

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21725

研究課題名(和文) ナノプラスチックによる消化管の炎症反応誘導機構の解明とリスク評価法の確立

研究課題名(英文) Mechanism of inflammatory response on digestive tract by plastic nanoparticles

研究代表者

市原 佐保子 (Ichihara, Sahoko)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20378326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：海に漂うプラスチックの破片は小さな粒子に碎け、マイクロプラスチックおよびナノプラスチックとなるが、これらのヒトへの影響は未だ明らかではなく、その生体影響の解明が求められている。本研究では、ナノ粒子の表面電荷の違いによる腸上皮細胞への影響と50 nmと200 nmのポリスチレン粒子の影響を検討した。その結果、正または負に表面荷電した粒子は腸上皮細胞の炎症反応を誘導する可能性があること示唆された。一方、市販のポリスチレンのマイクロ/ナノ粒子の曝露では、腸上皮細胞における炎症誘発性反応は認められなかった。紫外線などにより表面電荷が変化したプラスチック粒子のリスク評価が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は、腸内細菌叢に対する免疫応答機構の破綻に加え、遺伝因子や食事、ストレスなどの環境因子が関与する多因子疾患である。最近、経口摂取されたナノ粒子は、炎症性腸疾患誘導の過程で炎症反応を増強する可能性が示唆されている。そのため、マイクロ/ナノプラスチックの消化管に対するリスク評価法の確立が求められている。本研究により、紫外線により劣化したプラスチックによる影響やプラスチックに吸着する環境汚染化学物質を考慮した複合曝露による影響の検討が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Plastic fragments in the sea break into small particles and become microplastics and nanoplastics, but their health effects on humans are still unclear. In the present study, we first investigated the effects of different surface charges of nanoparticles on intestinal epithelial cells. The results suggested that positively or negatively surface-charged particles induce pro-inflammatory responses in intestinal epithelial cells. When 50 or 200 nm polystyrene particles were exposed in intestinal epithelial cells, the commercially available polystyrene particles did not induce pro-inflammatory responses in the cells. It is required to assess the risk regarding biological effects of micro/nanoplastic particles degraded by ultraviolet rays.

研究分野：環境医学

キーワード：ナノ粒子 プラスチック 腸上皮細胞 リスク評価

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界中でプラスチックの使用の増加により海や水域が汚染し、プラスチック廃棄物の環境や野生動物への影響に社会的関心が高まっている。海に漂うプラスチックの破片は小さな粒子に砕けていき、マイクロプラスチックおよびナノプラスチックとなるが、これらのヒトへの影響は未だ明らかではなく、生体影響の解明が求められている。経口摂取されたナノプラスチックは消化管内腔に取り込まれ大腸炎を引き起こす可能性が懸念されるが、ナノプラスチックによる消化管炎症反応の誘導・増悪機構については明らかにされていない。物質が100ナノメートル以下になると、比表面積が格段に大きくなり、ヒトに対する未知の有害性リスクを有する可能性が懸念され、そのリスク評価が待たれている。ナノサイズの粒子のリスク評価に関して、多くの国内外の研究課題は、吸入曝露装置開発やアスベストによる中皮腫発症の問題を対象とし、主に肺および気管支への影響に特化しているが、研究代表者は、ナノサイズの粒子の血管および消化管への影響に対するリスク評価とその作用機序の解明に焦点を当て、研究を進めてきた。最近では、ゼブラフィッシュに蛍光ナノシリカ粒子を投与し、その影響を報告した。また、ナノサイズの粒子による消化管における炎症反応の増強とその作用機序を明らかにしてきた。ナノ粒子による腸上皮細胞への影響の解明は、我が国で増加している炎症性腸疾患、さらに環境要因が惹起する炎症に関連する発がんの予防法の確立にも寄与する。

### 2. 研究の目的

近年我が国では、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患の罹患率が増加している。特に、潰瘍性大腸炎は、毎年約5千人ずつ患者数が増加しており、疾患の発症年齢のピークが10 - 20歳代であることから、生活の質の低下や発がんリスクの上昇という観点からも、我が国において克服すべき重要な消化器疾患である。炎症性腸疾患は、腸内細菌叢に対する免疫応答機構の破綻に加え、遺伝因子や食餌、ストレスなどの環境因子が関与する多因子疾患であることが示されている。最近、経口摂取されたナノ粒子は、消化管内腔の粘膜を通過し、腸管上皮細胞さらに腸管免疫に重要な役割を果たしているパイエル板のmicrofold cell (M-細胞)に取り込まれるとの報告がなされており、ナノ粒子は炎症性腸疾患誘導の過程で炎症反応を増強する可能性が強く示唆される。本研究では、蛍光ナノ粒子を可視化させることによりその生体内での動態を観察する。さらに、ナノ粒子による腸管免疫機構の破綻を介する消化管炎症反応の誘導および増悪作用の機構を解明し、ナノプラスチックの消化管に対するリスク評価法の確立を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノ粒子の表面電荷の違いによる腸上皮細胞への影響評価

