 kDa) を使用した。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±1°C、湿度 55±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 ラットを平均体重が均一となるように対照群 8 匹、1% 及び 2% DSS 群各 16 匹割り付けた。DSS 投与群には DSS を 1 または 2% の濃度で 1 週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の 1 週間は通常の水道を摂取させるサイクルを 3 回繰り返した。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。実験開始 1 週後、2 週後、4 週後および 6 週後に対照群は 2 匹ずつ、DSS 投与群は 4 匹ずつ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 (Figure 1)。剖検時に大腸を摘出し、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。

(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

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。経過中の体重変化は、2% DSS 投与群でやや増加抑制傾向が見られたが、統計学的な有意差は認めなかった。(Figure 2) また、飲水量 (Figure 3) 及び摂餌量 (Figure 4) についても DSS 投与群と対照群の間に有意な差異は見られなかった。一般状態については、DSS 投与群では肛門周囲被毛の汚れ及び下痢が観察され、1% よりも 2% でより高度の傾向が見られた。また、DSS 投与期間直

後の時点ではより高度の所見を示す動物が多い傾向があった。2% 群では、出血性下痢も観察され、DSS 投与の休止 1 週後も半数以上の動物で何らかの所見が認められた。(Table 1) 大腸の病理組織学的観察 (Figure 5) では、DSS 投与群では、1 週後から直腸及び結腸にびらんまたは潰瘍及び粘膜上皮の再生像が観察され、1% よりも 2% でより高度の傾向が見られた。特に、直腸の変化がより強く、DSS 投与の休止 1 週後にも全例で何らかの所見が観察された。(Table 2)

## D. 考察

これまでに実施した検討から、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1% の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。本プロトコールに基づいて投与開始 1 週後から、F344 ラットに粒径 30 nm 及び 300 nm 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 28 日間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が適切と考えられた。

## E. 結論

1% の 36-50 kDa DSS を 1 週間毎に間欠的に飲水投与するプロトコールで持続的に大腸炎を誘発可能であることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

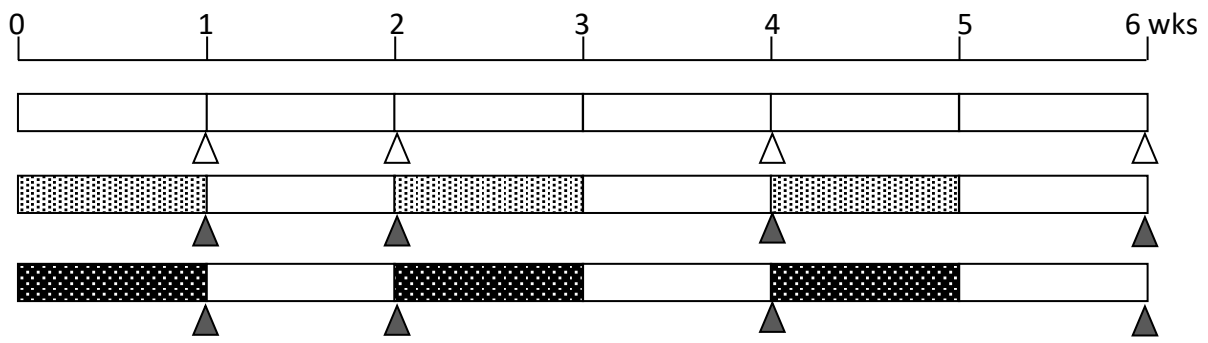
該当なし

## 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



Animals ; F344 male rats (total 40 rats)

▨ ; 1% DSS (dextran sulfate sodium MW 36,000-50,000) in drinking water

■ ; 2% DSS (dextran sulfate sodium MW 36,000-50,000) in drinking water

△ ; sacrifice 2 rats/point

▲ ; sacrifice 4 rats/point

Examination ; body weight, food intake, water intake, macroscopic exam  
 histopathology (colon, rectum)

