

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

総括研究報告書

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。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。また、ポリスチレンを含む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。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発出した。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している。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。

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）

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 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。また、海外におけるポリスチレンを含むナノマテリアルの毒性に関する情報収集を行った。

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 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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。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染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

B-3. 情報収集

ポリスチレンを含む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。

(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, 2. 持続的大腸炎モデルの確立

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。また、飲水量及び摂餌量についても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。大腸の病理組織学的観察では、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。

C-3. 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發出した

(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：

ポリスチレンナノ粒子（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）。ポリスチレンナノ粒子（～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 細胞におけるポリスチレンナノ（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、ポリスチレン粒子は、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）ポリスチレン粒子は、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 25 μ g / mL を超える用量でポリスチレン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、1 μ g / 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>100 μ g / mL、微粒子 IC50>12.6 μ g / mL）が、どちらも弱毒性とされた。

ポリスチレンナノプラスチック（粒子サイズ～100 nm）では、10 μ g / 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（ \equiv 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。ポリスチレンナノ粒子が様々な細胞に取りこまれ得ることなどが、報告されている。

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。

また、欧州委員会の提言では、ナノスチレンは環境と共には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

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。また、ナノサイズを含む、ポリスチレンの毒性影響については、情報が不十分とされている。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る。

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