培養したヒト小腸上皮様細胞株(Caco-2)細胞を用い、小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞および未分化のCaco-2細胞に対し、表面電荷の違う二酸化ケイ素(SiO<sub>2</sub>:シリカ)ナノ粒子の影響を検討した。シリカナノ粒子は一次粒子径が30nmでローダミンにより蛍光標識され、粒子の表

面がそれぞれ正 (-NH<sub>2</sub>)、負 (-COOH)、中性 (plain) に帯電している 3 種類の粒子を用いた。まず、1~100 µg/mL の範囲で 3 種類の粒子を 24 時間曝露させ、MTS assay による細胞毒性試験を行った。次に、同様に処理した 2 種類の細胞において、蛍光標識されたシリカナノ粒子と細胞との相互作用を測定した。未分化および分化した Caco-2 細胞の両方を、1~100 µg/mL の範囲で 3 種類の表面電荷の異なるシリカナノ粒子に 3 時間曝露し、細胞におけるローダミンの蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。また、シリカナノ粒子によって誘発される細胞内の一酸化窒素 (NO) 産生は、ジアミノフルオレセイン 2 ジアセテート (DAF-2 DA) で染色し、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して測定した。DAF-2DA を未分化および分化した Caco-2 細胞の両方に投与後、1~100 µg/mL の範囲で 3 種類のシリカナノ粒子を 24 時間曝露後、細胞内の DAF の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定し、NO 産生量とした。さらに、未分化および分化した Caco-2 細胞の両方を、25 または 50 µg/mL の 3 種類の表面電荷の異なるシリカナノ粒子に 3 時間曝露後、細胞からの全 RNA を単離し、全 RNA の濃度を定量した。RNA を一本鎖 cDNA に逆転写後、ABI 7000 リアルタイム PCR システムを使用して、インターロイキン-8 の発現量を測定した。

## (2) ナノ/マイクロプラスチックの腸上皮細胞への影響評価

THP-1 マクロファージと Caco-2 細胞に対し、0~50 µg/mL の範囲で一次粒径 50 nm と 200 nm のポリスチレン粒子を 24 時間曝露させ、MTS assay により細胞生存率を測定した。粒子によって誘発される細胞活性酸素種 (ROS) 産生は、蛍光色素で染色し、続いてマイクロプレートリーダーで測定した。THP-1 マクロファージと Caco-2 細胞の両方を、25 または 50 µg/mL の濃度の 2 種類のナノ/マイクロプラスチック粒子に 3 時間曝露後、蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。また、ナノ/マイクロプラスチック粒子によって誘発されるインターロイキン-1 の量を測定した。未分化および分化した Caco-2 細胞の両方に 25 または 50 µg/mL の濃度の 2 種類のナノ/マイクロプラスチック粒子に 24 時間曝露後、細胞培養培地を収集し、細胞培地中のインターロイキン-1 の量を、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法で測定し定量化した。さらに、未分化および分化した Caco-2 細胞の両方を、25 または 50 µg/mL の濃度の 2 種類のナノ/マイクロプラスチック粒子に 3 時間曝露後、細胞からの全 RNA を単離し、全 RNA の濃度を定量した。RNA を一本鎖 cDNA に逆転写後、ABI 7000 リアルタイム PCR システムを使用して、インターロイキン-8 の発現量を測定した。

## 4. 研究成果

未分化および分化した Caco-2 細胞に対するナノ粒子の表面電荷の違いによる影響を、中性、正または負の表面電荷を持つ蛍光標識したシリカナノ粒子を使用して調査した。まず、細胞生存率に対する表面電荷の影響を調べるために、未分化および分化 Caco-2 細胞を 1~100 µg/mL の濃度の 3 種類のシリカナノ粒子に 24 時間曝露した結果、表面電荷が未分化および分化 Caco-2 細胞の両方の生存率に影響を及ぼさないことが示された。また、未分化および分化した Caco-2 細胞の両方に 3 種類の表面電荷の異なるシリカナノ粒子を 3 時間曝露すると、用量依存的に蛍光標識されたシリカナノ粒子と細胞との相互作用が大幅に増加した。両細胞における最大の相互作用は、表面がより負に帯電した粒子に曝露した場合に認められた。さらに、正または負に表面荷電した粒子を曝露すると、分化した Caco-2 細胞で NO レベルが増加した。同様に、分化し

た Caco-2 細胞に、正または負に表面荷電した粒子を曝露すると、インターロイキン 8 の発現が上昇した。上記の結果より、官能化された表面電荷を有するシリカナノ粒子は腸上皮細胞の炎症反応を誘導する可能性があるとして示唆された。