Figure 1. Experimental protocol

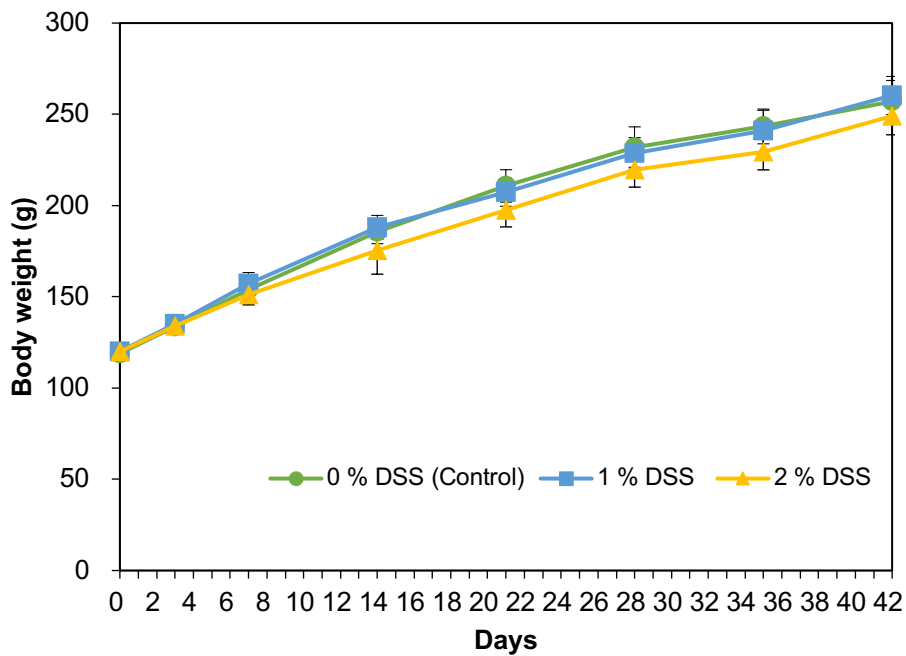


Figure 2. Body weight change curves

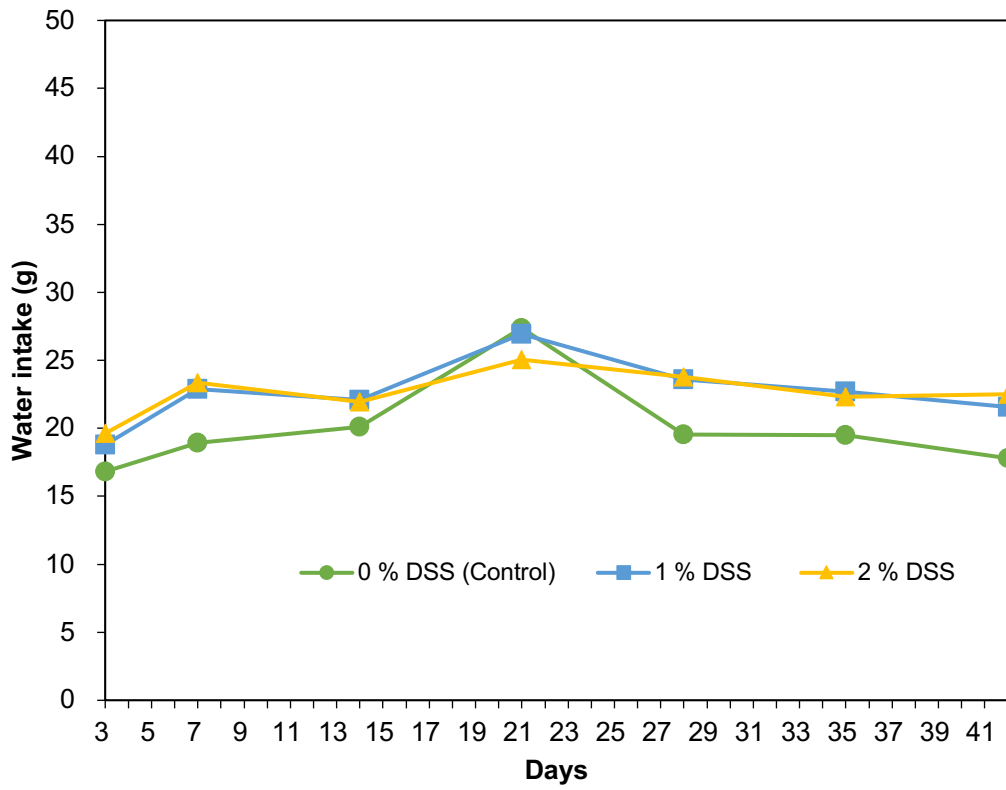


Figure 3. Water consumption curves

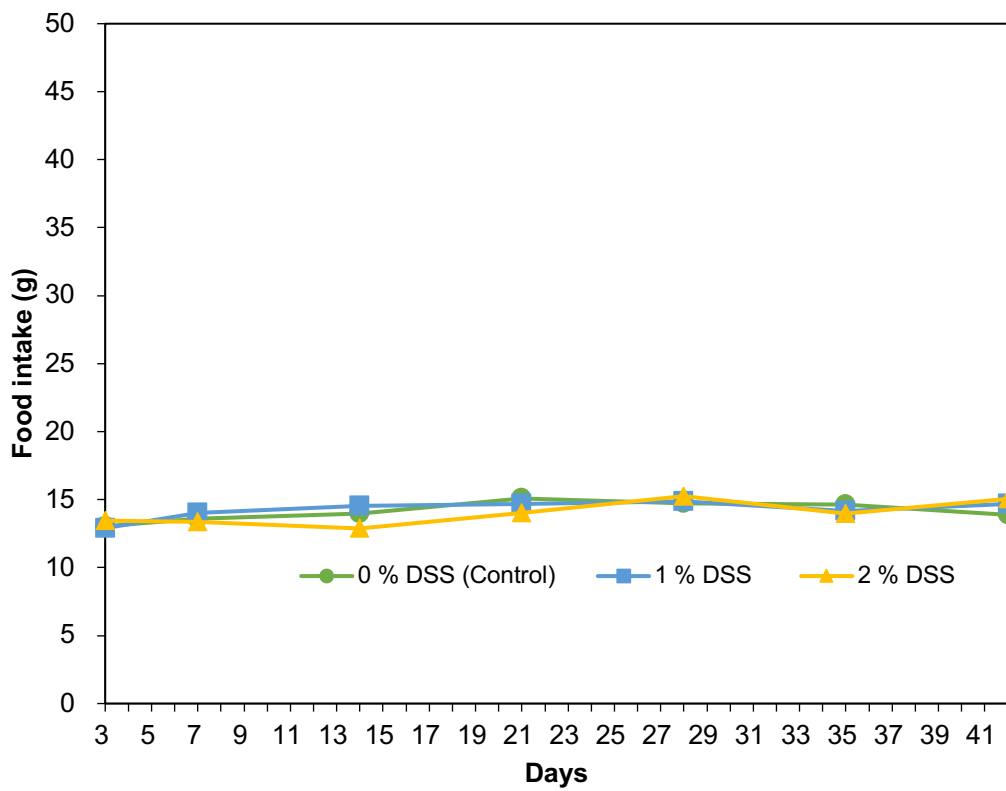


Figure 4. Food consumption curves

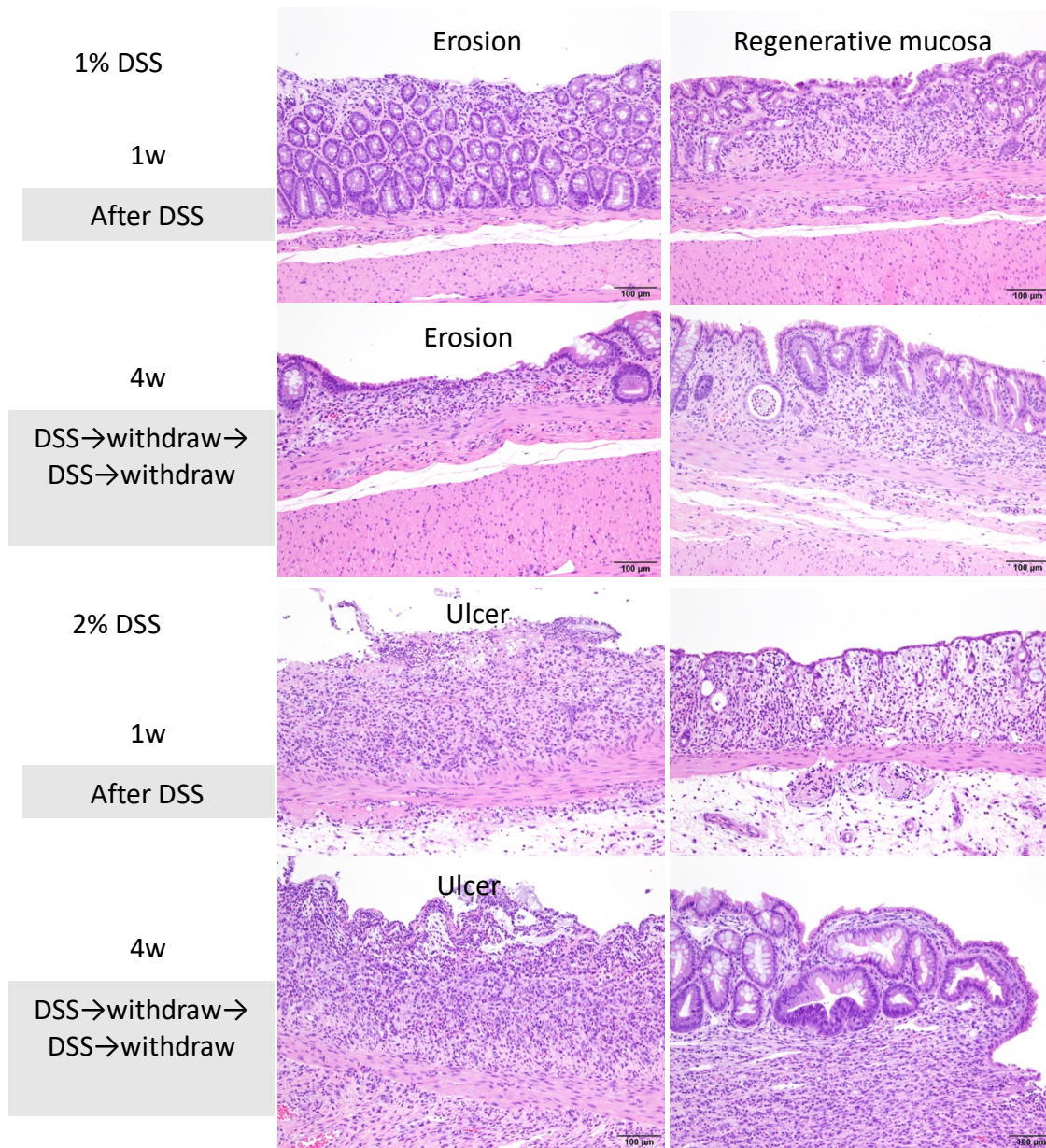


Figure 5. Histopathological lesion in the rectum of rats administered DSS

Table 1. Macroscopic observation of the rats treated with DSS

Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			3 weeks*			4 weeks			5 weeks*			6 weeks		
		0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
Number of animal		8	16	16	6	12	12	4	8	8	4	8	8	2	4	4	2	4	4
Dirt on the hair around the anus		0	8	9	0	3	8	0	5	0	0	4	5	0	1	0	0	4	4
Diarrhea		0	0	2	0	1	3	0	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0
Bloody diarrhea		0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1	4	0	0	0

\*: At the end of the period of DSS administration

Table 2. Microscopic observation in the rectum and colon of the rats treated with DSS

Organs	Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			4 weeks			6 weeks		
			0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
			2	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4
Rectum	Erosion/ulcer (1/2/3)		0	4 (3/1/0)	4 (1/1/2)	0	1 (1/0/0)	4 (2/1/1)	0	0 (0/0/0)	4 (1/3/0)	0	2 (2/0/0)	3 (1/2/0)
	Regeneration, mucosal epithelium (1/2/3/4)		0	4 (4/0/0/0)	4 (0/1/2/1)	0	4 (4/0/0/0)	4 (1/1/2/0)	0	4 (0/4/0/0)	4 (0/2/2/0)	0	4 (0/1/3/0)	4 (0/0/0/4)
Colon	Erosion/ulcer (1)		0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Regeneration, mucosal epithelium (1)		0	0	4	0	0	4	0	2	4	0	1	4

—: No abnormalities detected, 1: Minimal (1-10 %), 2: Mild (11-25 %), 3: Moderate (26-50 %), 4: Severe (51 < %)

\*: At the end of the period of DSS administration