THP-1 マクロファージと Caco-2 細胞に対し、一次粒径 50 nm と 200 nm のポリスチレン粒子の 24 時間曝露では、両方の細胞で、細胞生存率に変化は認められなかった。また、曝露後の活性酸素種の産生も、有意な上昇は認められなかった。さらに、2 種類のポリスチレン粒子の曝露により、インターロイキン-1 の発現レベルに変化はなく、インターロイキン 8 の発現量にも有意な変化はなかった。当実験に用いたポリスチレンのナノ/マイクロ粒子の曝露では、腸上皮細胞における炎症誘発性反応は認められなかった。

プラスチックは、風、紫外線および加水分解による物理的、化学的破壊により小さな粒子に碎け、マイクロプラスチックさらにナノプラスチックとなる。また、ナノ/マイクロプラスチックは、表面に多環芳香族炭化水素(PAHs)をはじめとする残留性有機汚染物質を吸着する性質を有し、ナノ/マイクロプラスチックが汚染物質のメディエーターとして機能する可能性も危惧されている。紫外線により劣化したプラスチックやプラスチックに吸着する環境汚染化学物質を考慮したさらなる検討が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tada-Oikawa S, Eguchi M, Yasuda MT, Izuoka K, Ikegami A, Vranic S, Boland S, Tran L, Ichihara G, Ichihara S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Functionalized surface-charge SiO <sub>2</sub> nanoparticles induce pro-inflammatory responses, but are not lethal to Caco-2 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1226-1236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.9b00478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitamura Y, Mise N, Mori Y, Suzuki Y, Ohashi T, Tada-Oikawa S, Tokisu M, Zong C, Oikawa S, Ichihara S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomic identification of the proteins related to cigarette smoke-induced cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75429-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 6.Suzuki Y, Ichihara G, Kawada S, Miyazawa K, Furutani T, Hayashida A, Watanabe E, Zong C, Tran L, Ikegami A, Ichihara S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of physiochemical characteristic of nano-sized TiO <sub>2</sub> on the adhesion of monocytes to endothelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NanoImpact	6. 最初と最後の頁 100257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.impact.2020.100257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sehsah R, Wu W, Ichihara S, Hashimoto N, Hasegawa Y, Zong C, Yamazaki K, Sato H, Itoh K, Yamamoto M, Ali Elsayed A, El-Bestar S, Kamel E, Ichihara G
2. 発表標題 Effect of Nrf2 deletion on inflammatory response in lung of female mice exposed to zinc oxide nanoparticles
3. 学会等名 NanoTox 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato H, Zong C, Devineau S, McCord C, Ichihara S, Brookes O, Ekuban F, Itoh K, Yamamoto M, Boland S, Baeza-Squiban A, Ichihara G
2. 発表標題 Pulmonary effects of Fe304-PEG-PLGA nanoparticles in human bronchial epithelial cells and in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration
3. 学会等名 NanoTox 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato H, Zong C, Devineau S, McCord C, Ichihara S, Brookes O, Ekuban F, Itoh K, Yamamoto M, Boland S, Baeza-Squiban A, Ichihara G
2. 発表標題 Pulmonary effects of Fe304-PEG-PLGA nanoparticles in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤春恵, 宗才, Stephanie Devineau, Claire McCord, 市原佐保子, Oliver Brookes, 伊東健, 山本雅之, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, 市原学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGA ナノ粒子の経気道曝露が肺にもたらす影響とNrf2 の役割
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤春恵, 宗才, 市原佐保子, 伊東健, 山本雅之, Sonja Boland, Armelle Baeza, 市原学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGA経気道曝露による野生型およびNrf2欠損マウスの肺への影響
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harue Sato, Cai Zong, Sahoko Ichihara, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, Gaku Ichihara
2. 発表標題 Pulmonary effect of exposure to Fe304-PEG-PLGA nanoparticles via pharyngeal aspiration in wild type and Nrf2 knockout mice
3. 学会等名 9th NANO Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤春恵、宗才、市原佐保子、伊東健、山本雅之、Boland Sonja、Baeza-Squiban Armelle、市原学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGAの経気道曝露によるマウスの肺への影響とNrf2の役割
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Sato, C. Zong, S. Devineau, C. McCord, S. Ichihara, O. Brookes, K.Itoh, M. Yamamoto, S. Boland, A. Baeza-Squiban, G. Ichihara
2. 発表標題 Pulmonary effects of Fe304-PEG-PLGA nanoparticles in human bronchial epithelial cells and in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration
3. 学会等名 SOT2021 (米国毒性学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	及川 佐枝子 (多田佐枝子)  (Oikawa Saeko)  (90610585)	椋山女学園大学・生活科学部・講師    (33906)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋 勝  (Tachibana Masaru)  (80236546)	横浜市立大学・理学部・教授    (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Institute of Occupational Medicine			
フランス	Universit&eacute; de Paris			